



HAL
open science

Effets de la macro-architecture du substrat sur l'activité et la différenciation des ostéoblastes

Laura Juignet

► **To cite this version:**

Laura Juignet. Effets de la macro-architecture du substrat sur l'activité et la différenciation des ostéoblastes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LY-SES060 . tel-01810064

HAL Id: tel-01810064

<https://theses.hal.science/tel-01810064>

Submitted on 7 Jun 2018

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

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

N°d'ordre



NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Jean Monnet

Ecole Doctorale N°488
Sciences Ingénierie Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 28/11/2016, par :
Laura Juignet

**Effets de la macro-architecture du
substrat sur l'activité et la
différenciation des ostéoblastes**

Devant le jury composé de :

CHEVALIER Jérôme, Directeur de Recherche, INSA de Lyon **Président**

AMEDEE Joëlle, Directeur de Recherche, INSERM **Rapporteuse**

LE VISAGE Catherine, Directeur de Recherche, INSERM **Rapporteuse**

GUIGNANDON Alain, Maître de conférence, Université Jean Monnet **Examineur**

MALAVAL Luc, Chargé de recherche, INSERM **Directeur de thèse**

DOUARD Nathalie, Maître assistant, Université Jean Monnet **Co-encadrante de thèse**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux Dr **Joëlle AMEEDÉ**, **Catherine LE VISAGE**, **Jérôme CHEVALIER** et **Alain GUIGNANDON** d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Pour connaître les origines de cette thèse, il faut remonter plusieurs années dans le temps. Après des études de médecine avortées par le terrible concours de première année, me voici réorientée en études de biologie., avec toujours ce désir de soigner les gens. C'est alors que je rencontre **Catherine LE VISAGE** que me donne ma chance en stage de master 2. Au sein de l'équipe « Bio-ingénierie cardiovasculaire » de l'INSERM U698, je re-découvre qu'il est possible de soigner/guérir sans forcément être médecin. Je m'épanouis dans cette équipe bienveillante (Cédric, Cécilia, Thomas, Rachida et tous les autres) mais surtout grâce à mon maître de stage. Catherine, par ta confiance, ta bonne humeur, ton aide, ta présence et tant d'autres choses, je pense que je ne pourrais jamais assez te remercier. Tu ne peux pas imaginer pas tout ce que tu as fait pour moi et ce que cela représente, la « cerise sur le gâteau » étant ta présence au sein de mon jury de thèse.

Après mon diplôme de master, me voilà quittant Paris, à regret à ce moment. Direction Saint-Etienne. La parisienne pure et dure que j'étais se retrouve perdue dans cette ville à côté de Lyon. Tout le monde me disait « Mais qu'est-ce que tu vas faire là-bas ? Quelle idée ? Et de toute façon, c'est où Saint-Etienne (véridique) ? ». A tous ceux-là, je leur dirais à quel point ils ont tort.

Je remercie le Dr **Laurence VICO** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire stéphanois, le LBTO. J'intègre la « Team BSP », sous la direction de **Luc MALAVAL** qui sera, à son grand malheur, renommé affectueusement « Chef ! » au cours de ma dernière année de thèse. Luc, chef, je ne te remercierai jamais assez pour ta patience, ton soutien et ta disponibilité. Tu m'as aidée à gérer mon stress et à prendre confiance en moi, en soignant le mal par le mal via les (trop !!!) nombreux Journal Club où tu m'as fait présenter. Tu as été le directeur de thèse qu'il me fallait, toujours à mon écoute, ne me refusant jamais ta porte, me remontant le moral avec des anecdotes tellement improbables qu'elles ne pouvaient que me faire rire. Ta bonne humeur tantôt râleuse tantôt taquine (tel directeur, telle thésarde) et ton immense culture font de toi le pilier essentiel de ces 3 années passées au sein du LBTO. Parallèlement à toi, complétant cette thèse pluri-disciplinaire, j'ai pu compter sur ma co-encadrante céramiste de l'Ecole des Mines, **Nathalie DOUARD**, ainsi que **David MARCHAT**, mon encadrant de l'ombre si perspicace. Je vous remercie pour vos conseils et votre rigueur qui m'ont amené à percevoir toute l'importance et la complexité de la chimie dans les études biologiques. Je remercie également **Virginie DUMAS** qui s'est peu à peu transformée en ma 4^e encadrante, participant à mes réunions mensuelles et me donnant des conseils tout au long de ma thèse.

Me voilà accueillie chaleureusement par tous les membres du LBTO qui vont m'apporter leur aide au cours de cette thèse. Je remercie tout d'abord les ingénieurs et techniciens qui m'ont formé et transmis leur savoir-faire dans des domaines aussi variés que la biologie moléculaire (**Marie-Thérèse LINOSSIER** et **Mireille THOMAS**, merci pour les mises au points qui m'ont permis de gagner beaucoup de temps), la culture cellulaire (**Syvie PEYROCHE**, merci pour avoir été la 3^{ème} paire de main lors des manip sur le BOSE et m'avoir soutenu dans les moments difficiles), l'histologie (**Norbert LAROCHE**,

qui ne jette rien mais alors rien, rien et que j'ai adoré taquiné) et la gestion d'un élevage de souris transgéniques (**Arnaud VANDEN-BOSSCHE**, toujours en mouvement, à mettre au point une nouvelle technique et qui a aussi subi mes taquineries avec le sourire). Je remercie également aux médecins du labo **Marie-Hélène LAFAGE-PROUST**, **Bernard ROCHE** (notre joker pour les mots fléchés et fournisseur de galettes bretonnes) et **Hubert MAROTTE** pour leur bonne humeur, leur gentillesse, leurs blagues du midi et leur patience à répondre face à mes questions naïves. Merci également à **Alain GUIGNANDON** pour sa disponibilité, son dynamisme et pour ses critiques toujours pertinentes (« C'est pas faux ! »), à **Myriam NORMAND** pour le chocolat et bienvenue à **Maura STRIGINI**.

Je remercie ma grande sœur de la « Team BSP », **Wafa BOULEFTOUR** (« Coucou, toi ! ») qui m'a soutenue, guidée, réconfortée durant ces 3 ans mais qui a aussi torturé la piplette que je suis en me forçant à garder son secret pendant 3 (très longs) mois : son adorable petit garçon Liyam. Merci aussi à tous mes co-bureaux : **Guillaume**, avec qui j'ai cohabité pendant ces trois ans, qui a été mon psy personnel et dont j'ai toujours admiré le professionnalisme (tu vas déchirer à Chicago !), **Maude** pour ses fous rires, **Vasiliy**, mon tout premier co-bureau, et bien sûr **Fiona** qui avec sa bonne humeur constante est devenue ma meilleure amie stéphanoise (tu vas me manquer quand tu seras au Pays du soleil levant !). Je n'oublie pas mes autres co-bureaux temporaires à qui j'ai imposé ma présence pendant un mois : **Benoît** (on a mis du temps à se connaître, tu ne parles pas beaucoup mais au final on a pas mal rigolé ensemble) et **Damien**, mon collègue d'expédition à Ecully, mon partenaire de mots fléchés du midi (le faon dans Bambi s'appelle Bambi n'est-ce pas ! Urgement) qui a supporté toutes mes moqueries et critiques sur ses cheveux avec le sourire (n'oublie pas de les couper quand même quand je ne serai plus là).

Merci aussi à tous les autres doctorants et docteurs : **Baptiste**, mon homologue de l'école des Mines, qui a passé beaucoup de temps à m'expliquer la chimie de l'hydroxyapatite, que j'ai souvent désespéré mais qui a toujours été adorable avec moi, **Antoine**, **Andréa** (câlins !), **Estelle** (re-câlins ! On ne l'aura jamais vu cette fête du chou), **Agathe**, **Jules**, **Olivier**, **Maxym**, **Clément** (ne lâche rien, je sais que tu en ais capable), **Amélie** ainsi qu'aux doctorants du CIS (**Fanette**, **David**, **Klervi**) du LPE, du GIMAP et du BiiGC (ils se reconnaitront). Vous avez été si nombreux à être présents pour moi, j'en oublie forcément, n'hésitez pas à me le faire payer.

Je remercie aussi **Charlène** (mon Cha d'amour), ainsi que **Fabienne**, **Imène** et **Cyrielle** (bientôt la fin pour toi aussi ;)), mes copines de médecine, 10 ans d'amitiés déjà.

Je remercie mes parents ainsi que **Marine** et **Clémence** pour m'avoir apporté tant de soutien afin de ne jamais rien lâcher, à tenir bon. Une pensée spéciale à ma petite sœur Clémence qui a partagé mon quotidien pendant plusieurs mois lors de cette dernière année et qui me comprend souvent mieux que moi-même (ça fait peur parfois !).

Et enfin, merci à Jean-Jacques Goldman pour avoir rythmé la rédaction cette thèse, depuis mes débuts laborieux jusqu'au tant attendu point final.

« There is nothing like looking, if you want to find something [...] but it is not always quite the something you were after »

J.R.R. Tolkien, The Hobbit

« Don't tell what I can't do »

John Locke, LOST

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	4
INTRODUCTION GENERALE	5
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
A. Le tissu osseux	9
I. Les fonctions de l'os	9
II. La structure du tissu osseux	9
1. Os cortical.....	9
2. Os trabéculaire	10
III. Les différents types cellulaires du tissu osseux	11
1. Lignée ostéoblastique	12
2. Ostéoclastes	16
3. Remodelage	18
IV. La matrice osseuse	21
1. La phase organique	21
2. La phase minérale	24
B. Interactions entre les cellules osseuses et leur substrat : du tissu aux biomatériaux ..	25
I. Les substrats en ingénierie tissulaire osseuse	25
1. Les biocéramiques.....	25
2. Les verres bioactifs.....	25
3. Les polymères	26
4. Les biomatériaux métalliques	27
II. De l'importance de la géométrie : les différentes échelles de la structure osseuse.....	28
1. Echelle nanométrique	28
2. Echelle micrométrique	30
3. Echelle macrométrique	31
III. Interactions cellules-matériaux	36
1. La mécanotransduction : généralités.....	36
2. Les fibres de stress.....	37
3. Rigidité du substrat.....	40
C. Les autres acteurs de l'ingénierie tissulaire osseuse	42
I. Le type cellulaire : comment bien le choisir ?	42
1. Cellules primaires	42
2. Lignées cellulaires	43
II. Les bioréacteurs	47
1. Spinner flasks	47
2. Bioréacteurs en rotation.....	48
3. Bioréacteurs à perfusion.....	49
III. Conditions de culture in vitro	50
1.ensemencement.....	50
2. Forces de cisaillement	51
OBJECTIFS	54
TRAVAUX REALISES	58
A. Etude 1 : Influence de la géométrie du substrat sur la croissance tissulaire, la différenciation ostéoblastique et l'ostéogénèse	60
I. Exposé des travaux (Article 1).....	60
II. Conclusions et perspectives	92
B. Etude 2 : Rôle de la macroarchitecture sur l'orientation cellulaire et son influence sur la croissance tissulaire	94
I. Exposé des travaux (Article 2).....	94
II. Conclusions et perspectives	114

C. Etude 3 : Développement d'un modèle de culture tridimensionnelle pour l'ostéogénèse	
in vitro	116
I. Contexte	116
II. Matériel et méthodes	116
1. Les cultures cellulaires	116
2. Les matériaux	117
3. Techniques d'ensemencement testées	118
4. Evaluation de l'ensemencement	118
5. Le bioréacteur BOSE ElectroForce® 5270 BioDynamic®	120
6. Evaluation de la différenciation ostéoblastique au sein des cultures 3D	121
7. Analyses statistiques	122
III. Résultats	122
1. Ensemencement	122
2. Culture cellulaire	124
IV. Discussion	129
V. Conclusion	132
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
ANNEXES	158
Publications et communications	159
Calcul de la courbure du substrat sur les matériaux macroarchitecturés	161
Calcul de la surface et du volume au sein des matériaux macroarchitecturés	163
RESUME	170
ABSTRACT	171

LISTE DES ABREVIATIONS

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSP	Sialoprotéine osseuse
BCP	Phosphate calcique biphasique
β -TCP	β -phosphate tricalcique
CaP	Phosphate de calcium
Cbfa1	Core-binding factor alpha 1
CCN	Protéines riches en cystéine
CK-1 α	Caséine kinase 1
COX2	Cyclo-oxygénase 2
CSS	Cellules souches squelettiques
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein
DSPP	Sialophosphoprotéine dentinaire
E	Module d'Young
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FGF23	Facteur fibroblastique 23
FN	Fibronectine
Frz	Frizzled
GAG	Glycosaminoglycane
Gla	Gamma carboxy glutamic acid
GSK-3 β	Glycogène synthétase kinase-3 β
GTP	Guanosine triphosphate

HA	Hydroxyapatite
KASH	Klarsicht, ANC-1, Syne Homology
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MMP	Métalloprotéinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
NASA	Administration nationale de l'aéronautique et de l'espace (USA)
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NMMII	Non-muscle myosin II
OCN	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine
Osx	Ostérix
PAL	Phosphatase alcaline
PBS	Phosphate buffer saline
PCL	Polycaprolactone
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Protéoglycane
PGA	Acide polyglycolique
PGE2	Prostaglandine E2
PLA	Acide polylactique
PMMA	Polyméthyl méthacrylate
PNC	Protéine non collagénique
PTH	Parathormone
RANK-L	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-b Ligand
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	Rotation par minute

Runx2	Runt-related transcription factor 2
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligand N-glycosylated
SUN	Domaine Sad1p, UNC-84
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TGF β	Facteur de croissance transformant β
TRAP	Phosphatase acide tartrate-résistante
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless integration site
YAP	Yes-associated protein
σ	Surface
ε	Déformation du matériau

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les trois piliers de l'ingénierie tissulaire (Ohba et al., 2009).	6
Figure 2 : Système de Havers (Quizlet, 2016)	10
Figure 3 : Structure de l'os (Cummings, 2007).	11
Figure 4 : Cinétique de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique.	12
Figure 5 : La voie Wnt- β -caténine (Robert, 2010).	16
Figure 6 : Mécanismes impliqués dans la résorption osseuse par les ostéoclastes (Kumar et al., 2005).	17
Figure 7 : Les différents acteurs du remodelage osseux (adapté de Baron et Kneissel, 2013).	19
Figure 8 : Différences de remodelage osseux entre os trabéculaire et os cortical (Sims & Martin, 2014).	20
Figure 9 : La matrice extracellulaire osseuse (Gaharwar et al., 2015).	24
Figure 10 : Organisation hiérarchique du tissu osseux (Wang et al., 2013).	28
Figure 11 : Schéma de l'impact des différentes structures (sur une surface plane et à des échelles nano-et micrométriques) sur le comportement cellulaire (Jeon et al., 2014).	30
Figure 12 : Relation entre courbure et géométrie.	34
Figure 13 : Croissance tissulaire au sein de matériaux à architecture contrôlée (adapté de Rumppler et al., 2008).	34
Figure 14 : Le « chord model » (Bidan et al., 2012).	35
Figure 15 : Mécanismes cellulaires induits par les interactions cellule-matrice extracellulaire (Hoffmann et al., 2011).	37
Figure 16 : Voie de signalisation de RhoA, impliquée dans la formation des fibres de stress	39
Figure 17 : Transmission du stress mécanique au noyau (Liu, 2012).	39
Figure 18 : Définition du module d'Young.	40
Figure 19 : Propriétés élastiques des tissus, caractérisées par le module d'Young (Blau et al., 2015).	41
Figure 20 : Influence de la rigidité du substrat sur les fibres de stress (Prager-Khoutorsky et al., 2011).	41
Figure 21 : Les trois types de bioréacteurs les plus utilisés en ingénierie tissulaire osseuse (adapté de Olivier et al., 2004).	47
Figure 22 : Modèles de bioréacteurs à perfusion (Bouet et al, 2015).	49
Figure 23 : Réponses cellulaires aux forces de cisaillement (Haase & Peeling, 2015).	53
Figure 24 : Topography of the three different macroarchitected bioceramics (A) with hemi-circular grooves ($S2\pi$), and with triangular grooves with an angle of (B) $T2\pi$ or (C) $T\pi$.	65
Figure 25 : The average roughness (Ra) on the surface of the different ceramics.	66
Figure 26 : Cell attachment on grooved ceramics after one hour.	73
Figure 27 : Cell culture dynamics in grooved ceramics.	74
Figure 28 : Tissue deposition in the ceramics after 15 days of culture.	76
Figure 29 : Live/Dead labeling of calvaria cells grown on macroarchitected ceramics.	78
Figure 30 : Expression and distribution of OPN and FN in cultures.	80
Figure 31 : Time course of expression of OCN and sclerostin in cell cultures on grooved substrates.	82
Figure 32 : Assessment of opening angles of the three macroarchitected substrates (A) $S2\pi$, (B) $T2\pi$ and (C) $T\pi$.	84
Figure 33 : Osteogenic cultures in the three macroarchitected bioceramics.	98
Figure 34 : Actin stress fibers distribution in cultures on macrogrooved scaffolds.	103
Figure 35 : Quantitative analysis of the orientation of actin stress fibers in cultures on macrogrooved scaffolds.	104
Figure 36 : Quantitative analysis of nuclear shape factor in cultures on macrogrooved scaffolds.	106
Figure 37 : Quantitative analysis of the orientation of cell nuclei in culture on macrogrooved scaffolds.	107
Figure 38 : Les biomatériaux en hydroxyapatite utilisés pour l'étude en bioréacteur.	117
Figure 39 : Le bioréacteur Bose de la plateforme Equipex IVTV.	120
Figure 40 : Grilles métalliques du dispositif de perfusion du bioréacteur BOSE.	121
Figure 41 : Optimisation du montage de perfusion des biomatériaux 3D cultivés dans le bioréacteur BOSE.	124
Figure 42 : Optimisation du flux de perfusion des cultures 3D dans le bioréacteur BOSE.	125
Figure 43 : Dépôt de matrice extracellulaire au sein des biomatériaux 3D.	126
Figure 44 : Différenciation ostéoblastique dans les biomatériaux 3D cultivés dans le bioréacteur BOSE.	128
Figure 45 : Section transversale d'un pore triangulaire après culture au sein du bioréacteur (schéma hypothétique).	136

INTRODUCTION GENERALE

Les nombreuses avancées dans le domaine des biomatériaux ont permis l'émergence d'une nouvelle discipline qui combine aux biomatériaux des cellules et des signaux biochimiques : l'ingénierie tissulaire (Figure 1). L'ingénierie tissulaire, telle que définie par R. Langer et J.P. Vacanti, est le champ disciplinaire regroupant l'ingénierie et la biologie, qui permet nt le développement de substituts biologiques dont la vocation est de restaurer, de maintenir ou d'améliorer la fonction d'un tissu (Langer and Vacanti, 1993).

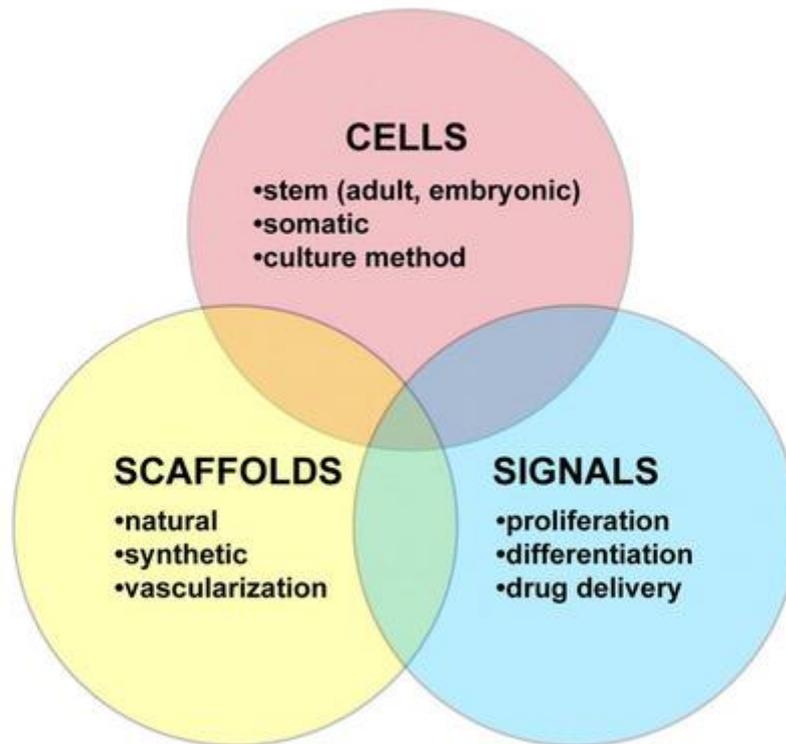


Figure 1 : Les trois piliers de l'ingénierie tissulaire (Ohba et al., 2009).

L'ingénierie tissulaire est le champ disciplinaire où sont réunis biomatériaux, cellules et signaux biochimiques, dans le but de développer ou de remplacer un tissu.

Si le but premier de l'ingénierie tissulaire est donc de remplacer et de réparer des tissus ou organes abimés (voie thérapeutique), l'autre pendant de cette discipline est le développement de modèles *in vitro* de tissus vivants permettant de mieux comprendre leur physiologie (voie expérimentale). *In vivo*, les cellules évoluent dans un microenvironnement complexe et tridimensionnel. Paradoxalement, la majeure partie de nos connaissances sur la physiologie cellulaire est issue d'expériences réalisées sur des cellules cultivées sur du plastique et en deux dimensions. Ces différences ne peuvent qu'avoir une influence sur le comportement des cellules qui n'entretiennent plus les mêmes relations spatiales entre elles, ainsi qu'avec leur environnement. Le développement de modèles de culture cellulaire osseuse en trois

dimensions (3D) devient alors indispensable afin de se rapprocher des conditions *in vivo* et ainsi mieux comprendre la physiologie cellulaire dans un environnement à la fois simplifié et contrôlé. Si des études ont déjà été réalisées au sein de substrats macroarchitecturés, c'est-à-dire au sein de structures supérieures à 100 μm , leur architecture est très souvent difficilement contrôlée, en raison des techniques de fabrication utilisées (lyophilisation, agent porogène, ...). Le développement des procédés de fabrication additive, communément appelée impression 3D, permet désormais une standardisation et la personnalisation des biomatériaux, avec un taux de reproductibilité élevé. A l'heure actuelle, les quelques études pertinentes se sont focalisées uniquement sur le dépôt de matrice extracellulaire ou n'ont que très peu investiguées le devenir des cellules osseuses au sein de telles structures.

Afin d'étudier l'influence de la macroarchitecture du substrat sur la différenciation ostéoblastique, des céramiques en phosphate de calcium à architecture contrôlée ont été développées au sein de notre laboratoire. Une première étude a été entreprise sur des substrats en relief macroarchitecturés, présentant des sillons de différentes géométries. Ces travaux nous ont permis d'observer et de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des cellules vis-à-vis des différentes macrostructures. Les résultats obtenus sont décrits dans deux articles, présents dans la première et seconde partie des Travaux réalisés. Afin de poursuivre ces investigations dans des conditions plus proches de l'*in vivo*, un modèle de culture cellulaire 3D a été développé au sein du bioréacteur BOSE *ElectroForce*[®] 5270 *BioDynamic*[®]. Celui-ci permet d'explorer les interactions cellulaires-substrat sous perfusion et en réponse à des contraintes mécaniques (forces de cisaillement). Les résultats de ces travaux, encore inaboutis, sont présentés dans la troisième partie des Travaux réalisés.

La revue bibliographique qui débute ce document présente la biologie du tissu osseux, puis retrace les différents effets connus de l'architecture du biomatériau sur le comportement des cellules, ainsi que les autres paramètres dont il est important de tenir compte lors de la réalisation d'études en ingénierie tissulaire osseuse à but expérimental.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Le tissu osseux

I. Les fonctions de l'os

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, comprenant des cellules et une matrice extracellulaire minéralisée. Il assure trois grandes fonctions essentielles au bon fonctionnement de l'organisme.

La première et la plus évidente est la fonction mécanique. Le tissu osseux est capable de résister à d'importantes contraintes mécaniques, donnant ainsi au squelette son rôle de soutien et de protection des différents organes du corps.

Le tissu osseux n'en reste pas moins un tissu dynamique. Il participe activement à l'homéostasie globale en libérant des facteurs hormonaux (fonction métabolique). Par exemple, l'ostéocalcine, sécrétée par les ostéoblastes matures, stimule la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes ainsi que la prolifération des cellules β du pancréas (Wei et al., 2014; Zhang et al., 2012). L'autre grande hormone osseuse est le facteur de croissance fibroblastique 23 (FGF23), synthétisé par les ostéocytes. Son action porte sur les glandes parathyroïdiennes et les reins, et provoque une diminution de la concentration de phosphate circulant (Fukumoto and Martin, 2009; Karsenty and Ferron, 2012). L'os est également une des cibles de la parathormone (PTH) et de la vitamine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui participent au fait que l'os constitue la plus importante source de calcium (99%) et de phosphore (85%) du corps humain.

Les os renferment la moelle osseuse, lieu de stockage des cellules souches hématopoïétiques (fonction hématopoïétique). Ces cellules vont produire les différentes cellules issues de la lignée hématopoïétique telles que les érythrocytes, les lymphocytes et les plaquettes.

II. La structure du tissu osseux

L'os est classé en deux catégories selon sa structure et sa porosité : l'os cortical ou compact, très dense, et l'os trabéculaire, aussi appelé os spongieux et dont la porosité peut atteindre 95%.

1. *Os cortical*

L'os cortical, qui représente 80% de la masse osseuse totale, se situe sur la face externe des os ; il est particulièrement épais le long de la diaphyse des os longs (Figure 3C). Sa densité élevée lui confère une grande résistance aux forces mécaniques. Il est composé par un ensemble de structures lamellaires cylindriques, les systèmes de Havers, aussi appelés ostéons.

Un ostéon est constitué d'un canal central, appelé canal de Havers, contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des nerfs et de lamelles osseuses périphériques, qui renferment les ostéocytes. Les ostéons sont reliés entre eux par des canaux transversaux, les canaux de Volkmann, qui contiennent des vaisseaux sanguins et des nerfs (Figure 2).

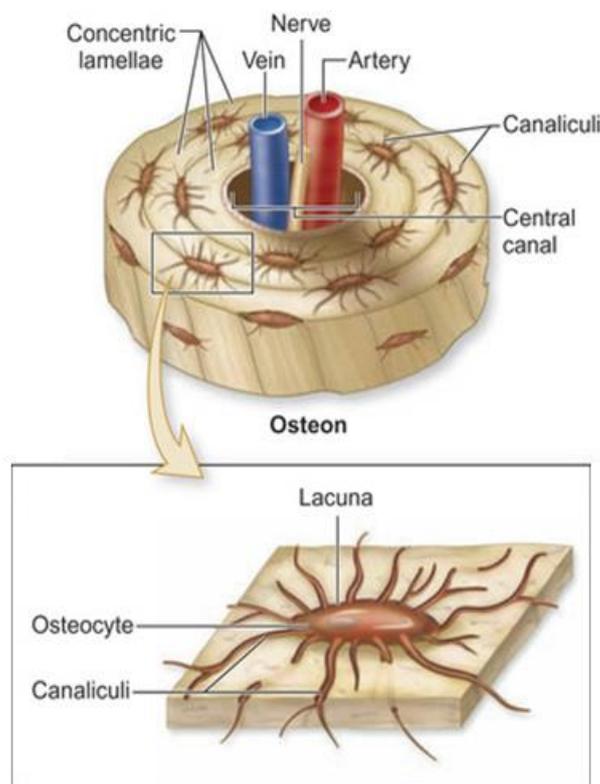


Figure 2 : Système de Havers (Quizlet, 2016)

2. Os trabéculaire

L'os trabéculaire, aussi appelé os spongieux, est présent dans les os plats et dans l'épiphyse et la métaphyse des os longs (Figure 2B).

L'os trabéculaire, dont la porosité peut atteindre 95% de l'os total, est constitué de nombreuses travées. Ces travées osseuses participent au soutien mécanique, et particulièrement dans les vertèbres et les os porteurs (fémurs). A la ménopause et

dans un contexte d'ostéoporose, le nombre de travées diminue, augmentant le risque de fracture.

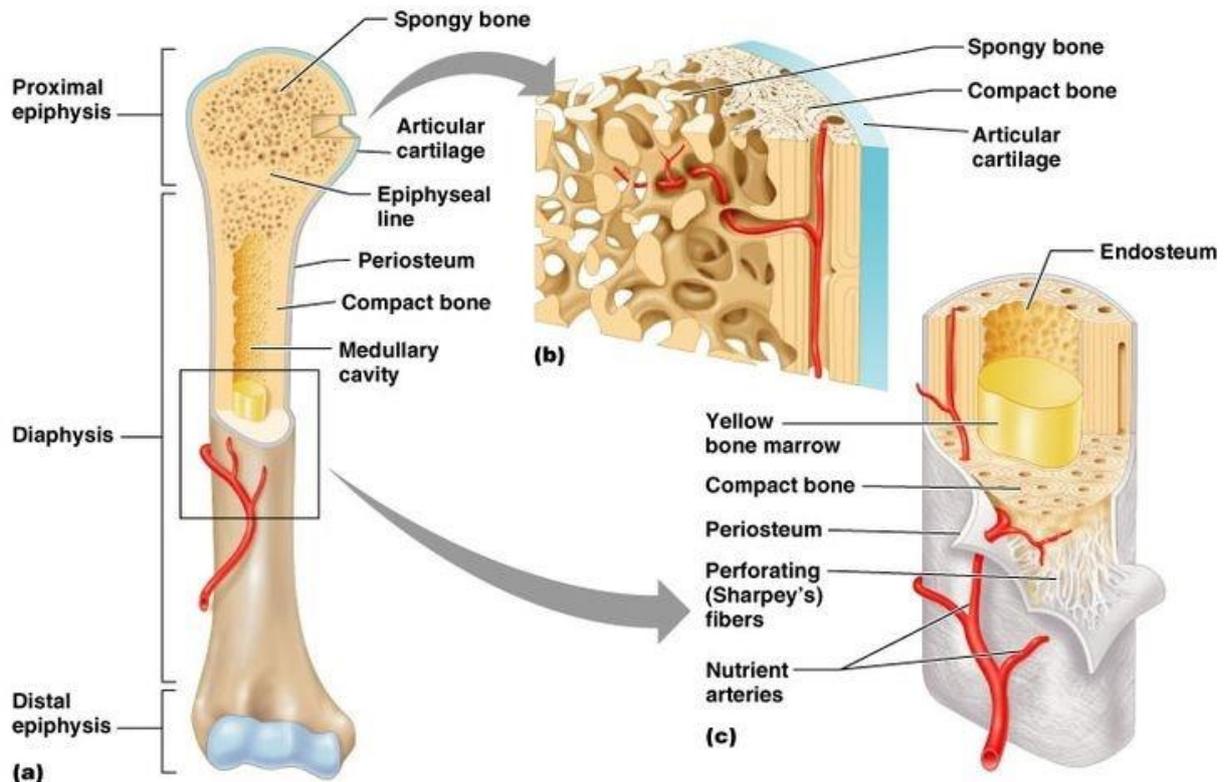


Figure 3 : Structure de l'os (Cummings, 2007).

Bien que l'os cortical et l'os trabéculaire aient des structures différentes, ils sont tout deux constitués des mêmes cellules spécifiques responsables du maintien de l'intégrité du tissu osseux et d'une matrice extracellulaire complexe.

III. Les différents types cellulaires du tissu osseux

Responsables de la formation et du remodelage osseux, les cellules osseuses ne forment cependant pas un groupe homogène et ont des origines différentes. Les ostéoblastes, cellules à l'origine de la formation osseuse, sont issues de progéniteurs mésenchymateux alors que les ostéoclastes, responsables de la dégradation osseuse, proviennent de la lignée hématopoïétique, également à l'origine des cellules sanguines (lymphocytes, hématies, mégacaryocytes, monocytes).

1. Lignée ostéoblastique

a. Les membres de la lignée ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont un groupe de cellules issues de la différenciation d'une cellule souche squelettique. Au cours de sa différenciation, la cellule ostéoblastique exprime différents facteurs qui déterminent son avancée dans celle-ci : ces stades sont successivement le progéniteur ostéoblastique, le pré-ostéoblaste, l'ostéoblaste puis l'ostéocyte ou la cellule bordante (selon le devenir de l'ostéoblaste) (Figure 4).

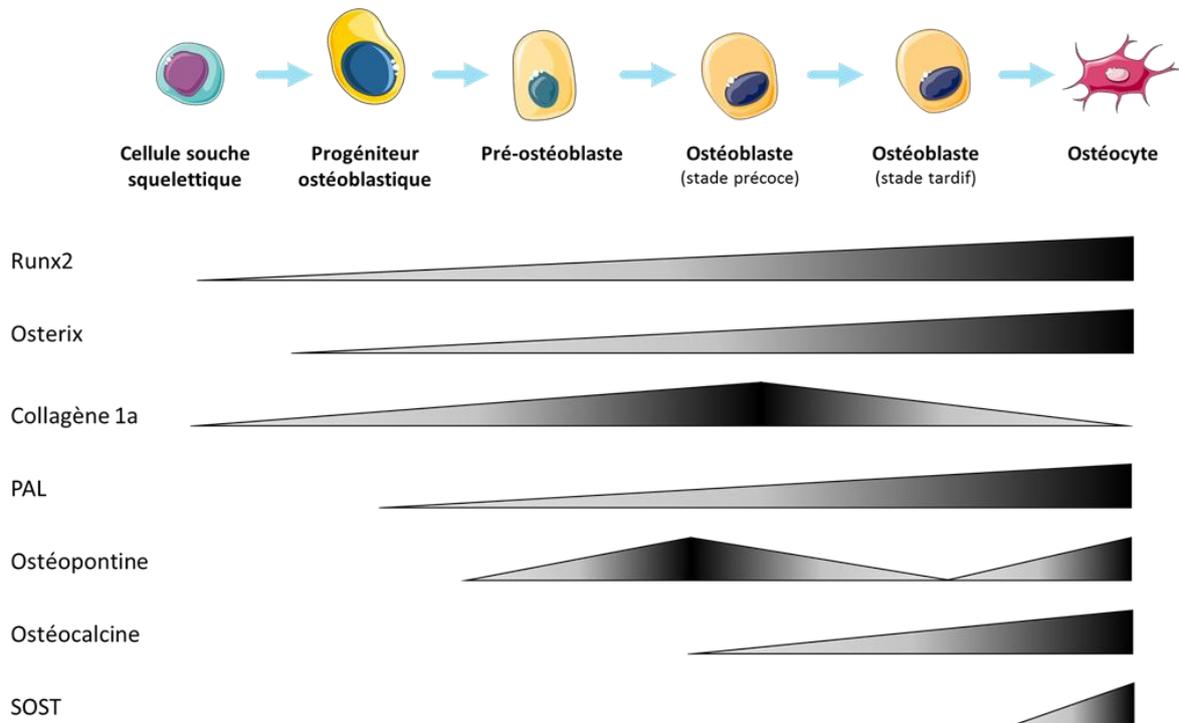


Figure 4 : Cinétique de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Au cours de sa différenciation, la cellule ostéoblastique exprime de nombreux facteurs correspondants à des stades définis. L'importance de la quantité de facteurs est exprimée en degrés de gris.

Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont localisés sur les faces interne et externe de l'os, à l'interface entre la matrice minéralisée et la moelle osseuse (endoste) ou les tissus conjonctifs périphériques de l'os (périoste). Ce sont des cellules à forme cubique, polarisée, dont la taille est comprise entre 15 et 30 μm de diamètre.

Les ostéoblastes synthétisent l'ostéoïde, la matrice osseuse non encore minéralisée, en sécrétant du collagène de type I et des protéines non collagéniques telles que l'ostéopontine et l'ostéocalcine (Figure 4). Témoinnant de leur forte activité de

synthèse protéique, les ostéoblastes sont très riches en organites (réticulum endoplasmique granuleux, mitochondries).

Les ostéoblastes ont également un rôle dans la résorption osseuse où ils participent à l'activation des précurseurs ostéoclastiques, notamment par la synthèse de « Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-b Ligand » (RANK-L).

Une fois le dépôt de matrice osseuse terminé, les ostéoblastes ont plusieurs devenir. Si la majorité d'entre eux meurent par apoptose, les ostéoblastes restants vont soit être incorporés dans la matrice osseuse et se différencier en ostéocyte, soit rester à la surface de la matrice osseuse et devenir des cellules bordantes.

Ostéocytes (Franz-Odendaal, 2005)

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés, qui ont été emprisonnés dans la matrice osseuse minéralisée lors de la synthèse de l'ostéoïde. Il s'agit des cellules majoritaires de l'os, représentant 90 à 95% des cellules du tissu osseux mature (Franz-Odendaal et al., 2006).

Les ostéocytes communiquent entre eux, avec les ostéoblastes et les cellules bordantes via leurs prolongements cytoplasmiques au moyen de jonctions communicantes. Les nombreux prolongements cytoplasmiques leur permettent de créer un réseau tridimensionnel.

Les ostéocytes sont de puissants régulateurs du remodelage osseux, en réponse aux signaux mécaniques et hormonaux. Cette régulation semble être en partie médiée par la sclérostine, produit du gène *SOST*, et par « Dickkopf-related protein 1 » (DKK1), toutes deux synthétisés par les ostéocytes.

Cellules bordantes

Les cellules bordantes, souvent décrites comme des ostéoblastes quiescents, recouvrent les surfaces osseuses qui ne sont pas actives, c'est-à-dire ni en formation ni en résorption (voir **Partie A.III.3**). De forme étalée, les cellules bordantes ont des noyaux plats et sont connectées entre elles et aux ostéocytes via des jonctions gap. Elles sont notamment responsables de l'homéostasie calcique, régulant le passage du calcium entre la matrice minéralisée et le système sanguin. Sous l'influence de stimuli, tels que la PTH, les cellules bordantes sont capables de proliférer et de se différencier, pouvant servir de source de précurseurs ostéoblastiques (Kim et al., 2012; Miller et al., 1989). Responsables de la modulation de l'activité des ostéoclastes via la sécrétion d'ostéoprotégérine et de RANK-L, les cellules bordantes vont nettoyer la surface de

l'os en digérant les fibrilles de collagène non minéralisé grâce à des métalloprotéinases matricielles (MMP), puis s'écarter pour donner aux ostéoclastes accès à la matrice osseuse (Florencio-Silva et al., 2015).

b. La différenciation ostéoblastique

Comme décrit ci-dessus, les cellules ostéoblastiques font partie de la lignée mésenchymateuse et sont issues de la différenciation de cellules souches squelettiques (CSS). Les CSS sont des cellules périvasculaires, assimilées à des péricytes, capables de générer les chondrocytes, les adipocytes médullaires et les ostéoblastes. Elles participent à l'organisation du microenvironnement médullaire via l'organisation du réseau vasculaire, le recrutement des ostéoclastes et en constituant la niche des cellules souches hématopoïétique (Bianco and Robey, 2015).

La différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique nécessite l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques à des temps précis, qui vont permettre de définir des stades successifs de différenciation ostéoblastique.

Runx2 et Osterix

Runx-related transcription factor 2 (Runx2), aussi connu sous le nom de « Core-binding factor alpha 1 » (Cbfa1), est le facteur de transcription le plus précoce qui permet l'engagement des cellules progénitrices dans la lignée ostéoblastique. Des souris knock-out pour Runx2 (Runx2^{-/-}) présentent à la naissance un squelette non ossifié, et donc uniquement cartilagineux, résultant d'une absence totale d'ostéoblastes, indiquant son rôle indispensable dans la différenciation ostéoblastique (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Runx2 régule la prolifération cellulaire, intervient dans de nombreuses voies de signalisation et contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes intervenants dans la maturation des ostéoblastes. Au cours de la différenciation ostéoblastique, Runx2 régule l'expression de gènes ostéoblastiques spécifiques tels que le collagène de type Ia, de l'ostéopontine (OPN), de la sialoprotéine osseuse (BSP) et de l'ostéocalcine (OCN) (Kern et al., 2001). Cependant, si Runx2 induit la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques, son expression diminue dans les ostéoblastes matures, n'étant plus nécessaire au maintien de l'expression de ces protéines (Komori, 2010).

De plus, Runx2, en se liant au promoteur d'Osterix, régule son activation faisant d'Osterix la cible directe de Runx2. Tout comme pour Runx2, l'extinction génique d'Osterix (Osx^{-/-}) provoque un déficit total en ostéoblastes (Nakashima et al., 2002).

Cela fait que Runx2 et Osx sont tous deux nécessaires pour la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse. Osx, en se liant au « Nuclear factor of activated T cells » (NFAT), active lui aussi les promoteurs de nombreux gènes ostéoblastiques, dont l'OPN, l'OCN et la BSP, ainsi que celui du collagène de type I (Karsenty, 2000; Koga et al., 2005).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La famille Wingless (Wnt) comprend plus de 19 membres qui ont d'importants rôles dans l'embryogénèse et le développement postnatal. Lorsque Wnt n'est pas exprimé, APC (*Adenomatous polyposis coli*), la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK-3 β), la caséine kinase 1 (CK-1 α), l'axine et la β -caténine sont complexées ensemble (Figure 5). GSK-3 et CK-1 α phosphorylent la β -caténine, ce qui va provoquer sa dégradation par le protéasome. En cas de liaison de Wnt au récepteur membranaire Frizzled (Frz), GSK-3 est inactivé et se libère du complexe, ce qui conduit à la stabilisation de la β -caténine. La β -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et est transloquée au noyau, où elle va s'associer avec les facteurs de transcription TCF/LEF (Figure 5). Cette interaction provoque l'activation des gènes cibles de Wnt, dont font parties l'ostéocalcine et Runx2. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est aussi impliquée dans le remodelage osseux, en inhibant la différenciation des monocytes sanguins en ostéoclastes via la modulation de l'expression de l'ostéoprotégérine (OPG), récepteur bloquant de RANK-L, par les ostéoblastes et les ostéocytes (Figure 5). De plus, en absence de stimulation mécanique, les ostéocytes vont fortement exprimer DKK1/sclérostine. La sclérostine agit également comme un inhibiteur compétitif des récepteurs des « Bone morphogenetic proteins » (BMP), ce qui provoque une diminution des BMP et donc empêche la minéralisation de la matrice osseuse par les ostéoblastes (Semënov et al., 2005; Robling et al., 2008; Krause et al., 2010).

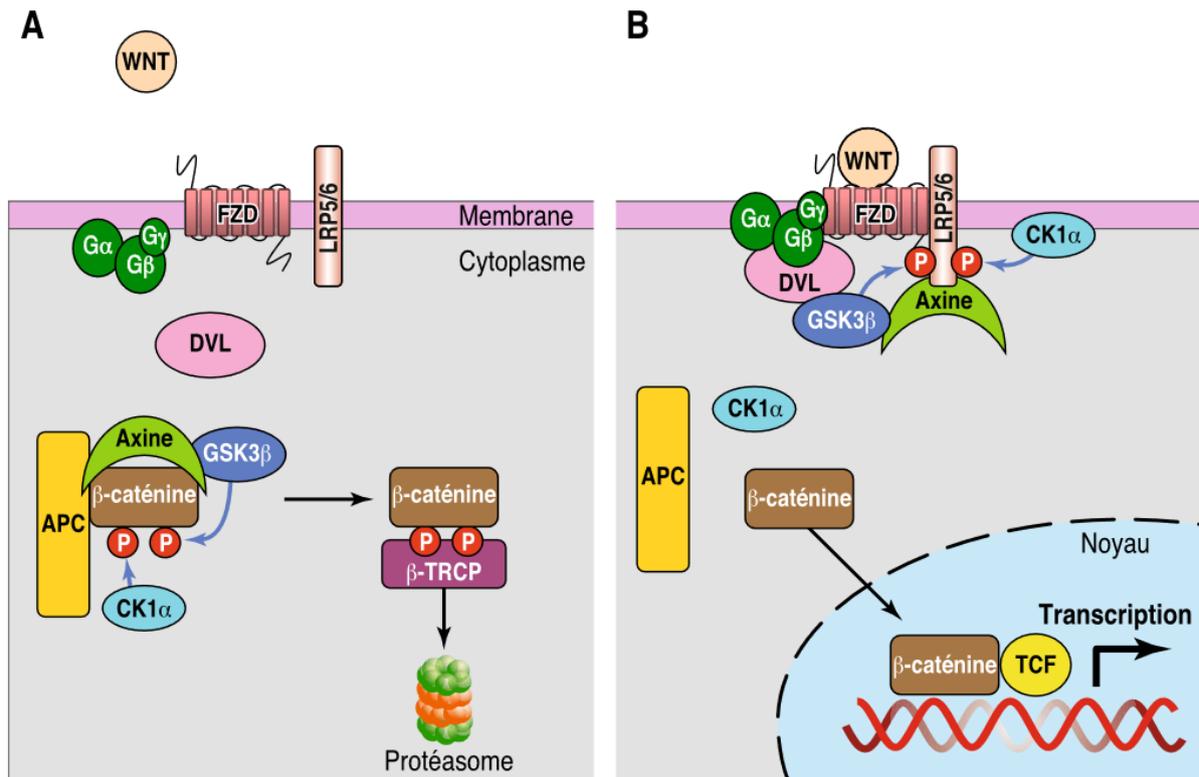


Figure 5 : La voie Wnt- β -caténine (Robert, 2010).

(A) En absence de stimulation des récepteurs FZD par un ligand WNT, la β -caténine est phosphorylée par les kinases GSK-3 β et CK-1 α . Cette phosphorylation la conduit vers son ubiquitine-ligase, β -TRCP, et vers le protéasome. (B) Quand Wnt se lie à son récepteur Frz, le complexe n'est pas formé et la β -caténine non phosphorylée peut entrer dans le noyau où elle s'associe à un ensemble de molécules impliquées dans la transcription, en particulier les facteurs TCF/LEF. La levée de la répression permet la transcription de nombreux gènes de différenciation ostéoblastique, dont le gène de l'ostéocalcine et celui de Runx2.

2. Ostéoclastes

Responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes sont des cellules issues de la lignée hématopoïétique, et plus particulièrement de la lignée des précurseurs monocytes/macrophages. Un ostéoclaste actif est une cellule polarisée avec, au sein de son cytoplasme, un important appareil de Golgi, de nombreuses mitochondries et une multitude de vacuoles contenant des protéases. Ces enzymes comprennent entre autres la cathepsine K, la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) et les métalloprotéines 9 et 13 ; elles sont capables de détruire la matrice osseuse au cours de la résorption.

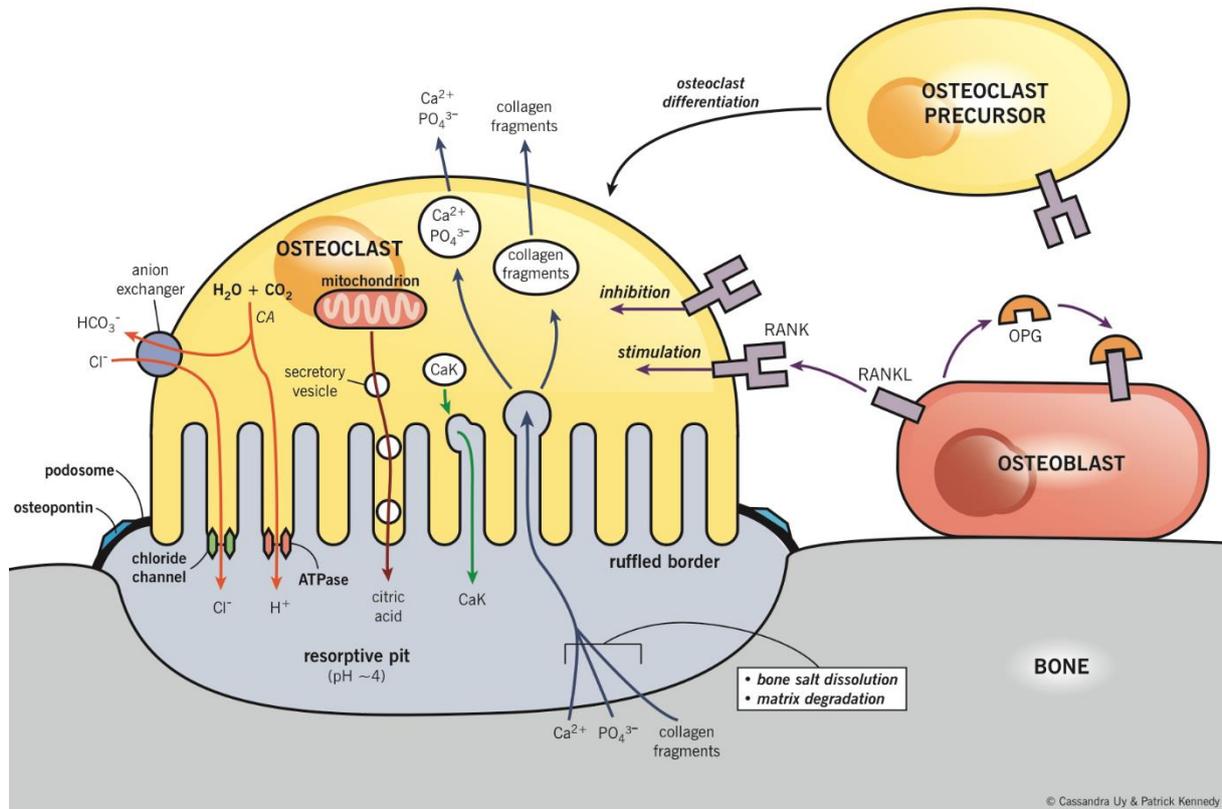


Figure 6 : Mécanismes impliqués dans la résorption osseuse par les ostéoclastes (Kumar et al., 2005). RANKL, sécrété par les ostéoblastes, permet la différenciation des ostéoclastes ainsi que leur activation. La membrane cytoplasmique forme une bordure en brosse au contact de la surface osseuse, qui permet d'augmenter la surface membranaire disponible. Les podosomes créent une zone de scellement autour de la bordure en brosse, constituant la lacune de résorption. De nombreux acides (acide citrique, acide lactique), fabriqués par les mitochondries sont sécrétés dans des vésicules cytoplasmiques et libérés dans la lacune de résorption, tout comme les enzymes ostéolytiques (e.g. cathepsine K). Des ions H^+ sont également libérés via les pompes à protons ATP-dépendante. L'ensemble de ces éléments induit une acidification du milieu dans la lacune de résorption, provoquant une dégradation de la MEC et la dissolution de la phase minérale osseuse. Les différents éléments résiduels, tels que le collagène ou les minéraux, sont phagocytés par l'ostéoclaste.

Sous l'action de différents facteurs, tels que le « Macrophage-Colony Stimulating Factor » (M-CSF) et RANK-L, les précurseurs ostéoclastiques vont commencer leur différenciation en pré-ostéoclastes dans la moelle osseuse. En réponse à la sécrétion de RANK-L par les ostéoblastes, les pré-ostéoclastes vont migrer à la surface de l'os à résorber. Ils vont alors fusionner entre eux et former des ostéoclastes matures, cellules géantes (de 20 à 100 μm de diamètre) multinuclées.

Au cours de la résorption, l'ostéoclaste s'ancre à la matrice osseuse au moyen des intégrines, et plus particulièrement $\alpha\beta3$, qui reconnaissent les motifs RGD présents sur les protéines de la matrice osseuse (McHugh et al., 2000). Cette liaison provoque une réorganisation du cytosquelette d'actine, avec l'émission de pseudosomes et la formation d'un anneau d'actine, aboutissant à la création d'une lacune de résorption, aussi appelée lacune de Howship, isolée de l'environnement extérieur (Mulari et al.,

2003). Au sein de cette zone scellée, la membrane cytoplasmique va former de nombreuses villosités et constituer une bordure en brosse où se trouve la pompe à protons H⁺ATPase. Avec les acides citrique et lactique, son rôle est d'acidifier la lacune de résorption et de permettre la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite (Blair et al., 1989). De plus, stockées jusqu'alors dans les vésicules lysosomales, les enzymes ostéolytiques (cathepsine K, TRAP, MMP9 et 13) sont libérées dans la lacune de résorption et participent à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) osseuse. Les produits issus de la dégradation de la matrice osseuse, tels que les fragments de collagène et les ions Ca²⁺ et PO₄³⁻, sont internalisés dans l'ostéoclaste puis libérés dans la circulation générale.

3. Remodelage

L'os est un tissu dynamique, en constante réorganisation. En effet, avec l'âge, des micro-fractures apparaissent dans la matrice minéralisée. Il devient alors nécessaire de renouveler cet os abimé. C'est ce processus que l'on appelle remodelage osseux. A l'âge adulte, une partie du squelette est renouvelé chaque année, à hauteur de 10% (Frost, 1990). Le remodelage osseux est donc essentiel au bon maintien de l'intégrité du squelette correspondant, dans des conditions optimales, à un équilibre entre résorption osseuse ostéoclastique et formation osseuse ostéoblastique. Cet équilibre nécessite une coordination parfaite entre ces deux événements, connue sous le terme de « couplage ».

Le remodelage osseux est soumis à de multiples régulations qui peuvent provoquer un ajustement de ce couplage. Par exemple, quand l'os est soumis à des contraintes mécaniques, il y a une augmentation de la formation osseuse ; à l'inverse, quand il n'y a que peu de contraintes subies, la balance tend vers la résorption ostéoclastique. Le remodelage permet ainsi une adaptation du squelette aux forces et contraintes mécaniques tout au long de la vie d'un individu, mais également le maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme par la libération ou le stockage des sels minéraux.

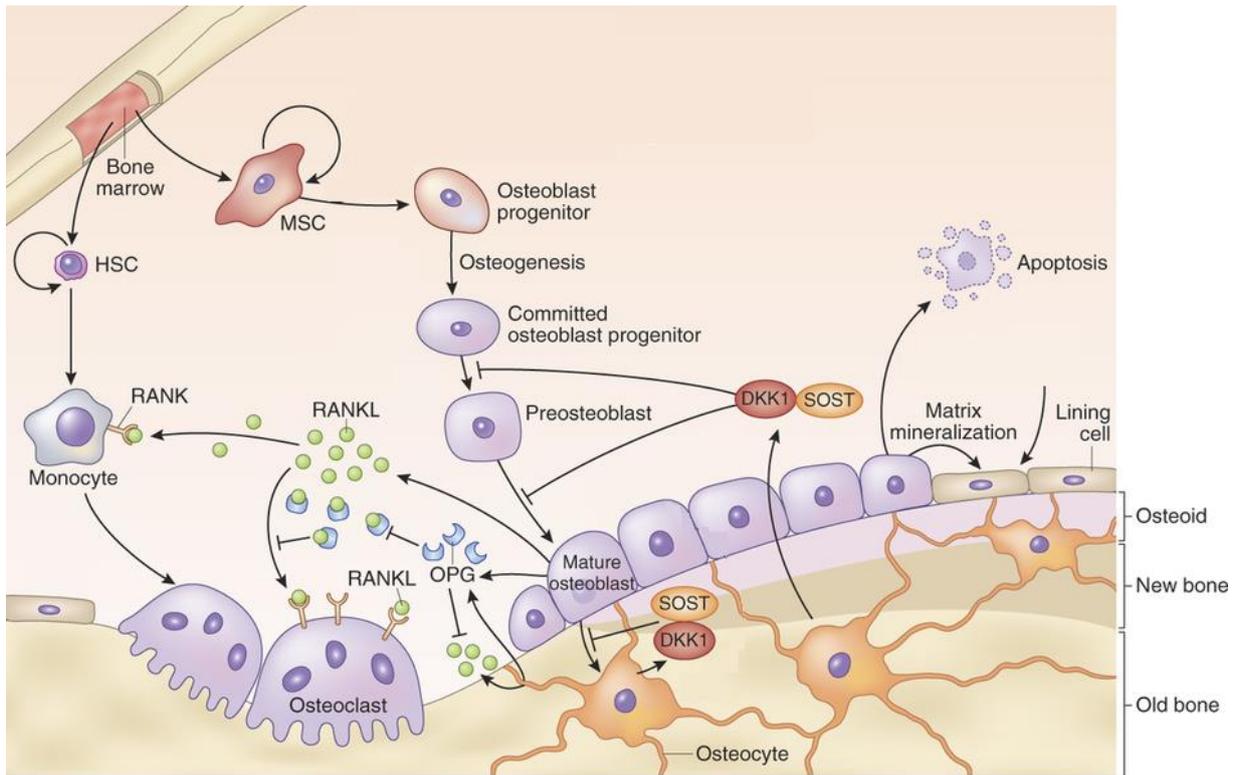


Figure 7 : Les différents acteurs du remodelage osseux (adapté de Baron et Kneissel, 2013).

Le remodelage osseux est le résultat d'un couplage entre la résorption par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes. En réponse à la synthèse de RANK-L par les ostéoblastes, les monocytes s'activent, se différencient en ostéoclastes et commencent à résorber la MEC osseuse. Les ostéoblastes, issus de la différenciation d'une cellule souche squelettique, synthétisent l'ostéoïde. Après la minéralisation de la MEC, les ostéoblastes vont soit entrer en apoptose, soit s'emmurer dans la matrice et devenir des ostéocytes, soit entrer en quiescence sous la forme de cellules bordantes. Cet ensemble de cellules situées au niveau du site de remodelage constitue l'unité multicellulaire basique (BMU).

Le remodelage osseux débute par (1) une activation des cellules bordantes en réponse à un stimulus chimiotactique, qui nettoient la surface de l'os du collagène non-minéralisé. Les pré-ostéoclastes migrent alors à la surface de l'os à remodeler. Ils vont se différencier en ostéoclastes et fusionner entre eux pour former les ostéoclastes matures, cellules géantes multinuclées. (2) Les ostéoclastes vont alors s'ancrer à la matrice osseuse grâce à leurs podosomes et via des intégrines, ce qui va provoquer la réorganisation du cytosquelette et la formation d'une zone de scellement. Les enzymes ostéolytiques vont alors se déverser au sein de cet espace confiné, permettant la résorption de la matrice osseuse. Les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} vont être libérés et se déverser dans la circulation sanguine. (3) A la fin de la résorption, les ostéoclastes se détachent et libèrent des signaux chimiotactiques pour la migration et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. Au site de résorption, les pré-ostéoblastes vont proliférer et se différencier en ostéoblastes. (4) Ils vont alors

synthétiser la nouvelle matrice osseuse. (5) A la fin de la phase de formation, les ostéoblastes qui ne sont pas entrés en apoptose vont se mettre en quiescence à la surface du tout nouvel os formé, constituant les cellules bordantes (Figure 7).

Si le cycle du remodelage osseux suit le même schéma (activation-résorption-formation), le processus de remodelage entre os trabéculaire et os cortical est tout de même légèrement différent. Dans l'os trabéculaire, le remodelage s'effectue à la surface des travées. Les ostéoclastes creusent une rigole, progressivement comblée derrière eux par les ostéoblastes. L'unité de remodelage est séparée de la moelle par une couche de cellules, la canopée, au contact direct d'un vaisseau sanguin qui pourrait servir de voie d'accès aux cellules progénitrices (Kristensen et al., 2014). Dans l'os cortical, les ostéoclastes forment des cônes de résorption qui creusent des tunnels au centre desquels circulent des vaisseaux sanguins. Ces tunnels sont par la suite refermés par les ostéoblastes en déposant l'os secondaire, lamellaire, qui va constituer les ostéons (Sims and Martin, 2014) (Figure 8).

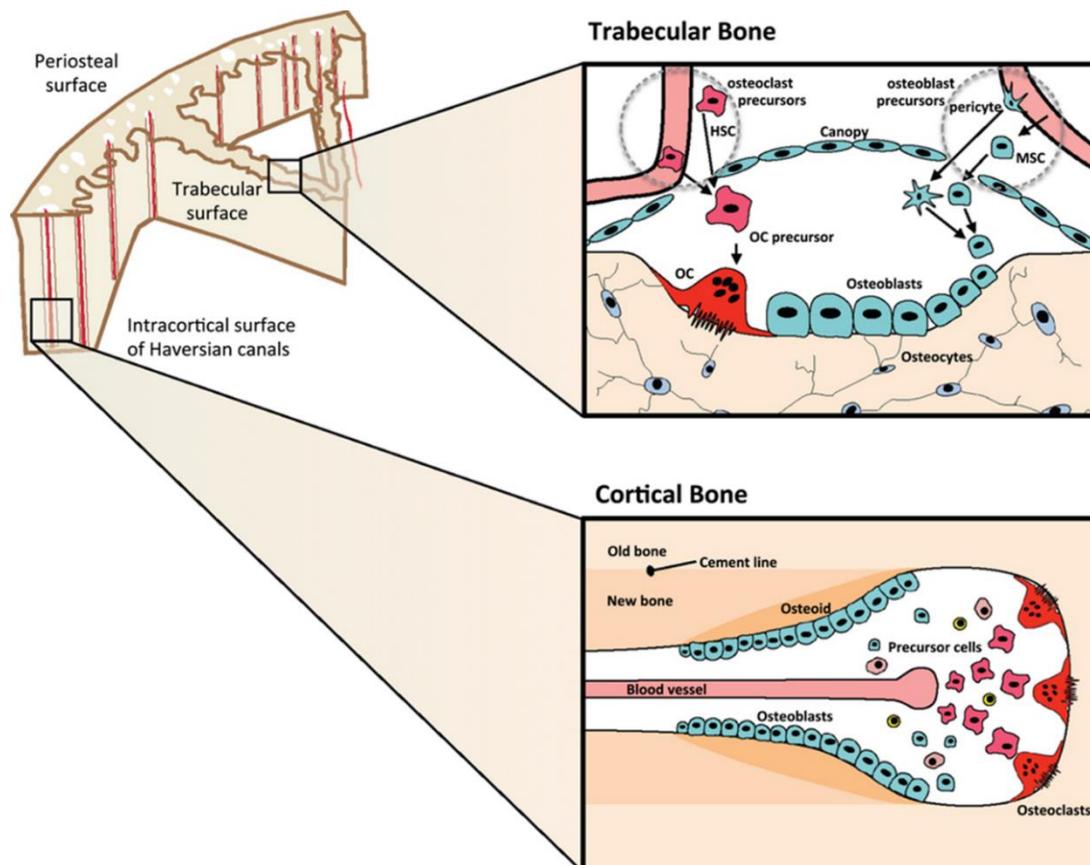


Figure 8 : Différences de remodelage osseux entre os trabéculaire et os cortical (Sims & Martin, 2014). Le remodelage osseux débute, dans l'os trabéculaire, sous la canopée formée par les cellules bordantes et, dans l'os cortical, permet la formation du canal de Havers.

IV. La matrice osseuse

La matrice extracellulaire osseuse est composée d'une phase organique et d'une phase minérale. Les proportions entre ces deux phases varient entre autres selon le sexe, l'âge et l'os d'intérêt (Boskey, 2013). La matrice extracellulaire osseuse est composée d'une phase organique (30% de la masse sèche totale) et d'une phase minérale (70% de la masse sèche totale) (Figure 9).

1. La phase organique

La phase organique de la matrice extracellulaire est essentiellement déposée par les ostéoblastes, sous forme d'ostéoïde. Elle est constituée de $\approx 90\%$ collagène de type I, $\approx 5\%$ de protéines non collagéniques (PNC), $\approx 2\%$ de lipides et d'eau. Les PNC constituent jusqu'à 15% de la matrice osseuse. Les constituants majeurs des PNC sont, entre autres, les membres de la famille des « Small Integrin-Binding Ligand N-glycosylated » (SIBLING) et les protéoglycanes. Les protéines de la phase organique de la MEC osseuse assurent à la fois des rôles structurels (en particulier le collagène) et fonctionnels (interactions cellulaires, piégeage/libération de facteurs de croissance, régulation de la minéralisation de la matrice, ...).

a. Le collagène de type I

La phase organique de la matrice osseuse est constituée de plus de 90% de collagène de type I, possédant une structure en triple hélice, formée de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Le collagène est constitué par des motifs répétés Glycine-X-Y, avec X étant souvent une proline et Y une hydroxyproline. Après synthèse par les cellules, les molécules de collagène, communément appelé tropocollagène, sont sécrétées hors de la cellule, minéralisés au niveau de leur extrémité (site de nucléation de l'HA) et vont fusionner en fibrilles (Dubey and Tomar, 2009). Ces fibrilles vont s'associer entre elles et former les fibres de collagène définitives, qui seront ensuite des sites de minéralisation matricielle.

La forte proportion de collagène de type I au sein du tissu osseux a plusieurs fonctions : donner à la fois de l'élasticité et de la résistance mécanique au tissu, stabiliser la MEC, permettre le dépôt de minéral ainsi que la liaison aux autres macromolécules.

b. La fibronectine

La fibronectine, bien qu'étant un constituant mineur de la matrice osseuse, est l'une des premières protéines synthétisées par les ostéoblastes. Elle précède le dépôt des fibres de collagène et assure le maintien de l'intégrité de la matrice collagénique. Les premières interactions entre cellule et MEC reposent également sur la liaison entre les intégrines et la fibronectine, et peuvent déclencher des réponses cellulaires spécifiques selon l'organisation du réseau matriciel (Sottile and Hocking, 2002) (voir **Partie III.1**).

c. Les protéines de la famille des SIBLING

Les « Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins » sont une famille de protéines comprenant la « dentine sialophosphoprotein » (DSPP), la « dentine matrix protein 1 » (DMP1), la « matrix extracellular glycoprophosphoprotein » (MEPE), l'ostéopontine (OPN/SPP1) et la BSP. Des études *in silico* ont montré que ces protéines avaient une origine commune, expliquant leur alignement et localisation dans la même région chromosomique (4q21 chez l'homme, 5qE5 chez la souris). De plus, des études phylogénétiques ont montré que ces protéines étaient apparues en même temps que l'ossification du squelette interne chez les poissons, indiquant un rôle important dans la minéralisation osseuse. Par exemple, l'ostéopontine, une protéine de la famille des SIBLING, joue un rôle dans la liaison des cristaux d'hydroxyapatite et est un régulateur négatif de la formation osseuse (Hunter et al., 1994).

d. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont une famille de macromolécules, composée d'un corps protéique auquel sont rattachés des glycosaminoglycanes (GAG), polysaccharides formés par la répétition d'unités disaccharides. Ces unités disaccharides sont constituées d'une hexosamine, N-acétylée ou N-sulfatée, et d'un ose (acide glucuronique, acide iduronic, galactose). Un GAG majeur de la MEC, l'acide hyaluronique, n'est pas un PG mais une chaîne de sucres libres, qui joue un rôle majeur de rétention d'eau et de facteurs actifs. Dans la matrice osseuse, les PG les plus abondants de la matrice osseuse sont le biglycan et la décorine, dont les chaînes sont des chondroïtine-sulfates.

Un rôle majeur des PG est de faciliter les interactions entre les différents composants de la MEC osseuse, principalement entre les fibres de collagène et la phase minérale au cours de la minéralisation osseuse. Ils ont également une fonction importante de stockage/régulation de l'action de facteurs de croissance. La décorine module la fibrillogenèse du collagène en se liant à la triple hélice de collagène, participant à leur arrangement et empêchant leur fusion entre elles, ce qui est fait un régulateur de la minéralisation (Mochida et al., 2009; Weber et al., 1996). Pour sa part, le biglycan se lie avec le collagène et stimule la voie de signalisation BMP/TGF β , activant ainsi la transcription de gènes responsables de la différenciation ostéoblastique (Nastase et al., 2012).

e. Les Gla-protéines

Les Gla-protéines sont des protéines contenant un domaine Gla, abréviation pour « Gamma-Carboxy Glutamic Acid », et dont les modifications post-traductionnelles (γ -carboxylation) sont médiées par la vitamine K. Bien que la γ -carboxylation soit un phénomène relativement ubiquitaire, il existe moins de 20 Gla-protéines référencées à l'heure actuelle, dont la majorité sont peu étudiées. L'une de ces Gla-protéines est retrouvée au niveau de l'os : l'ostéocalcine.

Synthétisée par les ostéoblastes matures, l'ostéocalcine, sous sa forme carboxylée, possède une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite, dû à son domaine Gla et à sa forte affinité pour le calcium. Sous sa forme décarboxylée, l'ostéocalcine perd cette affinité pour les ions calcium et agit, telle une hormone, sur d'autres tissus que l'os comme sur le pancréas en stimulant la production d'insuline par les cellules β ou sur les adipocytes en augmentant la quantité d'adiponectine produites par les adipocytes (Lee et al., 2007; Wei et al., 2014).

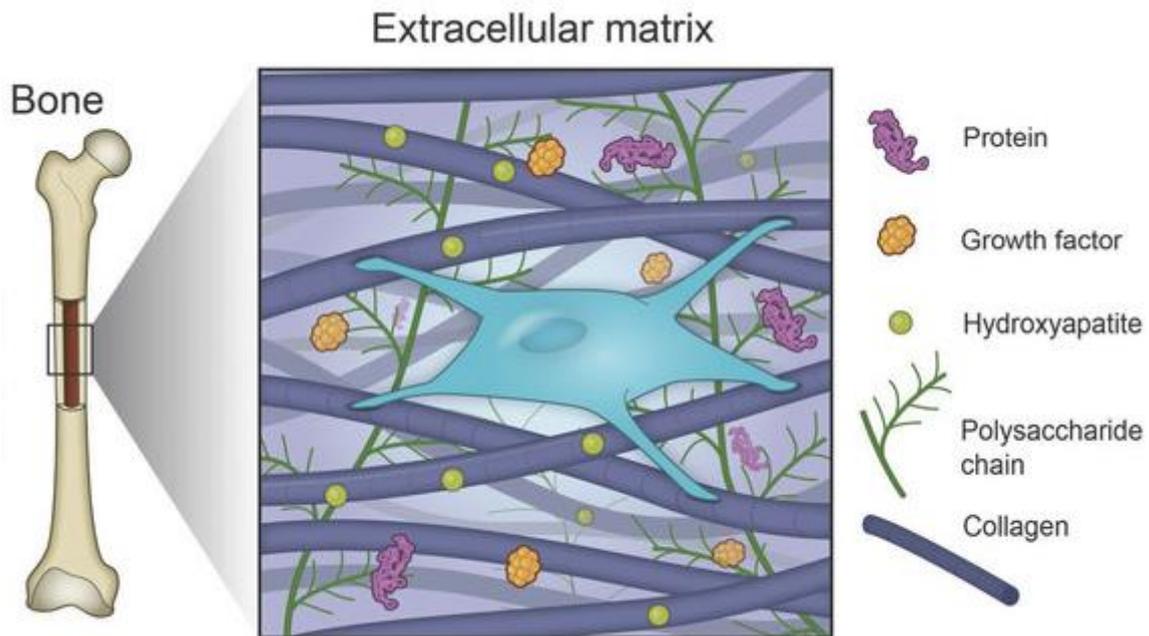


Figure 9 : La matrice extracellulaire osseuse (Gaharwar et al., 2015).

La MEC osseuse est constituée de nombreux éléments, comprenant des protéines, facteurs de croissance et minéraux. Ceux-ci influencent les cellules via des actions biologiques et physiques.

2. La phase minérale

La phase minérale osseuse est essentiellement constituée de phosphate de calcium polysubstitué dont la composition chimique est très proche de celle de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Elle constitue la réserve majeure de calcium (99%), de phosphore (85-90%) et de magnésium (50-60%) de l'organisme, assurant un rôle dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique.

Au cours de la formation osseuse, l'ostéoïde va être minéralisé par l'accumulation de phosphate de calcium, sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite, dont la nucléation est initiée sur les fibres de collagène et qui sont orientés dans le même sens que les fibres de collagène (Hadjidakis and Androulakis, 2006). Cet ajout de minéral aux fibres de collagène permet de renforcer la structure collagénique et contribue à la résistance mécanique. Ce processus permet la fabrication du matériau composite à la fois très résistant et relativement léger qu'est l'os.

B. Interactions entre les cellules osseuses et leur substrat : du tissu aux biomatériaux

I. Les substrats en ingénierie tissulaire osseuse

1. Les biocéramiques

Les céramiques à base de phosphate de calcium sont fortement utilisées en ingénierie osseuse en raison de leur biocompatibilité (non toxique vis-à-vis des cellules) et leur ostéoconduction (propriété passive d'un matériau à favoriser la formation d'un nouveau tissu osseux, en permettant son invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu hôte) mais surtout parce que leur composition chimique est relativement proche de la phase minérale de la MEC osseuse (Habraken et al., 2007).

Ces biocéramiques regroupent les biomatériaux fabriqués à partir d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) et/ou de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) ; les matériaux mixtes comportant à la fois de l'HA et du β -TCP constituent les phosphates de calcium biphasiques (BCP).

De nombreuses études ont montré que les phosphates de calcium influençaient *in vitro* et *in vivo* la prolifération et la différenciation des cellules, qu'elles soient de type osseux ou non (Douard et al., 2016; Rezwan et al., 2006; Viateau et al., 2016). Cependant, ces céramiques en phosphate de calcium ont une faible résistance aux compressions mécaniques, limitant leur utilisation en clinique aux os non porteurs (Oh et al., 2006). Leur biodégradabilité, relativement faible, peut être modulée par la modification des groupements chimiques : la substitution dans l'hydroxyapatite du groupement OH par un groupement carbonate (i.e. hydroxyapatite carbonatée) permet d'augmenter la dégradabilité de la céramique et de favoriser également sa bioactivité (Shepherd et al., 2012).

2. Les verres bioactifs

Les verres bioactifs sont des biomatériaux à base de silice (SiO_2) et contiennent en plus des quantités variables d'oxyde de sodium (Na_2O), d'oxyde de calcium (CaO) et de pentoxyde de phosphore (P_2O_5). Par exemple, la composition du Bioglass® 45S5,

le plus vieux bioverre mis au point, est de 45% de la masse totale SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO et 6% P₂O₅ (Hench, 2006)

Ces différentes espèces chimiques assurent au bioverre sa bioactivité (capacité à induire une activité biologique spécifique) et permettent, après implantation *in vivo* ou en culture *in vitro*, d'être recouverts par les minéraux du milieu environnant, aboutissant à la formation d'une couche de phosphate de calcium tout autour du matériau. Les bioverres ont pour avantage d'être biocompatibles, de stimuler l'ostéogénèse et la vascularisation (Handel et al., 2013; Tsigkou et al., 2007) mais leur faiblesse réside dans leur fragilité et faible résistance mécanique. Il est possible de modifier la composition des bioverres afin de contrôler la vitesse du dépôt et de dégradation des phosphates de calcium (Rahaman et al., 2011).

3. Les polymères

Les polymères, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, ont pour avantage d'être biocompatibles et biodégradables. Il est également possible de les utiliser pour délivrer les molécules bioactives de manière locale, telles que des BMPs, le « Vascular endothelial growth factor » (VEGF) et autres facteurs de croissance (Barati et al., 2016; Gothard et al., 2014; Tong et al., 2016).

En ingénierie tissulaire osseuse, les polymères synthétiques communément utilisés sont l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) et le polycaprolactone (PCL). Quant aux polymères naturels, il s'agit de composants de matrice extracellulaire qui peuvent être divisés en deux sous-groupes : les protéines (collagène, soie, fibrine) et les polysaccharides (acide hyaluronique, chitosan, alginate) (Lichte et al., 2011).

Les polymères d'origine synthétique ont une forte capacité de résilience, et leur dégradation peut être contrôlée par leur procédé de fabrication, en modulant par exemple les proportions de chaque polymère utilisé ou en faisant varier la quantité d'agent porogène (Rezwan et al., 2006). La dégradation de certains polymères comme le PLA et le PGA crée une acidification de l'environnement local, dont il faut tenir compte dans les réponses cellulaires.

Il est possible d'ajouter aux polymères des phosphates de calcium (HA, β -TCP, BCP) afin d'améliorer les propriétés mécaniques du biomatériau et de se rapprocher de la phase minérale de la matrice extracellulaire osseuse (Fricain et al., 2013).

4. Les biomatériaux métalliques

En ingénierie tissulaire osseuse, les métaux fréquemment utilisés sont le titane (Ti) et le tantale (Ta). Ces métaux ont une grande résistance aux forces mécaniques ainsi qu'une bonne biocompatibilité et ostéoconductivité (Balla et al., 2010; Dabrowski et al., 2010; Xue et al., 2007). Pour ces raisons, les biomatériaux métalliques, et particulièrement ceux en titane, sont très fréquemment employés en chirurgie (e.g. prothèse de hanche, plaque de fixation) et en odontologie (e.g. implants dentaires). Des études sur des matériaux en titane ont montrées que des modifications de la surface permettaient de favoriser l'ostéoconductivité de ces matériaux (Das et al., 2008; Dumas et al., 2015). Cependant, contrairement aux biocéramiques et aux polymères, les biomatériaux métalliques ne sont pas dégradables et ne peuvent donc pas être réellement intégré au tissu. De plus, il se pose également de la question du relargage des ions Ti^{2+} dans l'organisme, bien qu'aucune toxicité n'ait été démontrée à ce jour.

II. De l'importance de la géométrie : les différentes échelles de la structure osseuse

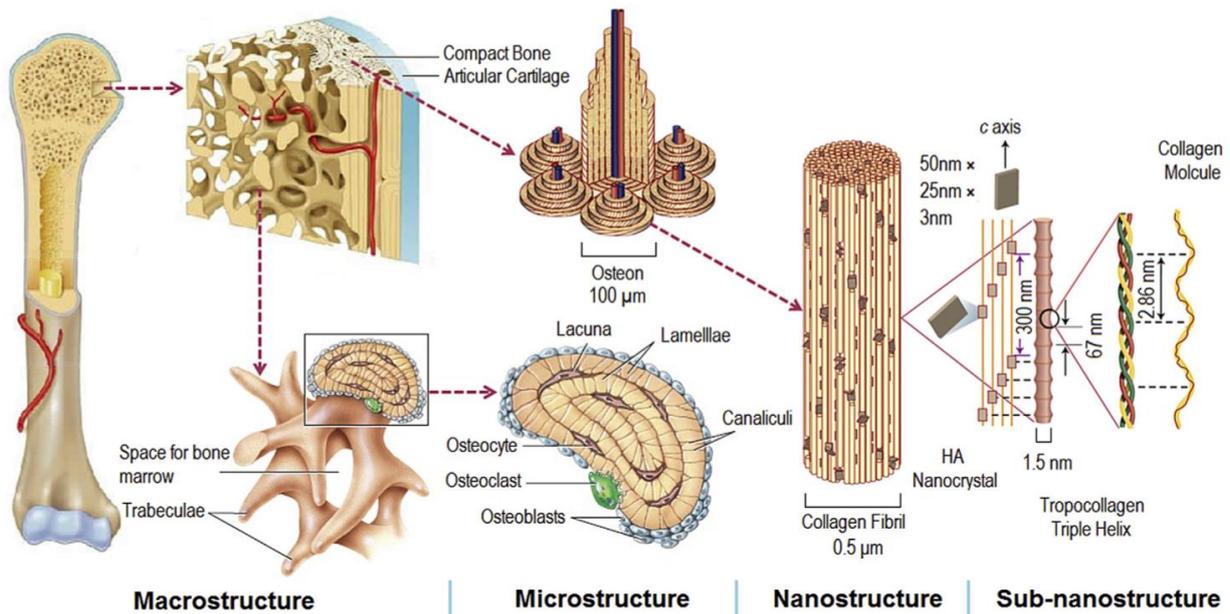


Figure 10 : Organisation hiérarchique du tissu osseux (Wang et al., 2013).

L'échelle sub-nanométrique (<1 nm) correspond à la triple hélice de collagène, qui s'auto-assemble en tropocollagène. L'échelle nanométrique, comprise entre 1 et 100 nm, est constituée des molécules des fibrilles de collagène, résultant de l'assemblage du tropocollagène. L'échelle micrométrique (<100 µm) correspond à l'organisation de ces fibrilles en lamelles déposées par les ostéoblastes, au sein de structures de type ostéon. Les ostéons et lamelles osseuses forment les structures globales de l'organe osseux, l'os cortical et les trabécules (échelle macrométrique, >100 µm).

L'os est organisé de façon hiérarchique et comprend des échelles macro-, micro-, nano- et sub-nanométriques (Figure 10). Chaque niveau a des fonctions mécaniques, biologiques et chimiques qui lui est propre. Les propriétés mécaniques ainsi que l'architecture d'une structure à une échelle donnée dépendent des propriétés du matériau à l'échelle inférieure. Par exemple, les propriétés mécaniques des microstructures (ostéon) dépendent des propriétés constitutives des fibres de collagènes minéralisées et de leur arrangement à l'échelle nanométrique.

1. Echelle nanométrique

L'échelle nanométrique comprend des structures allant de 10 nm à 1 µm.

a. In vivo

Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) sont composées de nombreuses structures nanométriques, qui vont contribuer aux interactions cellule-matrice, sous la

forme de protéines matricielles. C'est le cas, par exemple du collagène, dont les molécules mesurent 300 nm de long et 1,5 nm de large ; elles vont s'auto-assembler en fibrille de collagène pour former des structures de plus grande échelle (0,5 µm de diamètre, Figure 10).

Les cellules peuvent interagir avec la MEC de nombreuses manières, parmi lesquelles un phénomène connu sous le nom d'orientation de contact (« contact guidance »). Ce phénomène caractérise le fait que les cellules ajustent leur orientation et leur alignement en fonction du support sur lequel elles sont cultivées, ce qui en fait un facteur essentiel dans la régulation de la migration cellulaire. En ingénierie tissulaire, l'orientation de contact peut être utilisée pour la construction de tissus orientés, tels que les nerfs ou les tendons, mais également pour contrôler les réponses cellulaires par l'ajout de motifs spécifiques (Nguyen et al., 2016; Persidis, 1999).

b. In vitro

Grâce aux avancées technologiques des dernières années, telles que l'électrofilage (« electrospinning »), la nano-texturisation de surface par laser femtoseconde ou la photolithographie, de nombreuses études sur l'influence de la nano-architecture sur le comportement cellulaire ont été réalisées.

Il a été démontré que les cellules étaient capables de « sentir » des structures de l'ordre de que 10 nm (Dalby et al., 2004). Il est d'ailleurs possible que les cellules puissent être capables de réagir à des structures encore plus petites mais les outils actuels ne permettent pas de contrôler la topographie à ces échelles.

Des cellules cultivées sur des structures présentant des sillons nanométriques (5-350 nm de profondeur et 20-1000 nm de largeur) s'orientent parallèlement aux sillons (Loesberg et al., 2007). Une texturisation de surface avec des nano-creux (« nanopits ») limite l'étalement des cellules mais stimule l'expression de gènes ostéoblastiques (Biggs et al., 2007; Dumas et al., 2015). Il a d'ailleurs été montré que des nano-creux de 75 nm stimulaient la synthèse de MEC par les ostéoblastes ainsi qu'une expression accrue des gènes des marqueurs ostéoblastiques BSP et OCN (Lamers et al., 2010). Les nano-colonnes (« nano-pillars ») diminuent également l'adhésion des cellules mais influencent l'orientation cellulaire selon la distribution des colonnes à la surface du substrat (Figure 11).

D'autres structures nanométriques ont également prouvé leurs capacités à stimuler l'expression des gènes ostéoblastiques. Des cellules souches squelettiques cultivées

sur des nanotubes de diamètre supérieur à 30 nm -dans l'étude de Brammer et al. compris entre 70 et 100 nm- expriment ainsi en plus grande quantité la PAL, Osx et Coll (Brammer et al., 2011).

Alors que la nano-topographie affecte plutôt l'adhésion et l'organisation du cytosquelette, la microstructure influence d'autres comportements cellulaires.

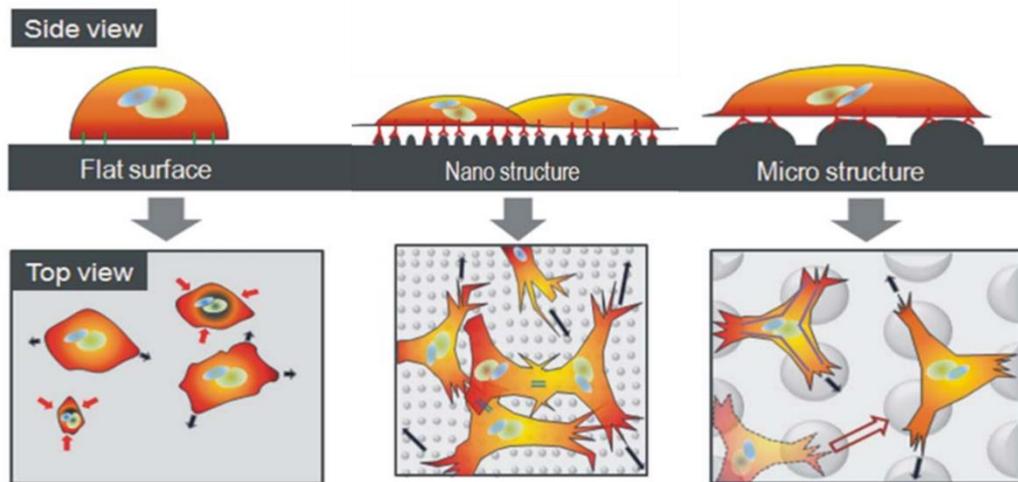


Figure 11 : Schéma de l'impact des différentes structures (sur une surface plane et à des échelles nano-et micrométriques) sur le comportement cellulaire (Jeon et al., 2014).

Sur une surface plane, les cellules ne trouvent pas de point d'ancrage et ne s'étalent que légèrement sur le substrat. La présence de nanostructures permet un bon étalement et alignement des cellules, alors que des cellules cultivées sur un support microstructuré forment des ponts entre les microstructures et ont une plus grande capacité de migration.

2. Echelle micrométrique

L'échelle micrométrique est comprise entre 1 et 100 μm ; les structures de cette échelle permettent le contrôle des relations entre cellules.

a. In vivo

La matrice extracellulaire est composée de protéines et de polysaccharides, formant des structures situées à la fois dans l'échelle nano- et micrométrique. Ces composants (collagène, glycosaminoglycanes, ...) vont en effet s'assembler via des ponts disulfures, des liaisons hydrophobes et ioniques et former des structures supramoléculaires de taille micrométrique. Ces assemblages influencent directement les propriétés du tissu, apportant ses caractéristiques mécaniques de la microarchitecture osseuse.

A l'âge adulte et chez l'être humain, l'os est caractérisé par une organisation lamellaire. Les fibres de collagène, synthétisées par les ostéoblastes, vont s'aligner et constituer une lamelle d'une épaisseur de 3 à 20 μm . Les lamelles successives, dans lesquelles

les fibres de collagène ont des orientations différentes les unes des autres, vont se superposer, aboutissant à l'enfermement des ostéoblastes au sein de la matrice osseuse (voir **Partie A.II**). Ainsi, les ostéons peuvent être considérés comme des structures à mi-chemin entre l'échelle micro et macrométrique, compris entre 10 et 500 μm de diamètre.

b. *In vitro*

Tout comme à l'échelle nanométrique, grâce au phénomène d'orientation de contact, les cellules sont capables de s'aligner le long de sillons micrométriques (Holthaus et al., 2012). De plus, une surface quadrillée favoriserait la migration cellulaire, qui peut être orientée via le motif de quadrillage utilisé pour texturiser la surface (Jeon et al., 2010). Cependant, des sillons de 5 μm de profondeur organisés de façon radiale ont démontré un recrutement des ostéoblastes beaucoup plus élevé que des sillons organisés parallèlement. Après implantation dans des défauts osseux de calvaria, les biomatériaux à sillons radiaux permettaient une régénération osseuse supérieure aux biomatériaux nus ou à sillons parallèles (Yoon et al., 2016). Il est également intéressant de noter que plus les sillons sont larges (30 μm vs 10 μm), plus les cellules (primaires de calvaria de rat) maintiennent des contacts entre elles via les jonctions communicantes (connexine-43) et sont à un stade de différenciation avancé (Kirmizidis and Birch, 2009). La présence de micro-sillons de 2 à 4 μm de largeur permettent également d'accroître les niveaux d'expression de la PAL et Runx2 au sein de culture de cellules de type MC3T3-E1, comparés à des substrats plats (Cha et al., 2012).

3. *Echelle macrométrique*

L'échelle macrométrique représente les échelles supérieures à 100 μm , qui donnent sa forme globale à l'organe.

a. *In vivo*

A l'échelle macrométrique, les os sont composés de deux différentes structures : l'os cortical et l'os trabéculaire. Comme détaillé ci-dessus, l'os cortical est une structure dense, en périphérie des os alors que l'os trabéculaire, à l'intérieur des os, est constitué d'un réseau tridimensionnel de travées et où se loge la moelle osseuse. L'orientation et le nombre de ces travées varient selon le site anatomique et les contraintes mécaniques appliqués au tissu osseux (voir **Partie A.II**).

b. In vitro

En ingénierie tissulaire, l'échelle macroscopique influence de nombreux facteurs, dont l'infiltration cellulaire, la croissance tissulaire, la réponse inflammatoire et les propriétés mécaniques des biomatériaux. Au sein de rigoles dont la largeur peut être comprise entre 200 à 500 μm , le comportement des cellules varie selon l'importance de celle-ci. Si, dans les plus petites rigoles (200 et 300 μm de large), les cellules s'orientent parallèlement à la longueur du pore, dans les pores plus larges, les cellules ne semblent plus soumis au phénomène de « contact guidance » et sont orientées de manière aléatoire (Knychala et al., 2013).

L'organisation de ces structures, et particulièrement leur géométrie, influence également le comportement cellulaire.

Porosité et taille des pores

La porosité et la taille des pores des biomatériaux ont un rôle très important dans la formation osseuse *in vitro* et *in vivo*.

La porosité est définie comme étant le pourcentage d'espace libre (pore) dans un matériau solide. La porosité a un impact direct sur les propriétés mécaniques, telles que la résistance à la compression. Ainsi, plus la porosité d'un matériau est importante, plus les propriétés mécaniques diminuent.

Les pores sont nécessaires à la formation osseuse parce qu'ils permettent la migration et la croissance des cellules. En ingénierie tissulaire osseuse, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer quelle pourrait être la taille de pore idéale pour favoriser l'activité des ostéoblastes. La taille des pores d'un biomatériau devrait être d'au moins 100 μm de diamètre, afin de permettre la diffusion optimale des nutriments et les échanges gazeux pour maintenir la viabilité cellulaire (Rouwkema et al., 2008). Il a été démontré que les ostéoblastes avaient tendance à coloniser préférentiellement les pores de faible diamètre (40 μm), mais que les pores plus larges (100 μm) favorisaient la migration cellulaire (Akay et al., 2004). D'après Kuboki *et al.*, des pores d'une taille supérieure à 300 μm permettent d'obtenir à la fois une colonisation et une prolifération cellulaires idéales, ainsi qu'une différenciation ostéoblastique accrue (Kuboki et al., 2001). Paradoxalement, des pores dont la taille est comprise entre 200 et 350 μm permettent la bonne croissance du tissu osseux selon (Murphy et al., 2010) mais il a également été montré que des pores compris entre 10 et 100 μm stimulent le dépôt de matrice extracellulaire et d'ostéoïde (Karageorgiou and Kaplan, 2005). De

plus, il a également été observé *in vivo* qu'une bonne vascularisation des biomatériaux ne se produisait que dans des structures de plus de 300 μm de diamètre (Kuboki et al., 2001; Murphy et al., 2010). Il convient tout de même de noter que la rapidité à laquelle les cellules se différencient en cellules ostéoblastique est influencée par le biomatériau (composition chimique, porosité) mais aussi le type cellulaire (des cellules souches exprimeront plus tardivement la PAL par rapport à des cellules de la lignée MC3T3-E1) (Oh et al., 2010).

En raison de ces nombreuses contradictions, il est difficile d'affirmer qu'il existe une taille de pores optimale (Murphy et al., 2010). De plus, la majorité de ces études a été réalisée en utilisant des techniques (agent porogène, lyophilisation, séparation de phase, ...) ne permettant pas de maîtriser de façon précise la porosité, la taille et la forme des pores des biomatériaux. Le développement des procédés de fabrication additive, communément appelé impression 3D, ces dernières années permet aujourd'hui la standardisation de la fabrication de biomatériaux, leur personnalisation ainsi qu'une reproductibilité importante (Charbonnier et al., 2016a).

Géométrie locale

Si, comme décrit ci-dessus, l'influence de la topographie sur le comportement cellulaire à des échelles nano et micrométrique a été très étudiée, elle reste néanmoins peu explorée au sein de structures macrométriques. C'est pourquoi nous nous intéresserons plus particulièrement à l'influence de la forme du substrat à une échelle macrométrique, supérieure à 100 μm . Afin de comparer des structures de géométries différentes (e.g. cercle vs triangle), la notion de courbure/fermeture est régulièrement utilisée car elle permet de s'abolir de ce paramètre géométrique. Bien que le degré de courbure et de fermeture représente la même notion, la courbure s'emploie plus volontiers dans le cadre de modélisation mathématique et le degré de fermeture du substrat correspond à une notion biologiquement plus parlante. Afin d'éviter toute confusion, seul le terme de courbure sera employé ci-dessous.

La courbure locale k_i en un point i correspond à l'inverse du rayon de cercle inscrit passant par ce point ainsi que par les deux points voisins ($i-1$) et ($i+1$) (Rumpler et al., 2008).

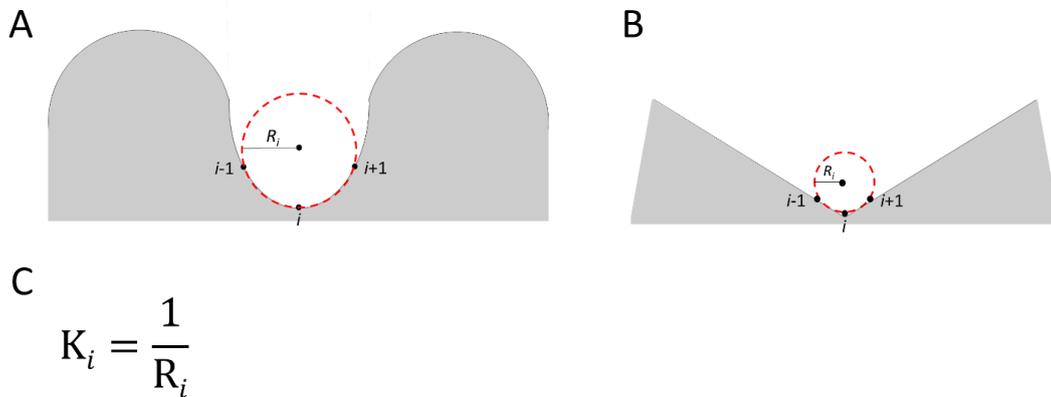


Figure 12 : Relation entre courbure et géométrie.

Le cercle inscrit, de rayon R_i , passe par i et ses points voisins ($i-1$) et ($i+1$) et est représenté ici (A) dans un sillon semi-circulaire et (B) dans un sillon triangulaire. (C) La courbure locale du substrat K_i est inversement proportionnelle au rayon R_i du cercle inscrit.

La courbure du substrat joue un rôle dans l'orientation et le contrôle du comportement cellulaire. La géométrie des pores de taille supérieure à $100 \mu\text{m}$ est capable de moduler la croissance tissulaire et l'organisation des cellules entre elles. Il a été démontré que les cellules étaient capables de répondre à des structures bien plus grandes qu'elles, et notamment à leur rayon de courbure. Au sein de matériaux à pores de courbure croissante et donc à géométrie locale de plus en plus étroite (circulaire > hexagonale > carrée > triangulaire), une étude a établi que la formation tissulaire débutait dans les coins des pores et qu'au fur et à mesure que la culture avançait, la couche tissulaire supérieure prenait une forme arrondie (Rumpler et al., 2008) (Figure 13).

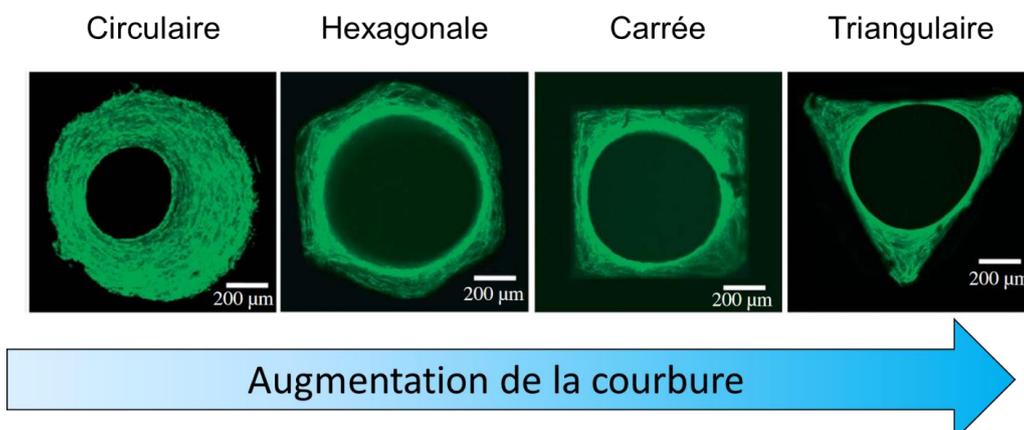


Figure 13 : Croissance tissulaire au sein de matériaux à architecture contrôlée (adapté de Rumpler et al., 2008). Marquage des fibres de stress d'actine après 21 jours de culture dans les pores hexagonaux, carrés et triangulaires et après 30 jours dans les pores circulaires, de cellules de lignée MC3T3-E1 en plaque de culture.

Une courbure élevée du substrat (e.g. triangle) provoquerait un stress mécanique local, auquel les cellules répondraient par la formation de fibres de stress d'actine. De ces observations, Bidan et al., en 2013, ont développé un modèle mathématique afin de décrire le taux de croissance tissulaire en fonction de la géométrie du pore. Selon ce modèle, appelé « chord model », les cellules forment des points d'ancrage sur la courbure, permettant la création de cordes d'actine et générant un stress mécanique local auquel les cellules vont répondre en synthétisant de la MEC (Bidan et al., 2013; Gamsjäger et al., 2013).

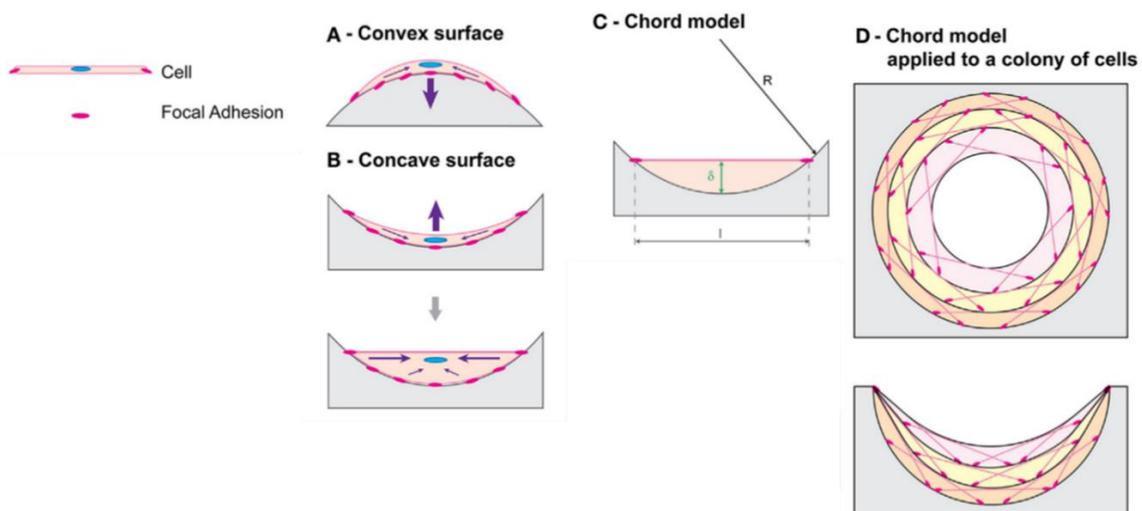


Figure 14 : Le « chord model » (Bidan et al., 2012).

Des forces de tension (indiquées par les flèches violettes) sont exercées sur les cellules selon (A) un substrat convexe ou (B) un substrat concave. (C) L'épaisseur de la couche cellulaire δ est proportionnelle à la courbure du substrat, avec la cellule formant une corde l (en rose). (D) Les cordes cellulaires se combinent entre elles au cours de la croissance tissulaire.

La courbure jouerait également un rôle dans l'organisation et l'orientation des fibres de collagène, affectant la structure tissulaire (Engelmayr et al., 2006). Des biomatériaux texturisés ont montré l'influence de la courbure sur la formation osseuse. Sur des céramiques en phosphate de calcium, le dépôt de calcium débute préférentiellement au niveau des concavités, comparé à une surface plane (Bianchi et al., 2014). Urquia Edreira et al. ont observé que des concavités de petit diamètre (400 μm) augmentent la croissance de cellules stromales issues de tissu adipeux (AT-MSC), par rapport à des diamètres de 800 et 1800 μm et à une surface plane. De plus, l'expression du gène de l'ostéocalcine est augmentée dans les concavités de 440 μm , pouvant indiquer une différenciation plus rapide en cellules osseuses (Urquia Edreira

et al., 2016). Des études *in vivo* ont confirmé ces observations. Ripamonti et al. ont découvert que des concavités (diamètre de 800 à 1600 μm , profondeur de 400 à 800 μm), structures semblables à des héli-ostéons, à la surface de biomatériaux en titane étaient capables de stimuler la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques en l'absence de facteurs ostéogéniques (Ripamonti et al., 2012). Plus récemment, une étude a montré que des implants en titane texturisés avec des surfaces concaves favorisaient la formation osseuse, contrairement à des surfaces convexes (Scarano et al., 2014).

III. Interactions cellules-matériaux

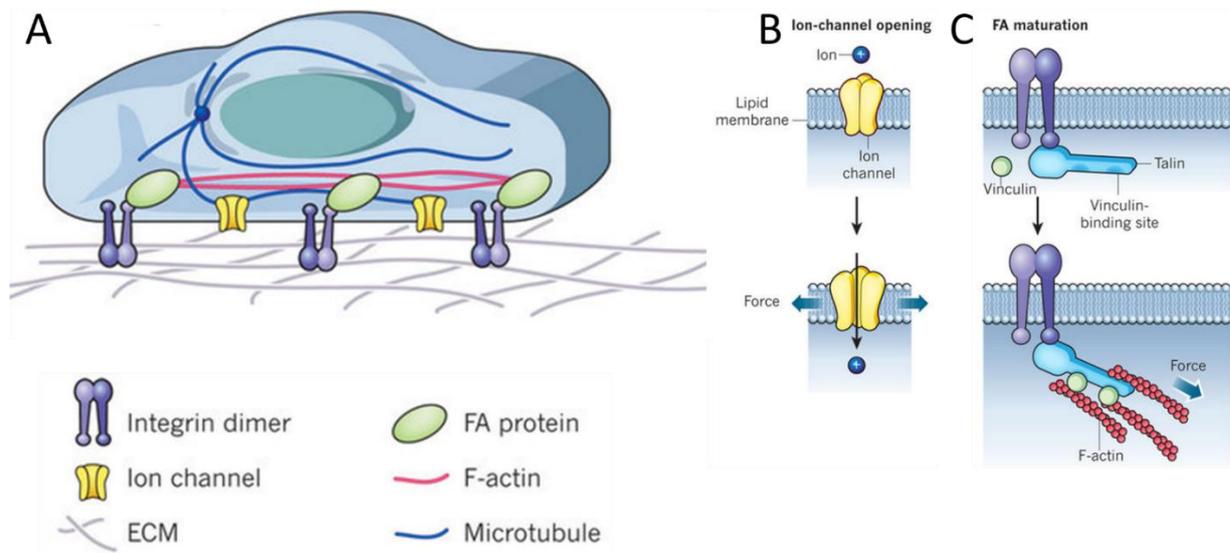
Comme décrit ci-dessus, les cellules sont capables de réagir aux différentes échelles de leur substrat grâce à un mécanisme bien particulier : la mécanotransduction.

La mécanotransduction est le mécanisme par lequel les cellules réagissent à un stimulus mécanique en convertissant celui-ci en signal biochimique, provoquant des réponses cellulaires spécifiques (Figure 15). Ce processus inclut toutes les composantes de la cellule, depuis la membrane cytoplasmique jusqu'au noyau cellulaire.

1. La mécanotransduction : généralités

Les cellules interagissent mécaniquement avec les structures environnantes, grâce aux intégrines et aux protéines des contacts focaux. Les microtubules, les canaux ioniques et les fibres d'actine sont également impliqués dans le mécanisme de mécanotransduction. Les molécules principales impliquées dans la mécanosensibilité sont les intégrines, qui reconnaissent les motifs RGD présents sur un grand nombre de protéines matricielles, telles que la fibronectine ou le collagène (Figure 15A). En réponse à une contrainte mécanique, plusieurs mécanismes cellulaires entrent en jeu. Tout d'abord, des canaux ioniques présents au niveau de la membrane plasmique de la plupart des cellules, dont les ostéoblastes, vont s'ouvrir et provoquer un influx d'ions Ca^{2+} (« stretch-activated channels », Figure 15B). Cette dépolarisation cellulaire déclenche les voies de signalisation Ca^{2+} dépendantes, dont l'activation des kinases au niveau des contacts focaux (Chen et al., 2000). D'autre part, les intégrines recrutent un complexe protéique comprenant des protéines adaptatrices (e.g. la taline, la vinculine, la paxilline), des kinases (e.g. les « focal adhesion kinase » (FAK)) et des

éléments du cytosquelette (e.g. actine) (Figure 15C). Cela déclenche l'activation de la voie de signalisation des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) et la transmission du signal au noyau, régulant l'apoptose, la différenciation et la survie cellulaires.



2. Les fibres de stress

Comme décrit ci-dessus, les éléments du cytosquelette interagissent avec la matrice extracellulaire via les contacts focaux (Figure 15C). Sous l'effet d'un stimulus mécanique, comme par exemple une rugosité du substrat, les cellules vont répondre à celui-ci par la fabrication de fibres de stress (Hirata et al., 2007). Il est intéressant de noter que les fibres de stress ne sont que très peu observées *in vivo* et sont parfois considérées comme des artefacts issus de la culture cellulaire *in vitro*, conséquences d'un passage d'environnement 3D à 2D.

a. Structure

L'unité de base des fibres de stress est l'actine, une protéine de ≈ 45 kDa, dont la structure en double hélice constitue le filament d'actine. Au cours de la création des fibres de stress, 10 à 30 filaments d'actine, parallèles les uns aux autres, sont assemblés et maintenus ensemble par l' α -actinine. D'autres protéines participent à la

stabilisation des filaments d'actine : la filamine, la fimbrine et la fascine. Ces fibres constituent les principaux éléments contractiles de la cellule. Les filaments d'actine sont en effet accompagnés de leur protéine motrice associée, la myosine II non musculaire (NMMII). Cet ensemble constitue le complexe « actomyosine », permettant la contractilité cellulaire, nécessaire dans la migration, l'adhésion et l'adaptation morphologique des cellules non musculaires. La distribution de l' α -actinine et de la myosine sur les filaments d'actine est périodique, ressemblant à des sarcomères. Cependant, contrairement aux fibres musculaires, les fibres de stress sont contractées en permanence mais de manière hétérogène. En effet, la répartition de NMMII et d' α -actinine n'est pas homogène sur toute la longueur des fibres (plus concentrées au centre par rapport aux extrémités), provoquant un étirement plus important au centre par rapport aux extrémités des fibres de stress (Peterson et al., 2004).

b. La signalisation intracellulaire

La formation des fibres de stress est régulée par la famille des RhoGTPases, petites protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique en réponse aux signaux mécaniques extracellulaires. De tous les membres de cette famille, RhoA est celui qui intervient le plus dans la formation des fibres de stress (Pritchard et al., 2004). Après, par exemple, la liaison d'un contact focal avec une intégrine, RhoA se lie à un GTP et active les Rho-associated coiled-coil forming kinases (ROCK) ainsi que la formine mDia/DRF1 (Figure 16).

Comme toutes les formines, mDia est impliquée dans la régulation du cytosquelette, et plus particulièrement dans la polymérisation de l'actine. L'activation de mDia permet d'accroître l'alignement parallèle des fibres d'actine et d'accentuer la polymérisation de l'actine (Tominaga et al., 2000).

ROCK a plusieurs cibles. Tout d'abord, il phosphoryle la chaîne légère de la NMMII (MLC) ainsi que la phosphatase de cette dernière (MLCP), ce qui inhibe la MLCP et entraîne une stimulation de l'activité de NMMII. La myosine va alors se lier aux filaments d'actine préalablement polymérisés par mDia et permettre ainsi la formation des fibres de stress (Kimura et al., 1996). Parallèlement, ROCK active la kinase LIM, qui va alors inactiver la cofiline/ADF, responsable de la dépolymérisation des filaments d'actine. ROCK permet donc indirectement une augmentation du nombre de filaments d'actine disponibles au sein de la cellule (Carlier et al., 1997).

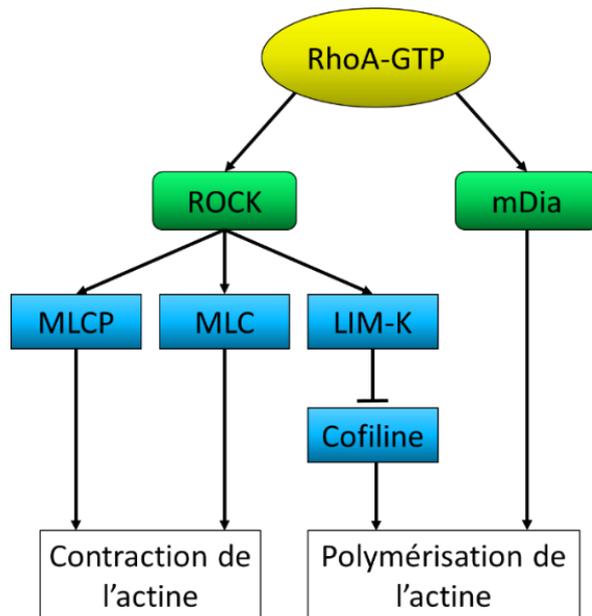


Figure 16 : Voie de signalisation de RhoA, impliquée dans la formation des fibres de stress

c. Rôles dans la mécanotransduction

La tension mécanique générée par les fibres de stress est transmise au noyau cellulaire via les protéines de la famille de la nestine, situées au niveau de la membrane nucléaire externe (Figure 17). Ces protéines assurent la liaison entre les filaments d'actine et les protéines situées sur la face interne de la membrane nucléaire, telles que la lamine A, la titine ou les protéines Klarsicht/ANC-1/Syne-1/Sad1/UNC-84 (KASH/SUN). Ces interactions se traduisent par une déformation nucléaire, une recombinaison de la chromatine, une augmentation du transport nucléo-cytoplasmique des ARNm et une modification de l'expression génique via l'activation de facteurs de transcription (Wang et al., 2009).

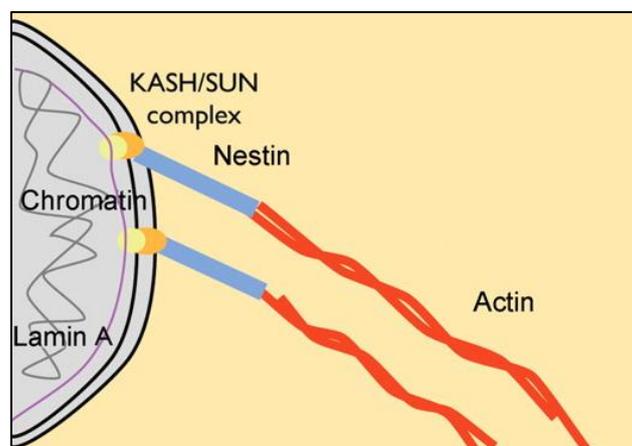


Figure 17 : Transmission du stress mécanique au noyau (Liu, 2012).

Les fibres d'actine se lient à la nestine, qui est directement au contact du complexe KASH/SUN, localisé dans le noyau cellulaire. Cette interaction provoque une modification de la structure de la chromatine et des lamines, induisant une déformation de la forme du noyau et la modification du spectre d'expression génique.

3. Rigidité du substrat

Les propriétés mécaniques de la MEC peuvent être modulées par les cellules elles-mêmes : par exemple la sécrétion de protéases permet d'obtenir une MEC plus poreuse et lâche, alors que la synthèse de collagène renforce la structure matricielle. Selon le type cellulaire, la rigidité du substrat peut varier et provoquer d'autres interactions mécaniques cellule-MEC, régulant ainsi des processus cellulaires comme l'attachement, la migration et la différenciation cellulaire (Brown and Discher, 2009). La rigidité du substrat est caractérisée par le module d'Young (E), défini comme la relation de proportionnalité entre la force appliquée sur une surface (σ) et la déformation d'un matériau (ϵ). Ainsi, plus un matériau est élastique, plus E est faible, et au contraire, plus un matériau est rigide donc peu déformable, plus E est élevé (Figure 18).

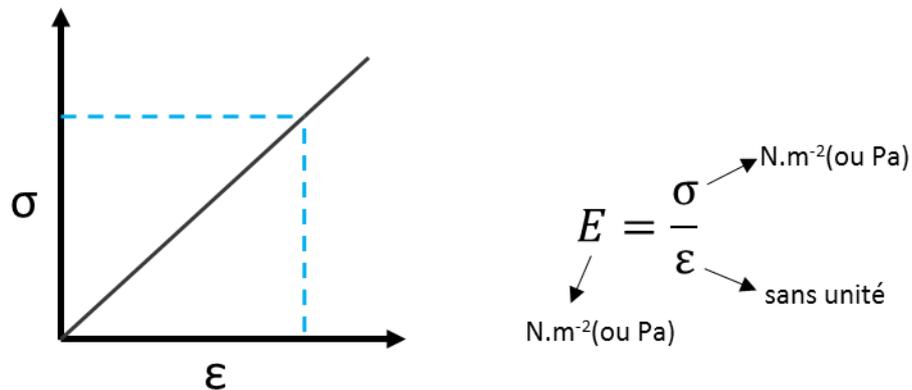


Figure 18 : Définition du module d'Young.

Un substrat mou ($E \approx 1$ kPa) favorise la différenciation des cellules souches en cellules neuronales, une élasticité intermédiaire ($E \approx 15$ kPa) induit plutôt une différenciation en cellules musculaires et un substrat dur ($E \approx 35$ kPa) favorise une différenciation ostéogénique (Engler et al., 2006; Halder et al., 2012). Il est important de noter qu'*in vitro* les cellules sont cultivées sur des boîtes de culture, fabriquées en plastique ou en verre, dont le module d'Young est bien plus élevé que n'importe quel tissu du corps humain ($E \approx 10^6$ kPa) (Figure 19).

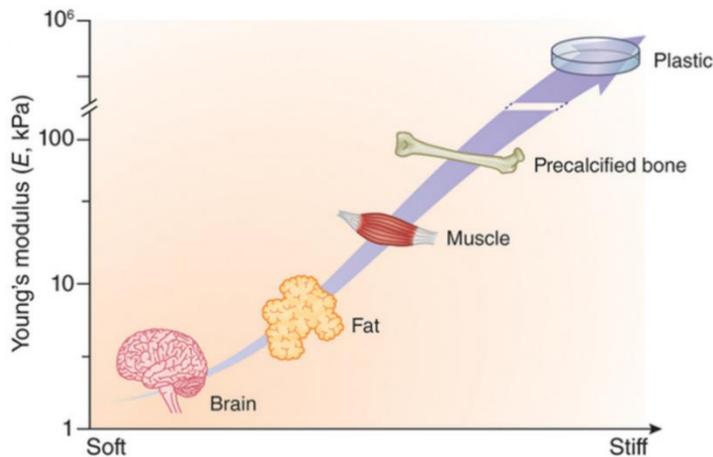


Figure 19 : Propriétés élastiques des tissus, caractérisées par le module d'Young (Blau et al., 2015).

Le module d'Young (E) représente la déformation élastique d'un matériau et est proportionnel à la force nécessaire pour obtenir une déformation de ce matériau.

La réponse à la rigidité du substrat implique la protéine nucléaire « Yes-associated protein » (YAP) et son coactivateur TAZ. Leur fonction est finement régulée par les Rho GTPases et l'état de stress mécanique du cytosquelette (actine) (Aragona et al., 2013). En effet, des cellules cultivées sur un substrat dur expriment de nombreuses fibres de stress, bien visibles et organisées, qui vont permettre la translocation de YAP au noyau. Au contraire, sur un substrat mou, ces fibres sont relativement fines, peu discernables et orientées de manière totalement aléatoire, YAP restant alors piégé dans le cytoplasme (Figure 20) (Dupont et al., 2011; Pelham and Wang, 1997).

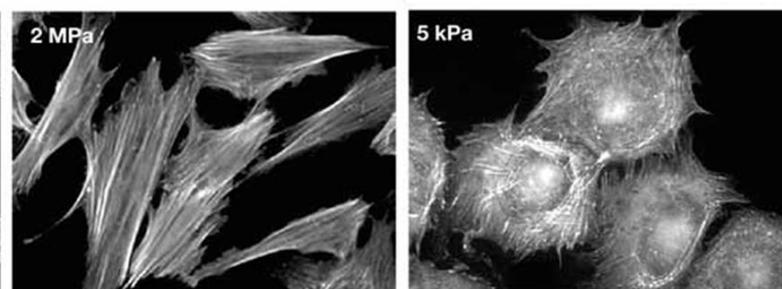


Figure 20 : Influence de la rigidité du substrat sur les fibres de stress (Prager-Khoutorsky et al., 2011). Les fibres de stress sont plus importantes chez des fibroblastes cultivés sur un gel de polydiméthylsiloxane (PDMS) dur (2MPa), que dans les mêmes cellules cultivées sur un substrat mou (5 kPa). Les fibroblastesensemencés sur le substrat dur ont des fibres de stress bien visibles et parallèles les unes aux autres alors que les fibres de stress des cellulesensemencées sur les substrats mous sont beaucoup plus fines et aléatoirement organisées.

Les propriétés mécaniques du microenvironnement sont donc capables d'influencer les réponses biologiques et la formation osseuse, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En comprenant et en agissant sur les mécanismes impliqués, il est donc possible d'orienter le comportement des cellules, comme par exemple, en stimulant le dépôt de MEC ou la différenciation ostéoblastique.

C. Les autres acteurs de l'ingénierie tissulaire osseuse

I. Le type cellulaire : comment bien le choisir ?

Dans le domaine de la biologie osseuse, les cellules utilisées dans les études *in vitro* sont soit des cellules dites de lignée, soit des cellules primaires isolées à partir d'un tissu. Dans les deux cas, les cellules peuvent être à des stades plus ou moins différenciés, allant de la pseudo « cellule souche » à l'ostéocyte. Le choix du type cellulaire va donc dépendre du but de l'étude envisagée.

1. Cellules primaires

L'un des avantages des cellules primaires est qu'elles peuvent être isolées chez des animaux génétiquement modifiés, présentant par exemple une délétion ou une surexpression génique. Cela permet d'éviter des manipulations géniques (e.g. transfection) sur des cellules en culture, dont l'efficacité et la stabilité dans le temps sont toujours difficiles à contrôler. Les populations de cellules primaires osseuses sont cependant hétérogènes, contenant des cellules de lignages différents, mais aussi à des stades de différenciation différents, allant par exemple de l'ostéoprogéniteur à l'ostéocyte dans le cas des populations de cellules osseuses.

a. Cellules primaires humaines

Le principal avantage des cellules primaires humaines est le fait qu'il est possible de les utiliser pour tester des thérapies, mais également pour réduire les risques de différences de comportements inter-espèces (des cellules murines, par exemple, n'ont pas nécessairement la même réaction à une molécule que des cellules humaines). De plus, les ostéoblastes primaires humains ont un phénotype relativement stable *in vitro*. Malgré tout, l'activité cellulaire peut montrer d'importantes variations selon l'âge du donneur : les ostéoblastes de donneur âgé (>60 ans) prolifèrent moins et synthétisent moins de collagène de type I et d'ostéonectine que des ostéoblastes obtenus d'un jeune donneur (<30 ans) (Fedarko et al., 1992; Voegelé et al., 2000). Le site donneur est également important : les ostéoblastes de la tête fémorale prolifèrent moins mais sécrètent plus de PAL et d'OCN que les cellules issues du tibia proximal ou du fémur distal (Martínez et al., 1999). De nombreux facteurs influencent donc le comportement

des cellules ostéoblastiques primaires humaines, dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats obtenus.

b. Cellules primaires murines

Des cellules ostéoblastiques primaires de souris et de rat peuvent être isolées à partir de différents sites osseux, dont le calvarium (os du crâne) et les os longs (Ecarot-Charrier et al., 1983; Malaval et al., 1994, 1999; Maniatopoulos et al., 1988). Tout comme pour les cellules primaires humaines, il existe des différences de phénotypes ostéoblastiques selon l'âge et le site donneur. Par exemple, après 3 semaines de cultures d'ostéoblastes de calvaria de souris, la synthèse d'ostéocalcine est 6 fois plus importante quand les calvaria ont été prélevées sur des souriceaux âgés de 2 et 3 jours, comparée à des donneurs de 5 à 6 jours (Carpenter et al., 1998).

Les populations de cellules ostéoblastiques primaires comprennent des ostéoprogéniteurs qui vont former, après confluence et en présence d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate, des « nodules osseux ». Ces nodules sont issus d'un ostéoprogéniteur unique et sont formés en trois temps : (1) prolifération, (2) dépôt et maturation de la MEC, semblable au tissu ostéoïde puis (3) minéralisation de la MEC. A la fin de la phase de prolifération, les cellules ostéoblastiques expriment fortement la phosphatase alcaline. Avec le début de la minéralisation, d'autres protéines vont être synthétisées, avec entre autres un pic d'OPN et l'apparition de l'OCN et de la BSP. L'OPN est déjà fortement exprimée au pic de prolifération, elle va ensuite diminuer et de nouveau ré-augmenter au début de la minéralisation. Contrairement l'OPN, l'OCN est exprimée tardivement, au moment de la différenciation terminales des ostéoblastes, ce qui en fait le marqueur des ostéoblastes matures. Quant à elle, la BSP est synthétisée une fois les nodules formés, par les pré-ostéoblastes tardifs et les ostéoblastes actifs, dont elle est aussi un marqueur (Malaval et al., 1999).

2. Lignées cellulaires

En temps normal, les cellules issues d'un organisme ne se divisent qu'un certain nombre de fois avant de perdre leur capacité à proliférer et d'entrer en sénescence. Ce nombre de division est par ailleurs génétiquement déterminé. Pour échapper à ce phénomène, certaines cellules peuvent devenir immortelles (i.e. capacité à se diviser indéfiniment) grâce à un mécanisme appelé transformation, qui rend la capacité de

proliférer permanente. Celui-ci peut survenir spontanément (e.g. mutation de p53, comme dans le cas de certains cancers) ou être induites (e.g. insertion d'un gène viral). Cette prolifération indéfinie permet d'obtenir en relativement peu de temps un grand nombre de cellules sans isolation préalable. Les autres avantages des cellules de lignées sont leur facilité d'entretien et la bonne reproductibilité des cultures. Les lignées cellulaires sont également pures, c'est-à-dire qu'elles ne comprennent qu'un seul type de cellules. Mais les cellules de lignée présentent également des inconvénients. Bien que décrit comme stable en culture, le phénotype des cellules varie considérablement selon le passage auquel les cellules sont utilisées (Hausser and Brenner, 2005; Yan et al., 2014). De plus, les cellules de lignée ne reflètent pas le réel comportement des ostéoblastes, avec une prolifération qui n'est pas physiologique mais forcée par une dérégulation du cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que les cellules immortalisées ont un cytosquelette diffus et beaucoup plus déformable que les cellules primaires ; leur noyau présente aussi une forte déformation (Anselme et al., 2010). A la vue de ces observations, il est préférable de ne pas utiliser de cellules immortalisées pour des études d'interactions cellules-matériaux. Malgré tout, les cellules de lignée sont régulièrement utilisées, et les lignées ostéoblastiques les plus fréquentes sont les MG-63, les SaOs-2 et les MC3T3-E1.

a. Lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes

Les cellules des lignées MG-63 et SaOs-2 sont des cellules humaines cancéreuses, issues d'ostéosarcomes. Contrairement aux cellules « normales » qui arrêtent de proliférer quand elles finissent par former une monocouche cellulaire en boîte de Pétri (inhibition de contact), les cellules cancéreuses ne sont pas sensibles à ce phénomène et prolifèrent sans discontinuité, du fait d'une dérégulation du cycle cellulaire (e.g. mutation de p53).

Décrites comme étant des cellules de type ostéoblaste immature, les MG-63 sont très prolifératives et finissent par former des colonies denses. Les études sur la différenciation des MG-63 révèlent que les niveaux de PAL sont relativement faibles et qu'elles ont une faible capacité de minéralisation de la matrice déposée (Saldaña et al., 2011). A la vue de ces capacités d'expression du phénotype ostéoblastique relativement limitées, les cellules de la lignée SaOs-2 sont une alternative à la lignée MG-63. En effet, celles-ci expriment très fortement la PAL et forment une matrice extracellulaire minéralisée, avec une structure collagénique similaire à celle des

ostéoblastes primaires humains (Fernandes et al., 2007). L'expression de la PAL peut être stimulée chez les SaOs-2 par l'ajout de dexaméthasone et de β -glycérophosphate dans le milieu de culture (Czekanska et al., 2012). Cependant, en raison de cette très forte activité PAL en conditions basales, il est important de limiter la quantité de phosphates ajoutés, afin d'éviter des effets délétères sur la survie cellulaire (Czekanska et al., 2012).

b. Lignée cellulaire non cancéreuse : les MC3T3-E1

Figurant parmi les types cellulaires les plus utilisées en ingénierie tissulaire osseuse, la lignée MC3T3-E1 allie les avantages des cellules de lignée tout en évitant d'être cancéreuse. Cellules de type pré-ostéoblastique issues de calvaria de souris, les MC3T3-E1 sont capables de se différencier en présence d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate (Kodama et al., 1981). Ces cellules prolifèrent activement et synthétisent du collagène de type I dès le troisième jour de culture. La minéralisation de la matrice extracellulaire commence à apparaître vers le dixième jour, avec une expression génique de la BSP et de l'OCN (Wang et al., 1999). Les différentes caractéristiques de cette lignée cellulaire en font un modèle apprécié pour l'étude *in vitro* de la différenciation ostéoblastique. Cependant, une coloration Von Kossa ne permet de révéler la présence de dépôt de minéral que dans des cultures cellulaires des sous-clones 4 et 14, indiquant que la minéralisation de la MEC très dépendante de la variante utilisée (Wang et al., 1999). De plus, le minéral déposé par les MC3T3-E1 ne correspond pas à de l'hydroxyapatite, contrairement à celui déposé par des cellules de calvaria de rat (Bonewald et al., 2003). Certains sous-clones, comme les n° 24 et 30 ne se différencient que très peu (très faible expression de BSP et OCN) et ne synthétisent pas de matrice minéralisée (Wang et al., 1999).

Il convient donc de prendre soin de choisir le type cellulaire en fonction de l'étude envisagée et de sa problématique. La table 1 récapitule les principaux avantages et inconvénients des types cellulaires les plus utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.

Table 1 : Les modèles cellulaires les plus utilisés en ingénierie tissulaire osseuse

Type cellulaire	Phénotype	Avantages	Inconvénients
Cellules humaines primaires	Progéniteurs ostéoblastiques à ostéoblastes	<ul style="list-style-type: none"> • Approprié pour les études cliniques 	<ul style="list-style-type: none"> • Isolation longue • Difficile à obtenir • Phénotype cellulaire dépendant du donneur
Cellules primaires murines	Progéniteurs ostéoblastiques à ostéoblastes	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à obtenir • Choix du génotype • Extraction des cellules à partir de tous les os du squelette 	<ul style="list-style-type: none"> • Phénotype cellulaire dépendant de l'âge et du site d'extraction • Génome différent de l'humain
SaOs-2	Ostéoblaste immature	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre illimité de cellules • Forte expression de la PAL • Minéralisation de la MEC • Structure collagénique semblable à l'humain 	<ul style="list-style-type: none"> • Déformation aberrante du cytosquelette et du noyau • Sensibles aux fortes concentrations de phosphates
MG-63	Ostéoblaste mature	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre illimité de cellules • Bonne réponse hormonale 	<ul style="list-style-type: none"> • Déformation aberrante du cytosquelette et du noyau • Arrêt de la différenciation au stade pré-ostéoblaste • Pas/peu de minéralisation
MC3T3-E1	Pré-ostéoblastes	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre illimité de cellules • Différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures 	<ul style="list-style-type: none"> • Signes de sénescence lors des hauts passages (P>36) • Pas/peu de minéralisation de la MEC • Variabilité des propriétés selon les clones

II. Les bioréacteurs

Les bioréacteurs sont définis comme des outils utilisés pour cultiver des cellules et/ou tissus au sein d'un environnement contrôlé (e.g. concentrations gazeuses, pH, température, pression, ...). Ils permettent également de soumettre les cultures cellulaires à des contraintes mécaniques et d'assurer l'apport des nutriments pour la bonne croissance tissulaire.

En ingénierie tissulaire osseuse, trois types de bioréacteurs sont couramment utilisés : les « spinner flasks », les « rotating wall vessels » et les bioréacteurs sous perfusion (Figure 21).

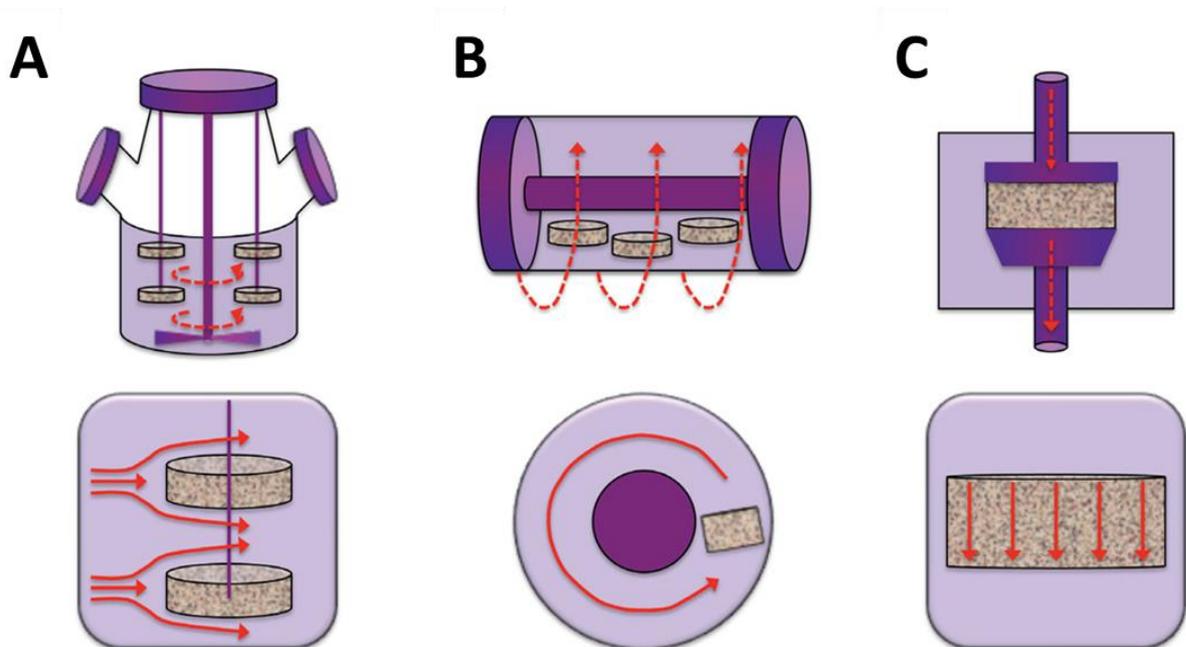


Figure 21 : Les trois types de bioréacteurs les plus utilisés en ingénierie tissulaire osseuse (adapté de Olivier et al., 2004).

(A) Spinner flask, (B) bioréacteur en rotation et (C) bioréacteur à perfusion. Les flèches rouges en pointillés indiquent en (A) le mouvement du barreau aimanté, en (B) le sens de déplacement de la chambre de culture et en (C) le sens de circulation du milieu de culture à l'intérieur du bioréacteur. Les flèches rouges indiquent le sens du flux de perfusion des biomatériaux dans les bioréacteurs correspondants.

1. Spinner flasks

Les « spinner flasks » sont les bioréacteurs les plus simples utilisés, principalement utilisés pour l'ingénierie du cartilage (Frondoza et al., 1996). Selon le type de fiole employé, 12 matériaux peuvent être cultivés simultanément. Les biomatériaux sont suspendus dans le milieu de culture et un barreau magnétique est placé au fond de la fiole. Lors de sa mise en rotation, le barreau va mobiliser le milieu de culture, dont le

mouvement peut être contrôlée par sa vitesse. Le flux qui en résulte va perfuser les biomatériaux mais cette perfusion provoque des turbulences du flux qui peuvent être délétères pour les cellules. De plus, le flux créé n'est pas suffisamment puissant, ce qui entraîne une perfusion hétérogène du biomatériau, avec une croissance cellulaire accrue en périphérie, au préjudice des cellules situées au centre (Yeatts and Fisher, 2011).

De nombreuses études ont été réalisées avec des « spinner flasks » : des cellules souches ainsi que des ostéoblastes cultivés dans ces systèmes augmentent leur production de PAL et d'OCN (Hosseinkhani et al., 2005; Ichinohe et al., 2008). Plus l'agitation est élevée, plus l'expression de la PAL est importante (Hosseinkhani et al., 2005).

Cependant, en raison des nombreux inconvénients de ces bioréacteurs (perfusion non homogène, contrôle du flux difficile, turbulences importantes), ils sont de moins en moins utilisés.

2. Bioréacteurs en rotation

Développé par l'agence spatiale américaine (NASA) pour étudier initialement les effets de la microgravité, le bioréacteur en rotation, communément appelé « rotating wall vessel », est composé de deux cylindres : le cylindre interne est statique alors que le cylindre externe est en rotation. L'espace entre les deux cylindres constitue la chambre de culture où les biomatériaux seront cultivés, après remplissage par du milieu de culture. En tournant sur lui-même, le bioréacteur met en mouvement le milieu de culture. Parce que la force hydrodynamique (créée par la rotation) contrebalance la gravité, les biomatériaux restent en suspension à l'intérieur du bioréacteur et la mobilisation du milieu assure leur perfusion (Unsworth and Lelkes, 1998). Un des inconvénients est justement le fait que les biomatériaux soient en suspension dans la chambre de culture et peuvent donc se cogner les uns aux autres, au risque d'être endommagés et de perturber la culture cellulaire (mouvement libre et aléatoire).

C'est peut-être, en partie, pour cette raison que les études réalisées sur ce type de bioréacteurs sont contradictoires : si certaines équipes ont montré une augmentation de l'expression de la PAL et de la minéralisation, d'autres au contraire n'ont pas observé de changement des niveaux de PAL et d'ostéocalcine par rapport à une culture cellulaire en condition statique (Goldstein et al., 2001; Sikavitsas et al., 2002).

3. Bioréacteurs à perfusion

Les bioréacteurs à perfusion sont les bioréacteurs les plus développés à l'heure actuelle. Leur principe est relativement simple : une pompe aspire le milieu de culture et force son passage à travers un biomatériau poreux, permettant l'apport des nutriments et l'élimination des déchets. Dans la pratique, il existe de nombreux designs de bioréacteurs mais qui partagent des caractéristiques communes : (1) un réservoir de milieu de culture, (2) une chambre de perfusion et (3) une pompe (péristaltique ou continue). Les bioréacteurs à perfusion sont facilement personnalisables, ce qui fait que de nombreux modèles ont été conçus selon les études menées, avec des types de biomatériaux particuliers et des flux de perfusion bien définis. L'ajout d'un système de compression dynamique permet de stimuler mécaniquement les cellules (Figure 22).

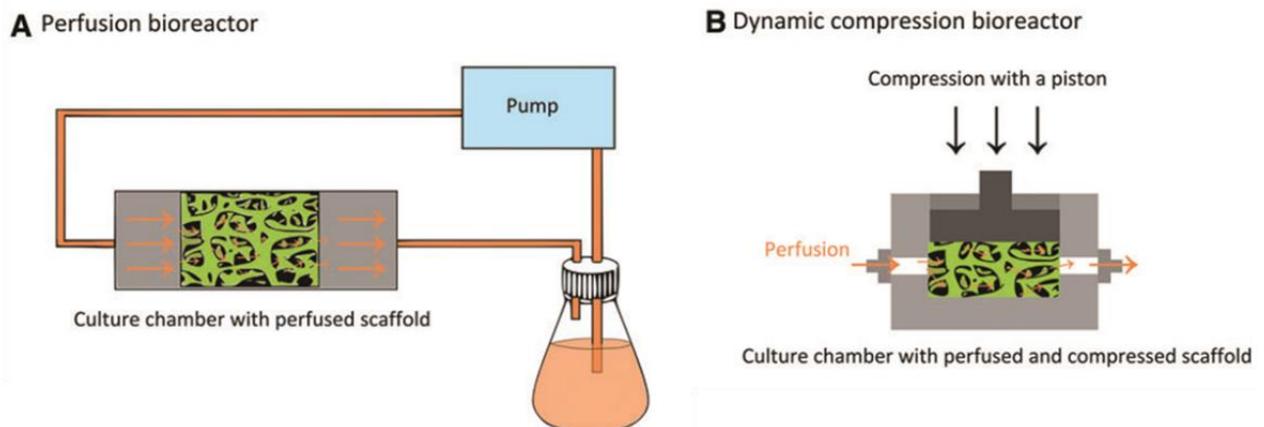


Figure 22 : Modèles de bioréacteurs à perfusion (Bouet et al, 2015).

(A) Bioréacteur à perfusion comprenant un réservoir de milieu, une pompe, une chambre de perfusion et un système de tubes permettant la circulation du milieu aux précédents éléments. (B) Bioréacteur à perfusion avec un dispositif de compression mécanique. La force de compression s'applique, ici, perpendiculairement au flux de perfusion.

En raison de cette très grande personnalisation des bioréacteurs, il est difficile de comparer des résultats d'expériences réalisées sur différents bioréacteurs, avec des biomatériaux et des types cellulaires différents. Cependant, il est communément admis que les bioréacteurs à perfusion permettent d'augmenter les niveaux d'expression de la PAL et de l'OCN, tout comme les autres bioréacteurs décrits ci-dessus mais avec une efficacité supérieure (Davidson et al., 2012).

Les différents effets du flux de perfusion sur les cellules sont décrits ci-dessous.

III. Conditions de culture in vitro

1. *Ensemencement*

L'ensemencement des cellules, bien que souvent considéré comme une étape parmi d'autres de la culture cellulaire, représente une étape-clé pour le bon déroulement des expérimentations. Un ensemencement non homogène est source de résultats non reproductibles, à la fois intra- et inter-expériences. Si en culture classique (i.e. 2D) la qualité de l'ensemencement ne présente pas de réelles difficultés, c'est tout autre chose dans une culture tridimensionnelle.

L'ensemencement des biomatériaux en statique est l'une des techniques les plus utilisées : la suspension cellulaire est déposée sur le biomatériau, ou bien le biomatériau est plongé directement dans la suspension cellulaire. Un vide est souvent appliqué afin d'évacuer les bulles d'air et de favoriser la pénétration des cellules à l'intérieur du biomatériau. Cependant, le résultat est très hétérogène, avec une forte concentration de cellules à la surface du biomatériau et très peu à l'intérieur, et d'autant plus que le matériau est gros. Outre la mauvaise pénétration des cellules à l'intérieur du matériau, le nombre de cellules repiquées est faible (efficacité de l'ensemencement) (Holy et al., 2000; Kim et al., 1998; Li et al., 2001).

Pour favoriser l'entrée des cellules à l'intérieur du biomatériau, l'ensemencement sous flux dynamique peut être utilisé. Un ensemencement dynamique peut-être réalisé à l'aide de bioréacteurs, comme ceux décrits ci-dessus. Par exemple, en utilisant un « spinner flask » qui va créer un flux, les cellules contenues dans le milieu de culture vont traverser les biomatériaux en suspension dans la fiole. Cependant, parce que le flux est bien souvent trop faible pour pénétrer jusqu'au centre du biomatériau, il a été montré que les ensemencements par « spinner flaks » ne sont pas efficaces, à la fois en terme de cellules repiquées et de distribution (Carrier et al., 1999; Kim et al., 1998; Wendt et al., 2003).

L'utilisation de bioréacteurs à perfusion permet de conserver le principe de passage de la suspension cellulaire à travers le biomatériau, tout en l'optimisant : le passage de la suspension cellulaire est forcé à travers l'ensemble du biomatériau, de la périphérie jusqu'au centre. Cette technique a montré de bien meilleurs résultats, avec une augmentation de la densité de repiquage et une distribution plus homogène des cellules à l'intérieur du matériau, comparé à un ensemencement statique ou par

« spinner flask » (Wendt et al., 2003). De plus, cette technique permet de réaliser à la fois ensemencement et culture au sein du même bioréacteur et donc de limiter les risques de contamination lors de la manipulation et du transfert entre les bioréacteurs. Contrôler l'ensemencement signifie également contrôler le nombre de cellules repiquées. Ainsi, il a été démontré que l'ensemencement de biomatériaux à forte densité cellulaire augmente la croissance tissulaire 3D, accélère la minéralisation osseuse et favorise l'organisation d'un tissu cardiaque (Carrier et al., 1999; Holy et al., 2000).

2. Forces de cisaillement

En ingénierie tissulaire osseuse, la force de cisaillement, communément appelée « shear stress », est la conséquence de la création d'un flux de perfusion par un bioréacteur (voir ci-dessus). Cette force de cisaillement permet de stimuler mécaniquement les cellules, à la fois en culture 2D et 3D.

a. Le flux de perfusion et ses conséquences

Le flux de perfusion, et par conséquent la force de cisaillement, va directement influencer la différenciation des cellules ostéoblastique, en stimulant la formation osseuse et l'expression de gènes spécifiques (Bancroft et al., 2002; Santos et al., 2009; Yu et al., 2004). Il est possible de calculer et de prédire la force de cisaillement au sein de cultures *in vitro* 2D et 3D grâce aux modèles numériques (Botchwey et al., 2004).

De nombreuses études ont démontré que des cellules ostéoblastiques, cultivées au sein d'un bioréacteur et donc soumises à des forces de cisaillement, ont une activité PAL stimulée, une sécrétion d'OPN augmentée et un dépôt de minéral plus important comparé à des cellules cultivées en condition statique (Bancroft et al., 2002; Holtorf et al., 2005; Leclerc et al., 2006). Par exemple, un flux de perfusion de 1 mL.min⁻¹ permet un dépôt de matrice minéralisée par des ostéoblastes primaires 6 fois plus important qu'avec un flux de 0,3 mL.min⁻¹ (<0,1 Pa dans ce système). Cependant, un flux de perfusion trop important (3 mL.min⁻¹) finit par être délétère pour l'activité cellulaire (Bancroft et al., 2002). Une autre étude, réalisée par (Cartmell et al., 2003) a également démontré qu'il existait un seuil limite supérieur critique pour les cellules. Des cellules de la lignée MC3T3-E1 ont été cultivées pendant 1 semaine à des différents flux de perfusion : 0,01, 0,1, 0,2 ou 1 mL.min⁻¹. Le plus petit débit (0,01 mL.min⁻¹) favorisait la

prolifération cellulaire, le débit le plus fort (1 mL.min⁻¹) provoquait une chute de la viabilité cellulaire mais le débit intermédiaire (0,2 mL.min⁻¹) permettait à la fois une bonne survie cellulaire et une augmentation des marqueurs ostéoblastiques Runx2, PAL et OCN (Cartmell et al., 2003). D'autres études ont ainsi montré que des flux de perfusion suffisamment élevés (>10 mPa) augmentaient l'activité cellulaire et la synthèse de MEC jusqu'à un certain seuil (Bancroft et al., 2002; Grayson et al., 2011). L'augmentation du flux de perfusion ne permet pas seulement d'accroître le dépôt de MEC mais semble également agir sur la morphologie cellulaire. Ce changement serait dû à l'activation des voies de mécanotransduction en réponse à la force de cisaillement créée par le flux de perfusion.

b. Les mécanismes cellulaires impliqués

En condition statique, quand la cellule n'est pas soumise à des forces de cisaillement, le cytosquelette est en équilibre entre forces de tension et de compression, ce qui donne sa forme à la cellule. Sous flux de perfusion, cet équilibre entre tension et compression est déséquilibré, provoquant alors la déformation du cytosquelette (Figure 23). Celle-ci se traduit par une réorganisation, avec une réorientation des fibres d'actine (voir **Partie B.III.1**). Certaines protéines intracellulaires vont se rapprocher, ce qui va permettre leur interaction et activer des voies de transduction qui régulent l'activité cellulaire (Ingber, 2006). Il a été montré que les forces de cisaillement stimulent la phosphorylation des « extracellular signal-regulated kinases » (ERK) et de p38, la synthèse de PGE2 et l'expression du collagène de type I et des gènes ostéoblastiques (OPN, OCN et BSP) (Kapur et al., 2003; Kreke et al., 2008).

Les forces de cisaillement agissent à la fois sur la MEC et les cellules par l'intermédiaire de protéines situées dans la membrane cellulaire. Un stress mécanique, sous la forme de force de cisaillement, va déformer la MEC à laquelle les cellules sont rattachées via leurs intégrines. Ce changement de configuration de la MEC va activer la voie de signalisation FAK (Katsumi et al., 2004) (voir **Partie B.III**). De plus, la très forte sensibilité des cellules au flux de perfusion pourrait être expliquée par l'implication du cil primaire (Malone et al., 2007). Les cellules ostéoblastiques possèdent un cil primaire qui, sous l'action d'un flux de perfusion, se tord et provoque l'ouverture de canaux Ca²⁺. Ces ions calcium se fixent sur l'adénylate cyclase 6 (AC6), empêchant le clivage de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Cette baisse d'AMPC intracellulaire déclenche l'activation de voies de

signalisation et aboutit à une augmentation de l'expression génique de l'OPG, de l'OPN et de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) (Hoey et al., 2012; Kwon et al., 2010; You et al., 2001). COX2 intervient dans la production de la prostaglandine E2, qui stimule la différenciation ostéoblastique (Conconi et al., 2002). Il semblerait que la torsion du cil primaire induit également l'activation de la voie des MAPK de manière indépendante des « stretch-activated channels » et du Ca^{2+} (Malone et al., 2007).

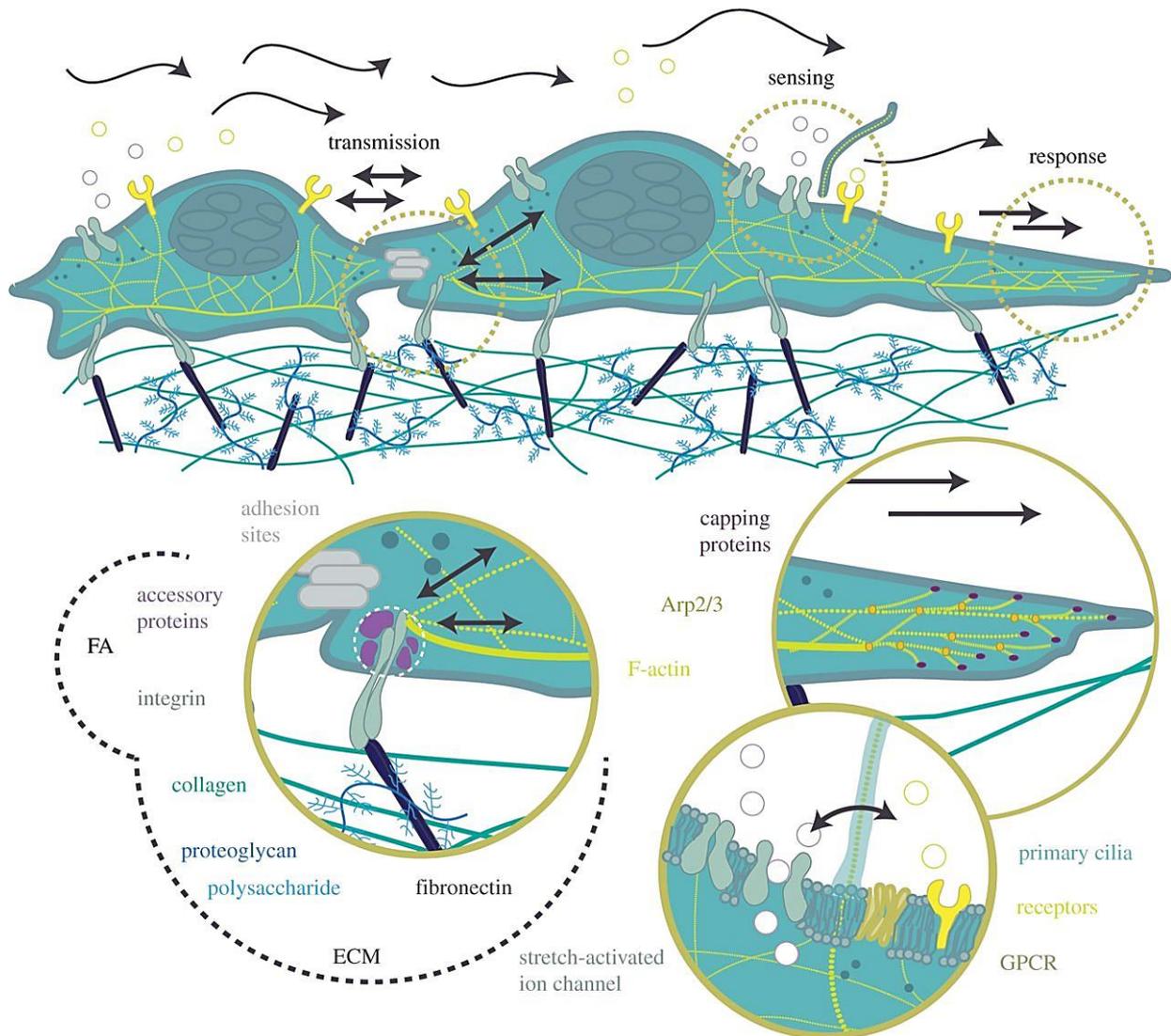


Figure 23 : Réponses cellulaires aux forces de cisaillement (Haase & Peeling, 2015).

Les forces de cisaillement sont ressenties par les cellules au niveau de récepteurs présentes dans la membrane plasmique (« stretch-channels », récepteurs couplés aux protéines G, cil primaire). De plus, les forces peuvent également agir sur la MEC et être ressenties par les cellules via les contacts focaux (FA). Les forces de cisaillement sur la cellule provoquent une réorganisation du cytosquelette. Les nombreuses voies de transduction du signal vont provoquer des changements d'expressions géniques et protéiques, afin de permettre l'adaptation des cellules aux contraintes mécaniques.

OBJECTIFS

Comme décrit ci-dessus, l'architecture du substrat de culture influence le comportement des cellules. Si beaucoup d'études ont été réalisées pour étudier l'impact de la géométrie du substrat à des échelles nano et microscopiques, il n'existe à l'heure actuelle que très peu d'informations sur l'influence de la macroarchitecture (échelle supérieure à 100 μm) sur l'activité et la différenciation des ostéoblastes, la seule étude notable s'étant concentrée uniquement sur le dépôt de matrice extracellulaire par les cellules. Pourtant, dans l'os, les cellules évoluent au sein de structures macroscopiques telles que les travées osseuses ou les ostéons. L'objectif principal de cette thèse a été d'élaborer un modèle de différenciation osseuse *in vitro* au sein de céramiques en hydroxyapatite, et pour cela, nous avons étudié les effets de la macroarchitecture du substrat, et plus particulièrement la forme de celui-ci, sur le comportement ostéoblastique.

Des premiers travaux ont été menés sur des substrats macroarchitecturés, cultivés en boîte de Pétri et sans flux de perfusion. Trois géométries différentes ont été testées : des sillons sous la forme d'une onde sinusoïdale (« $S2\pi$ ») et des sillons sous la forme d'ondes triangulaires de deux périodes différentes (« $T2\pi$ » et « $T\pi$ »). Ces biocéramiques ont été comparées à un substrat plat, de même composition (« Flat »), ce qui nous a permis d'analyser le comportement des cellules ostéoblastiques en fonction de la macroarchitecture de leur environnement. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'influence de la courbure du substrat sur le dépôt de MEC et la différenciation ostéoblastique (**Etude 1**). Nous avons également voulu observer quel impact la macroarchitecture du substrat avait au niveau des cellules individuelles, en termes de morphologie et de cytosquelette (**Etude 2**). Ces données nous ont permis d'accéder à des informations importantes pour la suite de ces travaux, qui était le développement d'un modèle tridimensionnel d'ostéogenèse en culture perfusée. Des céramiques macroporeuses, à pores circulaires (mimant le motif « $S2\pi$ ») ou à pores triangulaires (incluant des angles à 90° et 45°, mimant respectivement les motifs « $T2\pi$ » et « $T\pi$ »), ont été cultivées sous perfusion au sein du bioréacteur BOSE® *ElectroForce*® 5270 *BioDynamic*® de la plateforme Equipex IVTV du Campus Santé Innovations de Saint-Etienne. Ce modèle 3D permettait d'explorer l'influence de la macroarchitecture dans des conditions de culture perfusée, afin d'analyser la réponse des cellules aux forces de cisaillement dues au flux de perfusion (**Etude 3**).

TRAVAUX REALISES

A. Etude 1 : Influence de la géométrie du substrat sur la croissance tissulaire, la différenciation ostéoblastique et l'ostéogenèse

I. Exposé des travaux (Article 1, soumis à Acta Biomaterialia)

Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis *in vitro*

Laura JUIGNET¹, Baptiste CHARBONNIER^{1,2}, Virginie DUMAS³, Wafa BOULEFTOUR¹, Mireille THOMAS¹, Coralie LAURENT^{1,2}, Laurence VICO¹, Nathalie DOUARD^{1,2}, David MARCHAT^{1,2}, Luc MALAVAL¹

¹Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéoarticulaires, INSERM, U1059, Université de Lyon, Saint-Etienne, F-42023, France

²Ecole des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie Santé, Campus Santé Innovations, Saint-Etienne, F-42023, France

⁴Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint Etienne, LTDS, UMR 5513 CNRS, Saint-Etienne, F-42023 France

Abstract

While the impact of substrate topographies at nano- and microscale on bone cell behavior has been particularly well documented, very few studies have analyzed the role of substrate closure at a tissular level. Moreover, these have focused on matrix deposition rather than on osteoblastic differentiation. In the present work, mouse calvaria cells were grown for 15 days on hydroxyapatite (HA) ceramics textured with three different macrogrooves shapes ($>100\ \mu\text{m}$): 1 sine and 2 triangle waveforms. We found that macrotopography favors cell attachment, and that bone-like tissue growth and organization are promoted by a tight “closure angle” of the substrate geometry. Interestingly, while *Flat* HA controls showed little marker expression at the end of the culture, cells grown on macrogrooves, and in particular the most closed (triangle waveform with a $517\ \mu\text{m}$ spatial period) showed a fast time-course of osteoblast differentiation, reaching high levels of gene and protein expression of osteocalcin and sclerostin, a marker of osteocytes.

Keywords: osteoblast differentiation, bioceramics, substrate closure, macrotopography

1. Introduction

Bone grafts are currently the gold standard for the treatment of bone defects, despite the drawbacks of limited availability and potential health risks. Because of their composition close to the mineral phase of bone extracellular matrix and their osteoconductive properties (i.e. passive property of a scaffold allowing vascular and cellular invasion from the host tissue), calcium phosphate (CaP) based bioceramics are frequently used as alternatives to bone grafts (Shepherd et al., 2012). The success of such synthetic bone substitute is determined by its ability to interact positively with the host tissue (e.g., cell invasion, degradation, and replacement). The architecture of the implant may directly (e.g., cell colonization) or indirectly (e.g., local stimuli) influence the cell fate through its macroscopic ($> 100 \mu\text{m}$) and microscopic ($< 20 \mu\text{m}$) features. It is well known that cells are influenced by the parameters of their local environment, such as substrate geometry, extracellular matrix (ECM) stiffness or mechanical stimulation (Bidan et al., 2013; Bouet et al., 2015a; Trappmann and Chen, 2013). In response to those stimuli, intracellular mechanotransduction signal pathways are activated, such as the formation of stress fibers, causing an adaptive cellular response (Brown and Discher, 2009; Hoffman et al., 2011).

Many *in vitro* studies on topography at nano ($<100 \text{ nm}$) and microscale ($<100 \mu\text{m}$) have demonstrated that these material features could influence and orient cellular behavior, by promoting cell adhesion or osteoblast differentiation (Lan Levensgood et al., 2010; Saiz et al., 2013; Xia et al., 2014). However, if studies have already been conducted on macroarchitected bioceramics ($>100 \mu\text{m}$), the techniques used for their elaboration (salt leaching, freeze drying, foaming, etc) do not allow precise control of key parameters such as porosity, size and shape. The development of additive manufacturing processes allowed the standardized production of ceramics with precisely defined characteristics and the personalization of their design (Melchels et al., 2012). The first noticeable study realized on controlled macrostructures showed that local tissue growth was proportional to the substrate curvature, demonstrating that cells can sense and react to the macroarchitecture (Rumpler et al., 2008). Concerning osteoblast differentiation, the few studies performed on macroarchitected substrates showed that curvature affected osteoblast behavior. Small-diameter concavities ($440 \mu\text{m}$) promoted cell growth and osteocalcin gene and protein expression (Urquia Edreira et al., 2016) whereas cells grown in grooves no larger than $135 \mu\text{m}$ showed a

higher expression of alkaline phosphatase and collagen I (Faia-Torres et al., 2015). Moreover, it has been shown that the pore geometry influences colonization by blood vessels in vivo (Magnaudeix et al., 2016) and thus could have an important role to guide cell behavior.

To further analyze the impact of local substrate architecture on osteoblastic behavior, both in terms of extracellular matrix deposition and osteoblast differentiation, we used mouse calvaria cells grown on macrogrooved CaP bioceramics presenting different degrees of closure, defined as the angle of separation of the groove slopes. Based on previously published work, our hypothesis was that macroarchitectures will promote both tissue growth and osteoblast differentiation, proportionally to the closure of the substrate.

2. Material and methods

a. Ceramics manufacturing and design

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) bioceramics with macroscopic grooves were produced through an additive manufacturing process, detailed in (Charbonnier et al., 2016b). Briefly, wax molds were produced by 3D printing and impregnated with a hydroxyapatite suspension. After drying, the green bodies (i.e., mold surrounded by dried slurry) were firstly heat treated at 500 °C for 2 hours (h) to remove the molds and organics additives (i.e. debinding) then sintered at 1200 °C for 2 h. HA ceramics display three different grooved macroarchitectures: 1 sine and 2 triangle waveforms with spatial period of $1247.2 \pm 6.6 \mu\text{m}$ (named $S2\pi$), $1243.5 \pm 8.2 \mu\text{m}$ (named $T2\pi$) and $517.0 \pm 8.7 \mu\text{m}$ (named $T\pi$), respectively (Figure 24). Pellets (*Flat* controls) of the same composition (HA) and submitted to the same heat treatment (2 h at 500 °C, 2 h at 1200 °C) were used for comparison. Dimension parameters of the ceramics are given in Table 2. The height and diameter of the bioceramics pellets were measured with a calliper (N=6 ceramics, accuracy 1 μm). The bioceramics (N=3/architecture) were included in a thermosetting epoxy resin (EpoThin, Buehler, USA). After inclusion, samples were polished by means of an automated polishing system (Prepamatic, Struers, Denmark) to reveal the grooved architectures of the bioceramics (i.e., perpendicularly to the grooves direction). The latter were imaged by means of a binocular, then their geometrical features were determined via the ImageJ freeware (<http://imagej.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, USA). The average roughness (Ra) values indicated a low variability (453 to 895 nm) regardless of the *Flat* or grooved samples (Figure 25).

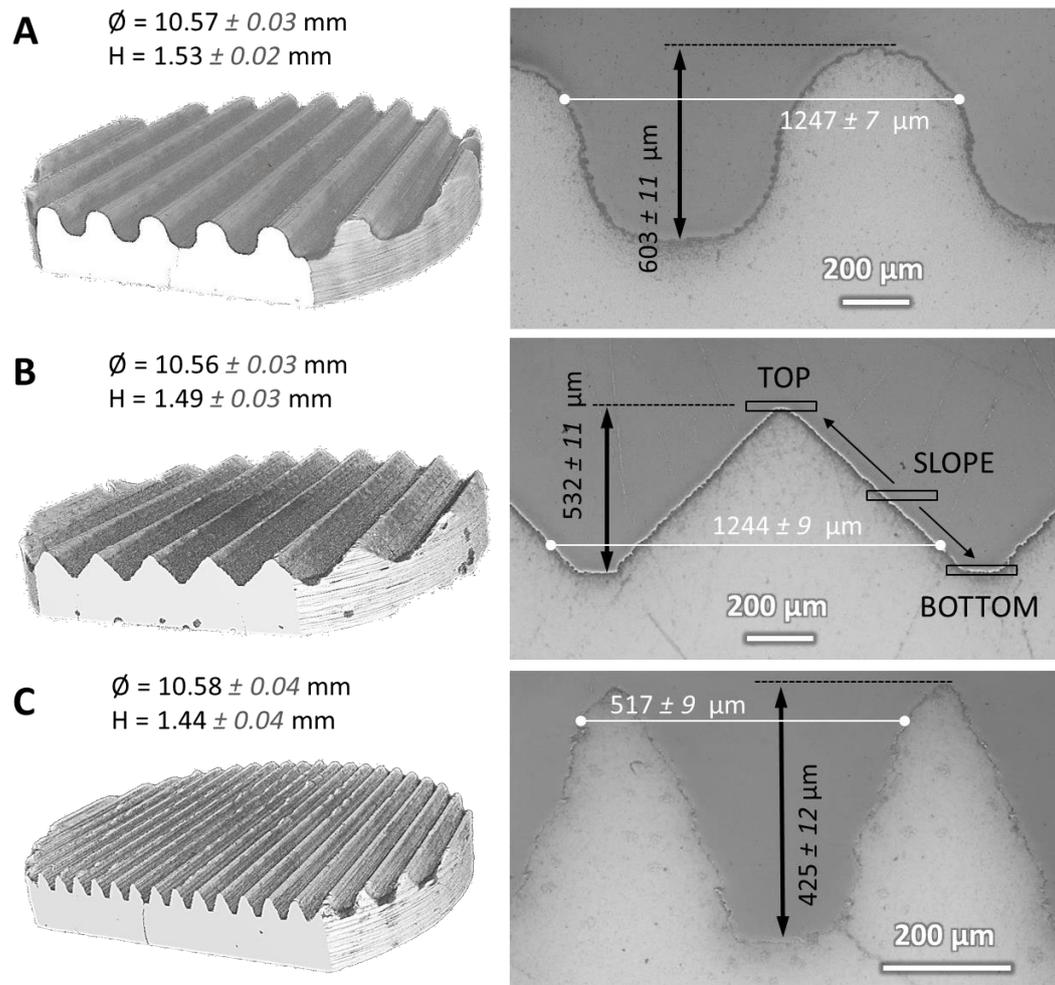


Figure 24 : Topography of the three different macroarchitected bioceramics (A) with hemi-circular grooves ($S2\pi$), and with triangular grooves with an angle of (B) $T2\pi$ or (C) $T\pi$. Images were acquired in microcomputed tomography (μ CT, left column) and in optical microscopy after section (right column). The different areas of the grooved ceramics, referred to in the text, are defined in the right row. Scale bar = 200 μ m.

Table 2 : Ceramic dimensions.

Values are per ceramic unit. Measurements were done on 3 ceramics (for diameters) and 8 grooves/ceramic (for groove depth). Area were calculated from the dimensions of the different architectures (see Materials and methods for details). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Parameters	Flat	$S2\pi$	$T2\pi$	$T\pi$
Ceramic diameter (mm)	9.39 \pm 0.03	10.59 \pm 0.03	10.56 \pm 0.03	10.59 \pm 0.04
Groove depth (μ m)	-	603.1 \pm 10.4	532.2 \pm 11.0	424.9 \pm 11.5
Surface area (mm ²)	69.23 \pm 0.46	125.83 \pm 2.54	108.79 \pm 2.46	173.16 \pm 7.08
Top area (mm ²)	-	11.32 \pm 0.83	8.63 \pm 0.76	14.97 \pm 1.71
Slope area (mm ²)	-	103.19 \pm 0.88	91.25 \pm 0.99	138.41 \pm 3.03
Bottom area (mm ²)	-	11.32 \pm 0.83	8.91 \pm 0.71	19.81 \pm 2.31

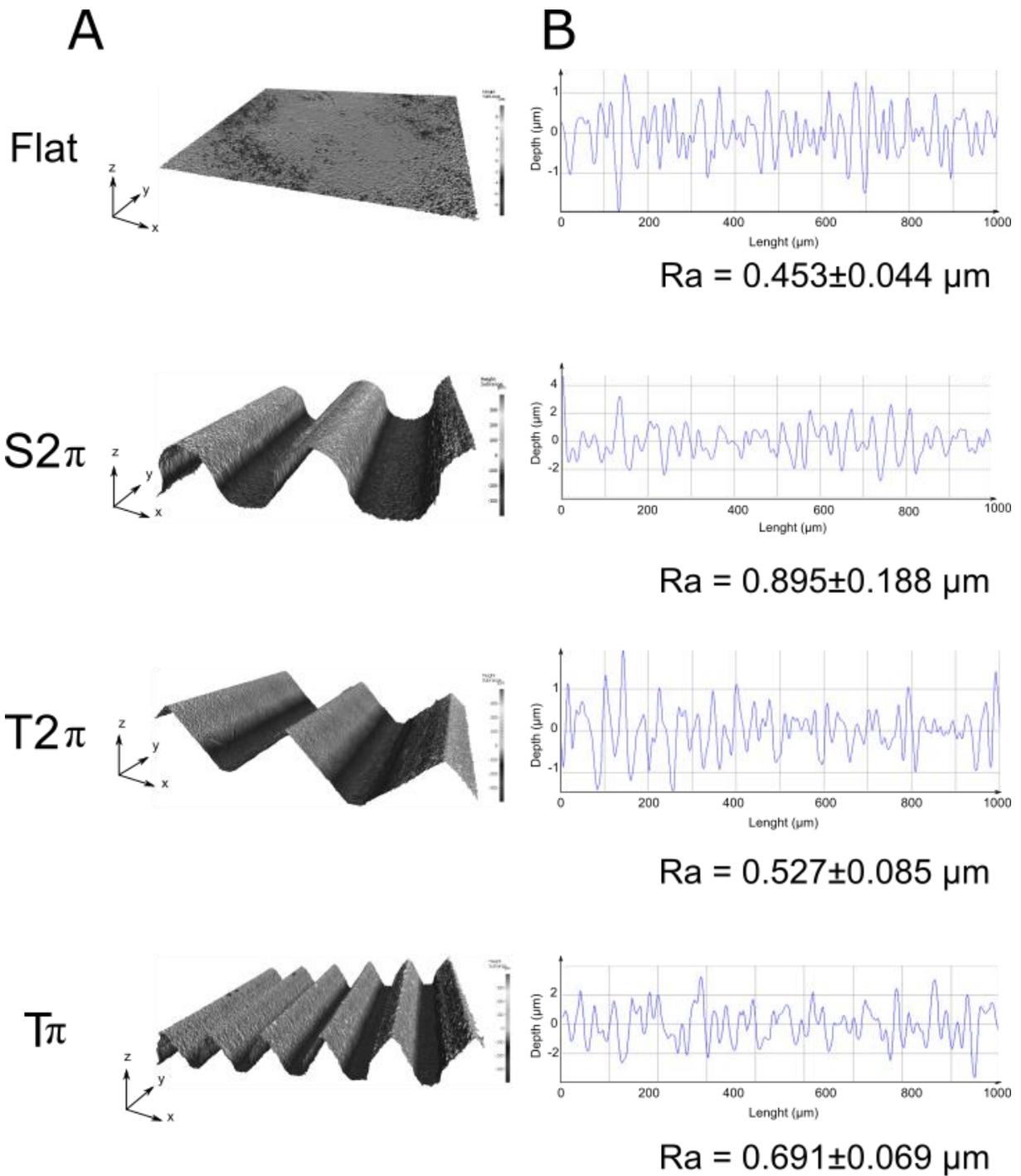


Figure 25 : The average roughness (Ra) on the surface of the different ceramics. Ra was measured on the different areas (top, slope, bottom) of each macroarchitected ceramics and the mean of these three Ra measurements was take into account. (A) 3D surface topography, (B) A representative roughness profile on 1 mm and the mean of Ra measurements. $N=5$ measurements/area/pattern, with mean \pm standard deviation.

b. Cell culture

Mice (mixed 129sv/CD1 outbred background) were housed and bred in the PLEXAN facility (Platform of Experiments and Analysis, Faculty of medicine, University of Saint-Etienne, France). The procedures for care and killing of the animals were in accordance with the European Community Standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Nr C-18 0801). All animal experiments were approved by the « Comité du Bien-Etre Animal » (Animal welfare committee) of the PLEXAN. Mice were kept at standard temperature (22 ± 1 °C), in a light controlled environment (12 h light/12 h dark cycle). Animals were fed a standard pellet diet (A03 food, Scientific Animal Food and Engineering, Aury, France) and were allowed water ad libitum. Four day-old mice were killed by decapitation and the skull caps (calvaria) were dissected out. The calvaria were isolated, cleaned of all connective tissues, cut along the sagittal suture and pooled (Bellows and Aubin, 1989). The fragments were then digested at 37 °C in 0.2 % (w/v) type IV collagenase (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) in Ham's Nutrient Mixture F-12 (Sigma), under gentle stirring. Cells, extracted during the first 5 minutes (min) of digestion and six consecutive digestions of 5 to 15 min, were collected. After centrifugation, calvarial cells were pooled, filtered and plated in T-75 flasks in Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50 µg/ml streptomycin (Sigma) and 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Biowest, Nuaille, France), hereafter referred as "culture medium". After 24 h, the cells were trypsinized and plated at 40 000 cells/ceramic. To induce osteogenesis, the culture medium was supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma) and 10 mM β-glycerophosphate (Sigma). Cell culture was performed at 37 °C under 5% CO₂, and culture medium was changed every other day.

c. Cell attachment assay

One hour after seeding, the ceramics were collected, rinsed with PBS (each grooved ceramic was flushed three times) and fixed in 3.7 % (w/v) paraformaldehyde (PFA), for 15 min at room temperature. The samples were rinsed in PBS and incubated with 10 µg/ml 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma) for 20 min at room temperature, to label nuclei. Ceramics were observed with a Zeiss AxioObserver® optical fluorescent video microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and 6 fields per ceramic were acquired using the AxioCam® camera using the

AxioVision® software (Zeiss, version 4.8.1.0) with a 10 µm step along the Z-axis. Image analysis was performed with the ImageJ freeware. Three different areas (top, slope, bottom) were defined in the architectures, as described in Figure 1. The bottom area was encompassed by the first image of the stack, the top area was the last image and the slope was covered by the images in between. Their respective areas are given in Table 1. Labeled nuclei were counted separately in each zone for each bioceramic design and the number of nuclei was normalized to the surface area of the zone analyzed.

d. Metabolic activity assessment

At day 3, 6, 10 and 15, cell metabolic activity was measured using the alamarBlue® assay (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions (10% alamarBlue® in culture medium). After 3 h of incubation, the absorbance was measured at $\lambda=570$ nm (normalized at $\lambda=600$ nm), using a plate-reader (Multiskan Spectrum, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each sample was run in duplicate in the assays. Data were normalized by DNA content, also used to assess cell population size in the cultures (see below).

e. Live and dead assay

Cell viability in the ceramics was assessed by staining live cells with calcein AM (Invitrogen) and dead cells with propidium iodide (Sigma). Ceramics were observed with a Zeiss AxioObserver® optical fluorescent video microscope (Zeiss) and images were acquired with the AxioCam® camera using the AxioVision® software (Zeiss, version 4.8.1.0).

f. Scanning Electron Microscopy (SEM) and roughness measurement

Scanning electron microscopy (SEM, JEOL, JSM-6500F, USA) was used to image cells and ECM deposited in ceramics after 15 days of culture. After a first rinsing in sodium cacodylate buffer solution (0.1 M, pH=7.4, Sigma), ceramics were fixed with 2.5 % (w/w) glutaraldehyde/sodium cacodylate for 1 h at 4 °C, then rinsed twice in sodium cacodylate buffer solution. Samples were dehydrated in successive ethanol baths of increasing concentration, then immersed in hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma) for 30 seconds (s) before drying. Prior to imaging, samples were coated with gold by the low vacuum sputter coating method (Quorum, Q150R ES, UK).

Ra was measured on images taken with the optical 3D surface metrology system, InfiniteFocus (ALICONA, Graz, Austria). The system acquires a series of images at different heights. Each image contains pixels that are more or less in focus depending on the height at which the information was captured. The software processes the set of several hundred images to determine the maximum focus for each pixel. It then creates the 3D surface topography image where each pixel is at its maximum focus and where the altitude variations can be analyzed. Ra is the area between the roughness profile (peak heights and valleys) and its mean line. The measurements were taken with a vertical resolution of 0.2 μm , a lateral resolution of 1 μm and a cut-off wavelength of 80 μm .

g. Sections

At day 15 of culture, ceramics were washed in PBS, fixed with 3.7 % PFA, dehydrated in acetone and embedded in methylmetacrylate. Blocks were cut with a diamond wire (ESCIL, Chassieu, France) at a 200 μm thickness. Sections were stained with either hematoxylin-eosin or Von Kossa, mounted and observed under an optical microscopy (Zeiss).

h. Immunostaining and quantification

At day 15, the ceramics were washed in PBS, fixed with 3.7 % PFA for 15 min at room temperature, permeabilized for 3 min by 0.1 % Triton X-100 in PBS. They were labeled overnight at 4 °C in a humid chamber with primary monoclonal antibodies against fibronectin (FN, 1:100, Sigma, ref F3648) or osteopontin (OPN, 1:100, Santa-Cruz, CA, USA, ref sc-21742), diluted in PBS containing 10 % (v/v) of goat serum (labelling buffer). The samples were rinsed with PBS and incubated with a mixture of secondary antibodies (1:100) and DAPI in labelling buffer for 90 min at room temperature. After rinsing, the ceramics were observed with a confocal microscope (Nikon A1R MP Plus®, Tokyo, Japan) and images acquired with the NIS-Elements software (Nikon), with a 4 μm step along the Z-axis. Image analysis was performed with the ImageJ freeware. The maximal thickness of the tissue layed by the cells was measured in the middle of the grooves.

i. ELISA assays

After 3, 6, 10 and 15 days of culture, ELISA assay was performed on culture medium to measure OPN (DY441, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), osteocalcin (OCN,

60-1305, Immunotopics) and sclerostin (MSST00, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Each sample was run in duplicate in the assays. Measurements were corrected for fresh culture medium values.

j. Nuclei acid extraction and qRT-PCR

For DNA quantification, cells were rinsed with PBS and digested with lysis buffer (1 mg/mL proteinase K (Euromedex) in directPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech)) for 5 h at 55 °C. Lysates were collected and heated for 45 min at 85 °C to inactivate the enzyme. Cell lysates were centrifuged at 10 000g for 90 s to remove debris. Supernatants were eliminated and DNA was resuspended in nuclease-free water. Samples were stored at -20 °C until use. DNA concentration was measured with the Picogreen kit (Invitrogen). DNA samples from a known number of mouse calvaria cells were used to build a standard curve and quantify cell numbers in the ceramics. For evaluation of gene expression, cells were detached with trypsin, centrifuged and extracted with TRI reagent (Sigma). Cell lysates were centrifuged at 10 000g at 4 °C for 10 min to remove debris and RNA isolated from the supernatants. Total RNA quality was checked with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) and concentration was measured with the Ribogreen kit (Invitrogen). Samples were stored at -80 °C until use. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with the iScript™ cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) for Thermal Cycler (BIO-RAD) according to the manufacturer's instruction. 50 ng of cDNA were amplified using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Germany). Reactions were performed in 20 µL PCR mixture containing 5X Master Mix (dNTP mixture with dUTP, MgCl₂, SYBR Green I dye, Taq DNA polymerase and reaction buffer) and 10 µM primers. Primer sequences for OPN, OCN and SOST (sclerostin gene) are displayed in Table 3, along with Cyclophilin A which was used to normalize mRNA expression. An RNA sample from mouse calvaria cells grown on plastic was used to build the standard curves from 10-fold dilutions of total RNA.

Table 3 : Oligonucleotides primers used in qRT-PCR.
The meaning of the abbreviations is explained in the text.

Genes	5'-3'	3'-5'	Product size (pb)	Source
CyclophilinA	tacacgccataatggcactg	ccatggctccacaatggtc	227	NM_008907.1
OPN	cccgggtgaaagtgactgattc	atggcttccattggaattgc	193	NM_009263.2
OCN	ctctgacctcacagatgcca	ctggtctgatagctcgtcaca	190	NM_007541.2
SOST	tcctcctgagaacaaccagac	tgtcaggaagcgggtgtagtg	127	NM_024449.5

k. Statistical analysis

Quantitative data are presented as box-plots, with Min to Max whiskers. Statistical analysis was performed with the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test, using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Sample sizes are given in the figure legends.

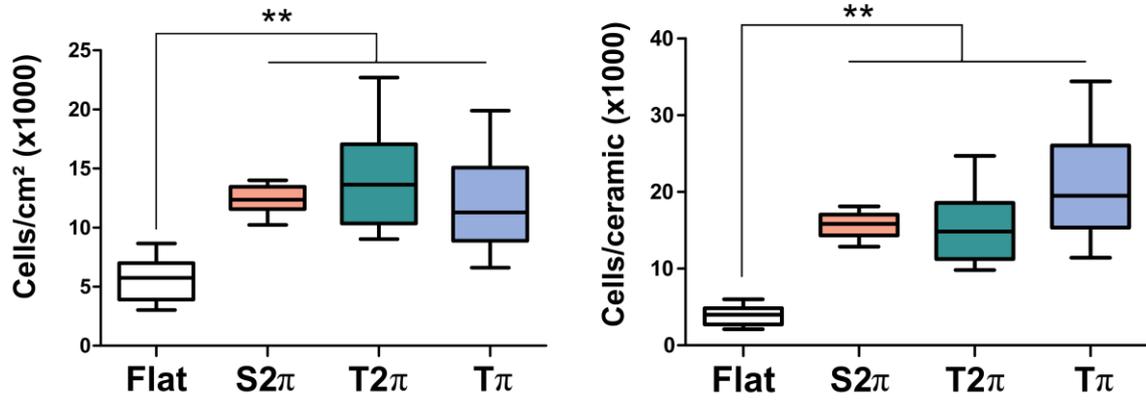
3. Results

a. Cellular dynamics

After one hour of seeding, cells were adherent to all substrates. However, the number of cells attached was at least 2 fold higher on grooved ceramics than on *Flat* controls ($p < 0.01$), with no difference between architectures (Figure 26A). On grooved ceramics, cell densities were similar on the top and slope area (Figure 26B). In all 3 macroarchitectures, the cell density at the bottom of the grooves was higher than in other areas. Of note, it was significantly lower in the grooves of the $T\pi$ bioceramics, compared to the $S2\pi$ pattern at the bottom (Figure 26B).

During the culture, cell numbers, as assessed through DNA content, sharply increased until day (D)6 on most substrates (the $S2\pi$ pattern peaked at day 10), then remained stable or decrease slightly later on (Figure 27A). At D6, cell numbers in angular grooved substrates, and more particularly the $T\pi$ pattern, were higher. At the end of the cultures (D15), cell numbers in the different substrates were similar, although slightly higher in the $T\pi$ pattern (Figure 27A). At D1, metabolic activity, normalized for cell numbers (DNA) was strikingly higher on grooved substrates, compared to *Flat* controls (Figure 27B). No difference between substrates nor variation with time were observed at later culture times (Figure 27B). At D6 and D15, cells were distributed on most of the surface area, but they were less dense in the grooves of the $S2\pi$ pattern. Cells were rare at D6 in the Top area of the $T2\pi$ and $T\pi$ grooves (Figure 27C), the latter remaining poorly cover at D15.

A



B

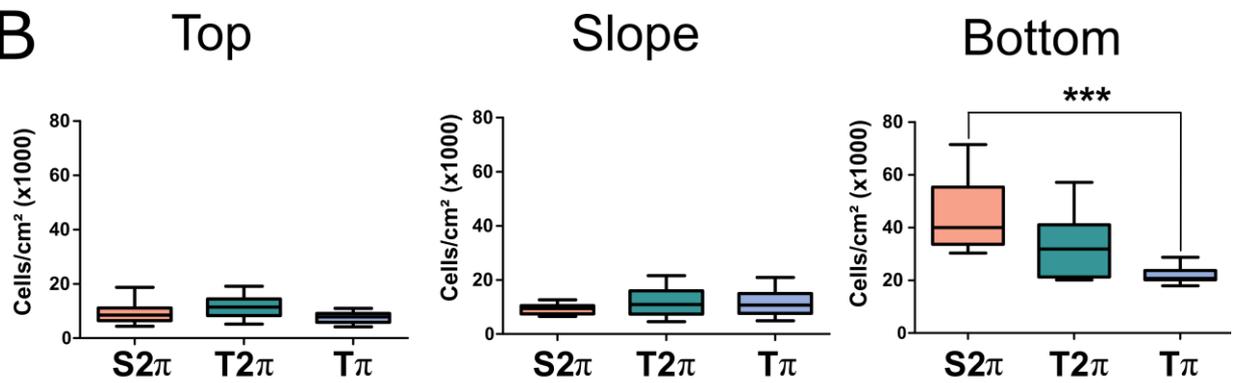


Figure 26 : Cell attachment on grooved ceramics after one hour.
 (A) Number of cells attached on the whole substrate. (B) Density of cells attached in the different areas of grooves (top, slope and bottom). N=10 ceramics/pattern (6 fields/ceramic). **:p<0.01, ***: p<0.001 vs other substrates. Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-hoc.

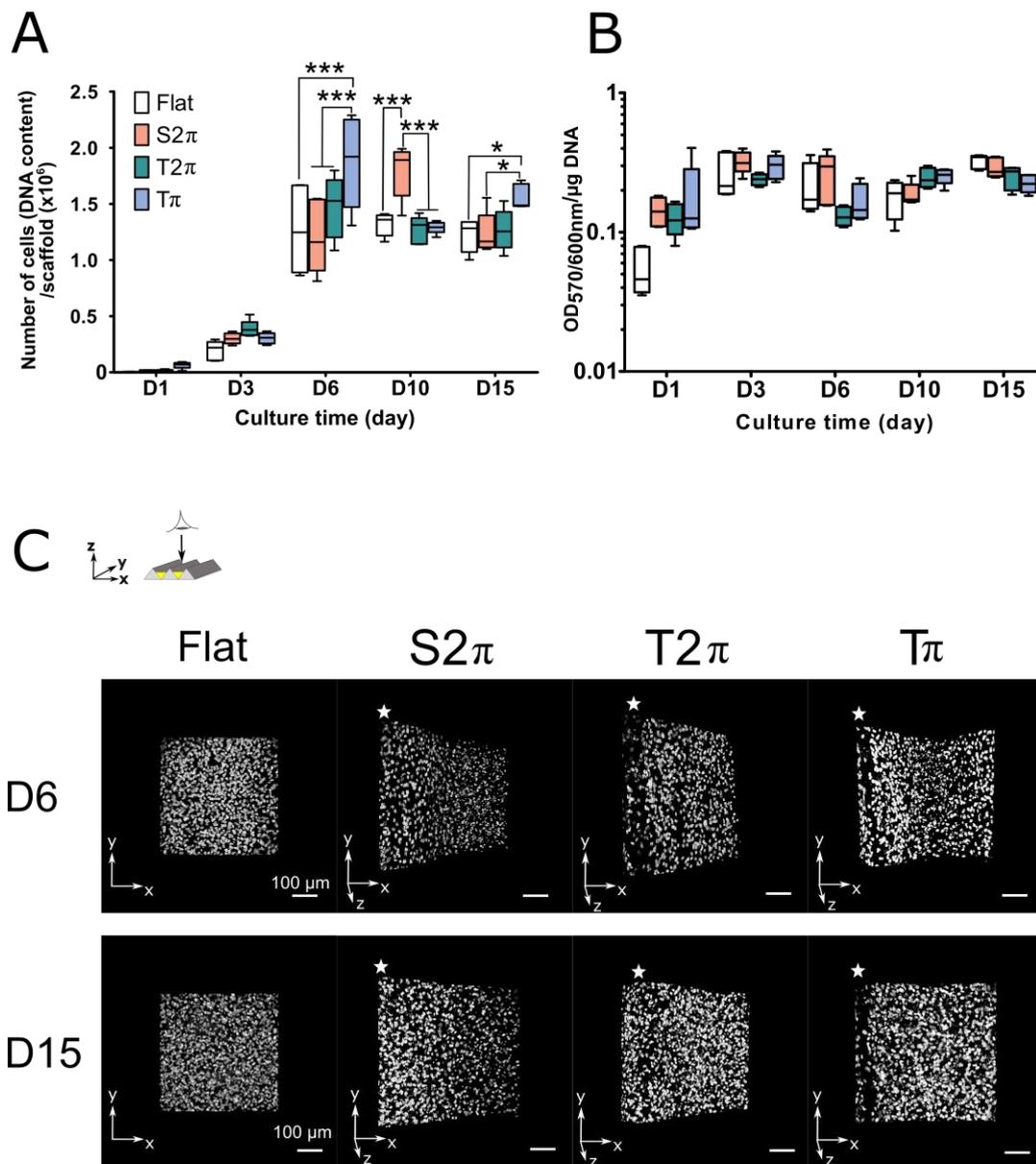


Figure 27 : Cell culture dynamics in grooved ceramics.

(A) Cell numbers and (B) metabolic activity, measured at successive days of culture on substrates, with S2 π , T2 π and T π patterns, as well as Flat controls ; note the log scale in B. N=5 materials/geometry. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ vs other substrates. Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-hoc test. (C) Z-stacked images of DAPI-stained cell nuclei distribution in each substrate geometry at D6 and D15. The white stars mark the top of the ridges. Scale bar = 100 μ m.

b. Extracellular matrix deposition

During the 15 days of culture, cells had formed a thick tissue in the macroarchitected ceramics, consisting in a network of ECM in which some cells were progressively embedded. The top of the tissue layed in the grooves was a curved shape cell layer (Figure 28A, bottom row). In the most open geometries ($S2\pi$ and $T2\pi$), the grooves were not completely filled by ECM at the end of culture time. In the $T\pi$ substrates, ECM nearly reached the top of the ridges (Figure 28A, white stars), as confirmed on ceramics sections (Figure 28A, bottom row). The thickness of the tissue layed by the cells was 3 to 5 fold higher in macroarchitected ceramics than in *Flat* controls ($p < 0.01$, Figure 28B). Tissue thickness was the same in the $S2\pi$ and $T\pi$ patterns, and significantly lower in the $T2\pi$ ceramics (Figure 28B). The total volume of ECM per substrate was two fold higher in the $S2\pi$ and $T2\pi$ geometries than in *Flat* controls ($p < 0.01$), reflecting differences in tissue thickness and in absolute available area/substrate (Table 1). Strikingly, it was twice higher in the $T\pi$ pattern than in the two other macroarchitectures (Figure 28C). Increase in cell planting density (40 000 to 140 000 cells/substrate) did not affect the volume of ECM layed either in *Flat* controls or in macroarchitected ceramics after 15 days of culture (data not shown). Reported to the available surface area and substrate volume, tissue volume remained higher in grooved ceramics, and particularly in the $T\pi$ pattern (Figure 28D-E).

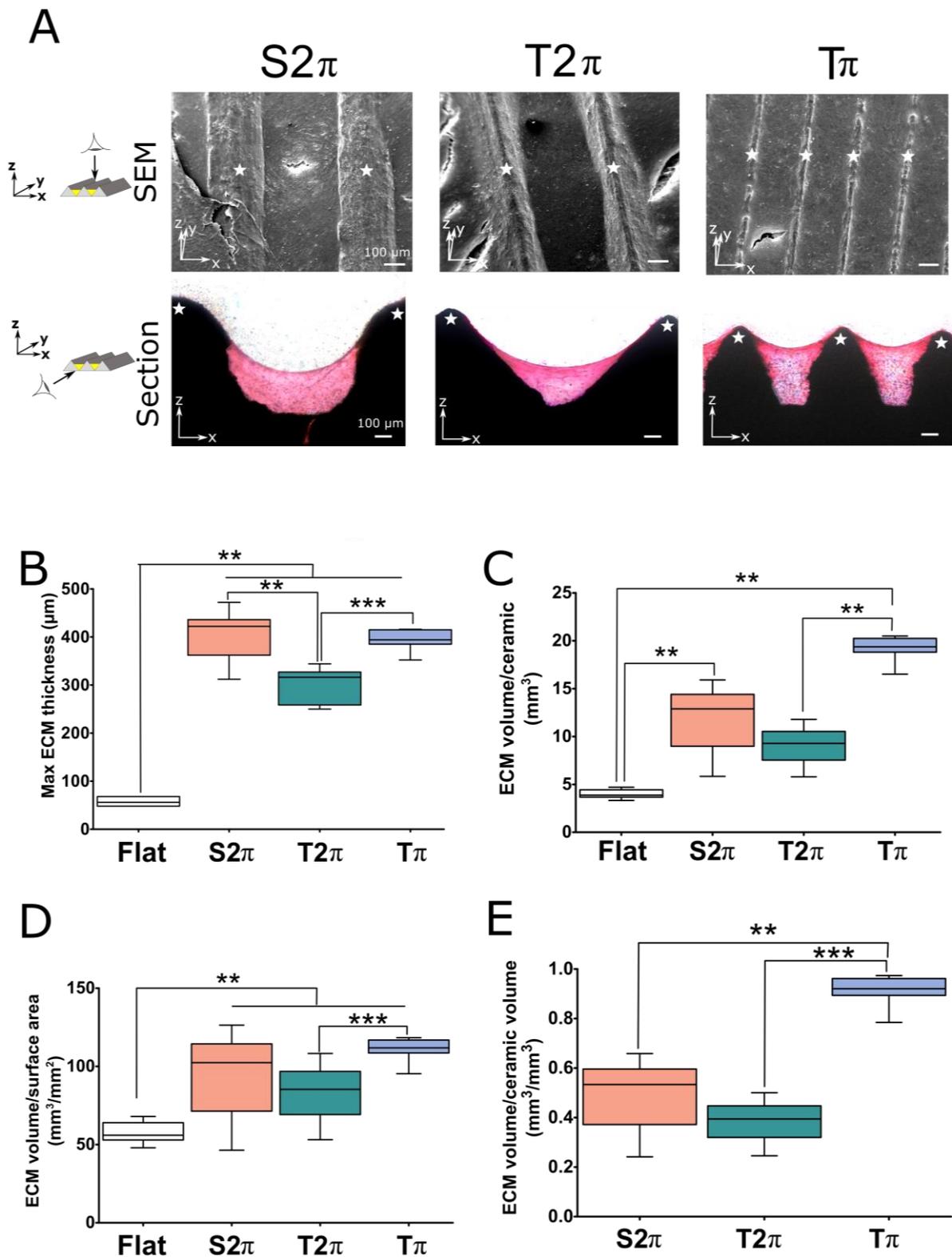


Figure 28 : Tissue deposition in the ceramics after 15 days of culture.

(A) Imaging of filled grooves in scanning electron microscopy (SEM, top row) and microscopic observations of sections in hematoxylin-eosin staining (section, bottom row). (B) ECM thickness was measured on confocal microscopy image stacks and (C) the total volume of tissue formed per ceramic was calculated. Tissue volume was normalized (D) to the available plating area and (E) to the available volume in the three macroarchitected substrates. $N=4$ ceramics/geometry, with 3 fields measured/ceramics. $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs other substrates. Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-hoc.

a. Cell viability

Evolution of cell viability after seeding on the HA ceramics was assessed with a Live/Dead fluorescent staining (Figure 29). Throughout the culture, most cells were stained with calcein AM (green), indicating that they were viable on the different substrates. At late culture times (D10 and D15), when the grooves began to be filled with ECM (Figure 29B), a few propidium iodide stained cells (PI+, red) appeared in all substrate types, either *Flat* or grooved (Figure 29A-B). PI+ cells were mostly located in the bottom of the grooves, colocalizing with viable cells in the tissue layers (Figure 29B). At the end of the cultures (D15), most cells were stained with calcein, indicating that cell viability was still preserved at this stage, and that substrates were not cytotoxic. On Flat controls, PI+ cells appeared from D6 (Figure 29A) but were absent on the grooved ceramics (Figure 29C). However, although no PI+ cells were detected in the most open geometries (S2 π and T2 π), a few was present in the late culture times (D10 and D15) in the T π pattern.

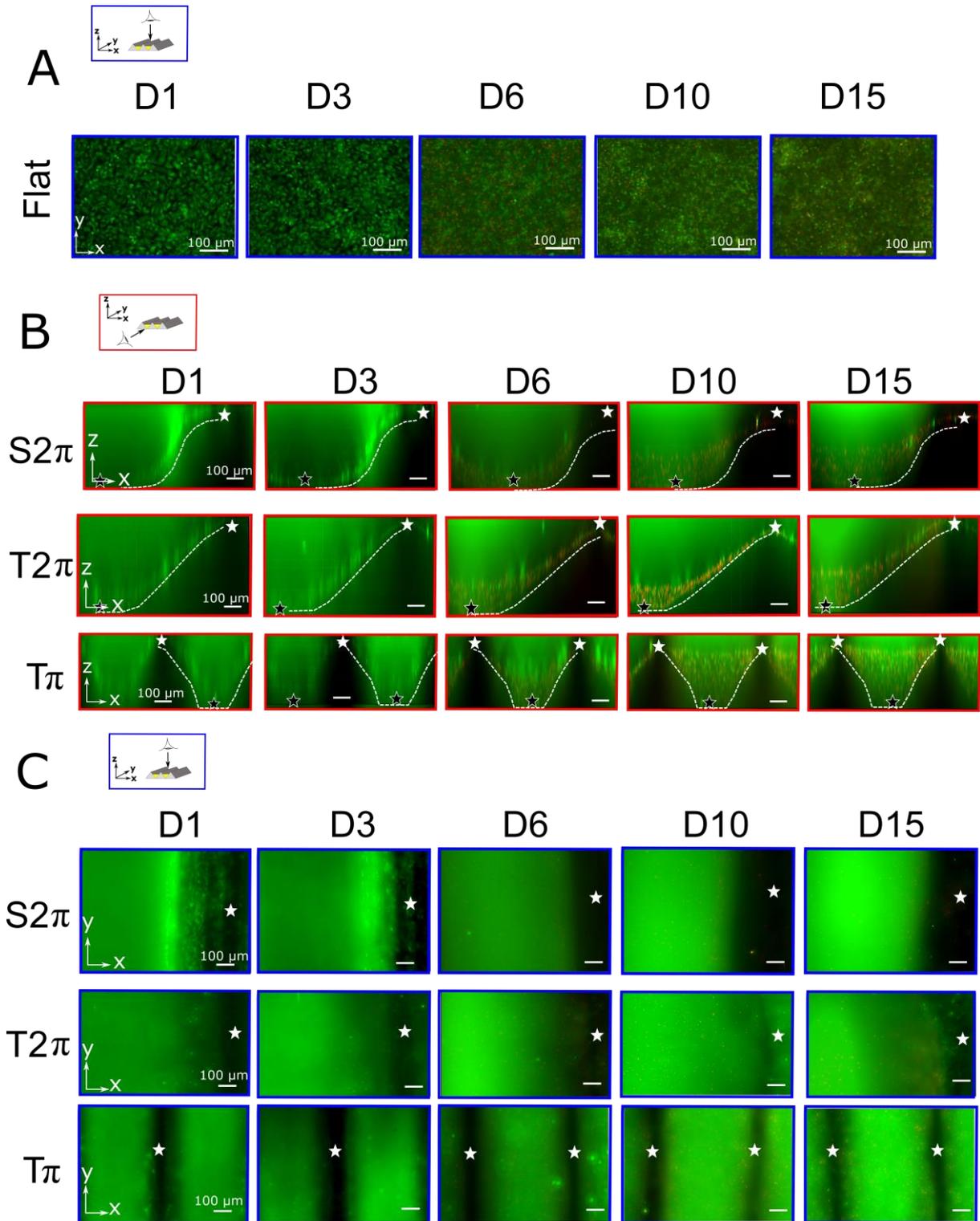


Figure 29 : Live/Dead labeling of calvaria cells grown on macroarchitected ceramics. Stack of images in top view, showing the surface of the cultures, (blue frame , A-C) were taken with a videomicroscope from D1 to D15 of the cultures, and Z-views (red frame, B) were reconstructed for the macrogrooved substrates. Living cells are stained in green by calcein AM, dying cells are stained in red by iodure propidium. The white dotted line marks the limits of the ceramic, the white stars mark the top of the ridges, the black stars mark the bottom of the grooves. Scale bar = 100 μm .

b. Osteoblast differentiation

Expression of the early osteoblast differentiation marker OPN by mouse calvaria cells during the 15 days of culture was assessed by qRT-PCR and ELISA (Figure 30A-B). On grooved substrates, OPN gene and protein expressions peaked at D6, followed by a decrease and a final surge of mRNA expression at D15 for the $T\pi$ ceramics (Figure 30A). Interestingly, OPN gene expression on *Flat* controls was at the same level at D8 as at D6 while it had already decreased on grooves at this point ($p < 0.01$), indicating a delay in OPN expression kinetic on *Flat* controls, compared to grooved ceramics. In the culture medium of macroarchitected ceramics, OPN protein concentration was detectable by D3 and peaked at D6 with a later decrease (Figure 30B). In contrast, OPN was not detectable in the medium of *Flat* controls before D10.

Confocal microscopy of cultures immunostained for fibronectin (FN) and OPN at D15 revealed their distinct localization inside the grooves (Figure 30C). FN was detected at the tissue-medium interface and in the upper part of the tissue layer. In the $S2\pi$ and $T2\pi$ substrates, OPN was mostly located at the bottom of the grooves, in the lower tissue layer, but also as a thin superficial labelling at the tissue-medium interface. In the $T\pi$ substrates, OPN was present in smaller amounts throughout the entire tissue layer than in the other patterns, with a stronger signal in the inner part of the grooves. Merging of the two labellings highlights the deeper presence of most OPN in all macrogrooves (Figure 30C).

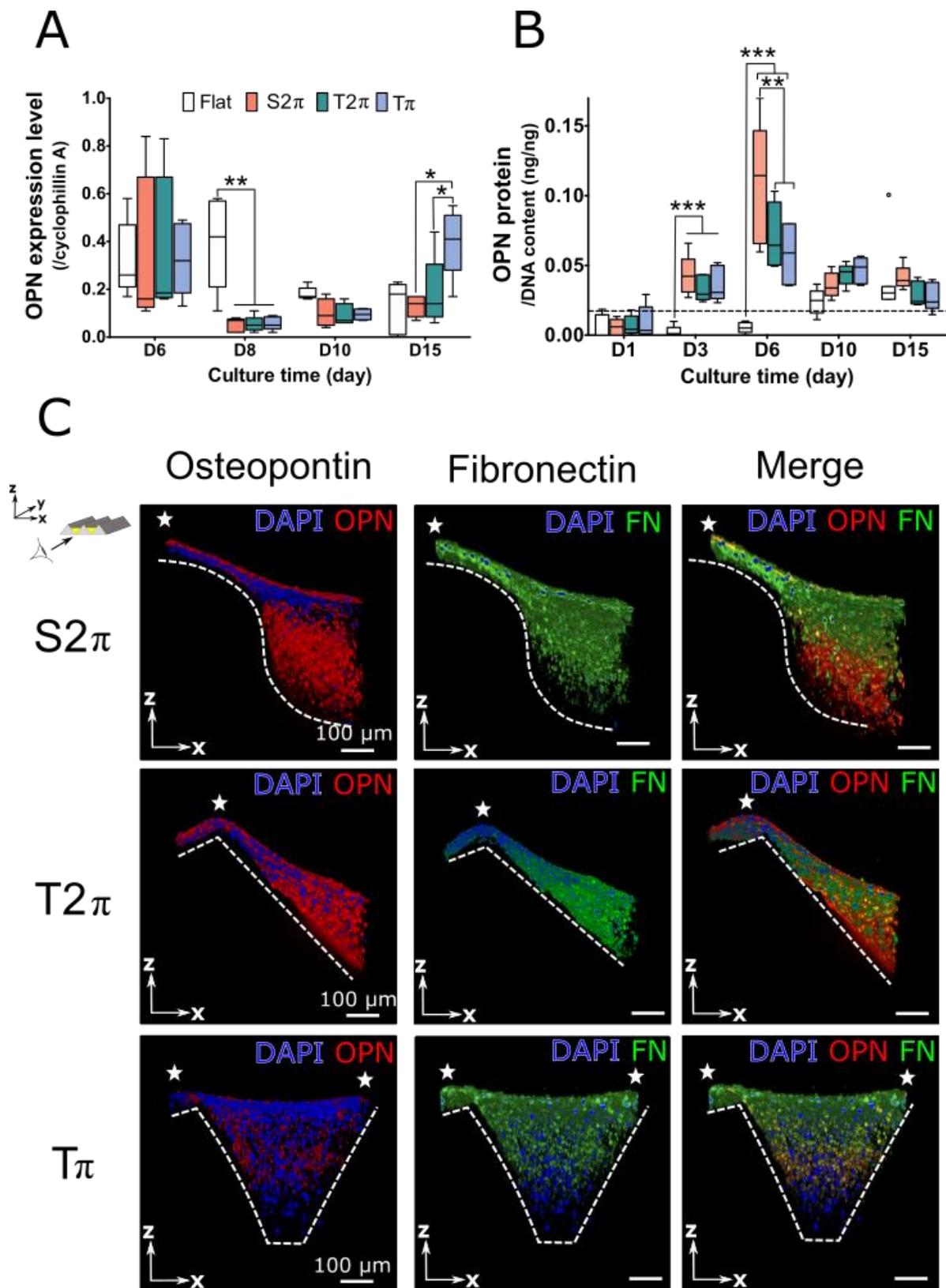


Figure 30 : Expression and distribution of OPN and FN in cultures.
 (A) Time course of OPN mRNA expression and (B) ELISA of OPN protein in the culture medium at successive days of culture in Flat and macrogrooved ceramics. The dot at D15 in B shows an extreme value. The sensitivity limit of the ELISA is given by the dotted line. N=5 ceramics/time point. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs other substrates. Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-hoc test. (C) 3D confocal reconstructions of immunolabelling for OPN (red) and fibronectin (green) in ceramics at D15 of the culture. DAPI labelled nuclei are blue. The white dotted line marks the limits of the ceramic, the white stars mark the tops of the grooves. Scale bar = 100 μ m.

Messenger RNA expression of OCN and sclerostin, respectively markers of mature osteoblasts and of osteocytes, was significantly expressed only after D10 (Figure 31A-C). OCN protein was barely detectable in the culture medium at D10 and reached significant levels at D15 only in the macroarchitected ceramics, most prominently in the angular grooves (Figure 31B). By D15, SOST, sclerostin gene, was highly expressed by cells grown in triangular grooves, reaching a very high, although variable, level in the $T\pi$ pattern (Figure 31C). A strikingly similar pattern was observed for sclerostin protein levels in the culture medium, with significant values already reached at D10 in the medium of $T\pi$ angular ceramics (Figure 31D).

After 15 days of culture on *Flat* substrates, some osteoblastic mineralized colonies were stained with Von Kossa (Figure 31E). However, because of the thin layer of tissue, no particular structure could be observed in sections (not shown). Von Kossa staining of sections of grooved ceramics revealed the presence of stained mineral deposits within the tissue layer (Figure 31E, yellow arrows). The bone-like tissue filling the grooves could be separated into two zones. An upper thin layer, superficial (Figure 31E, indicated by φ), consisting in ECM poorly stained by Von Kossa, displayed linear oriented perpendicularly to the axis of the grooves. This zone appeared thicker in the $T2\pi$ grooves than in the $S2\pi$ pattern, and seemed to extend down to the bottom of $T\pi$ grooves (Figure 31E). Deeper in the $S2\pi$ and $T2\pi$ tissue, the matrix appeared denser, randomly oriented and stained by Von Kossa in brown (collagen) or black (mineral). Mineral staining was either diffuse or condensed in spots (Figure 31E, yellow arrows). These mineralized structures, which sometimes resolved as star-shaped cells (Figure 31E, 3rd and 4th rows), were also present in the bottom part of the tightest geometry ($T\pi$) (Figure 31E, 2nd row).

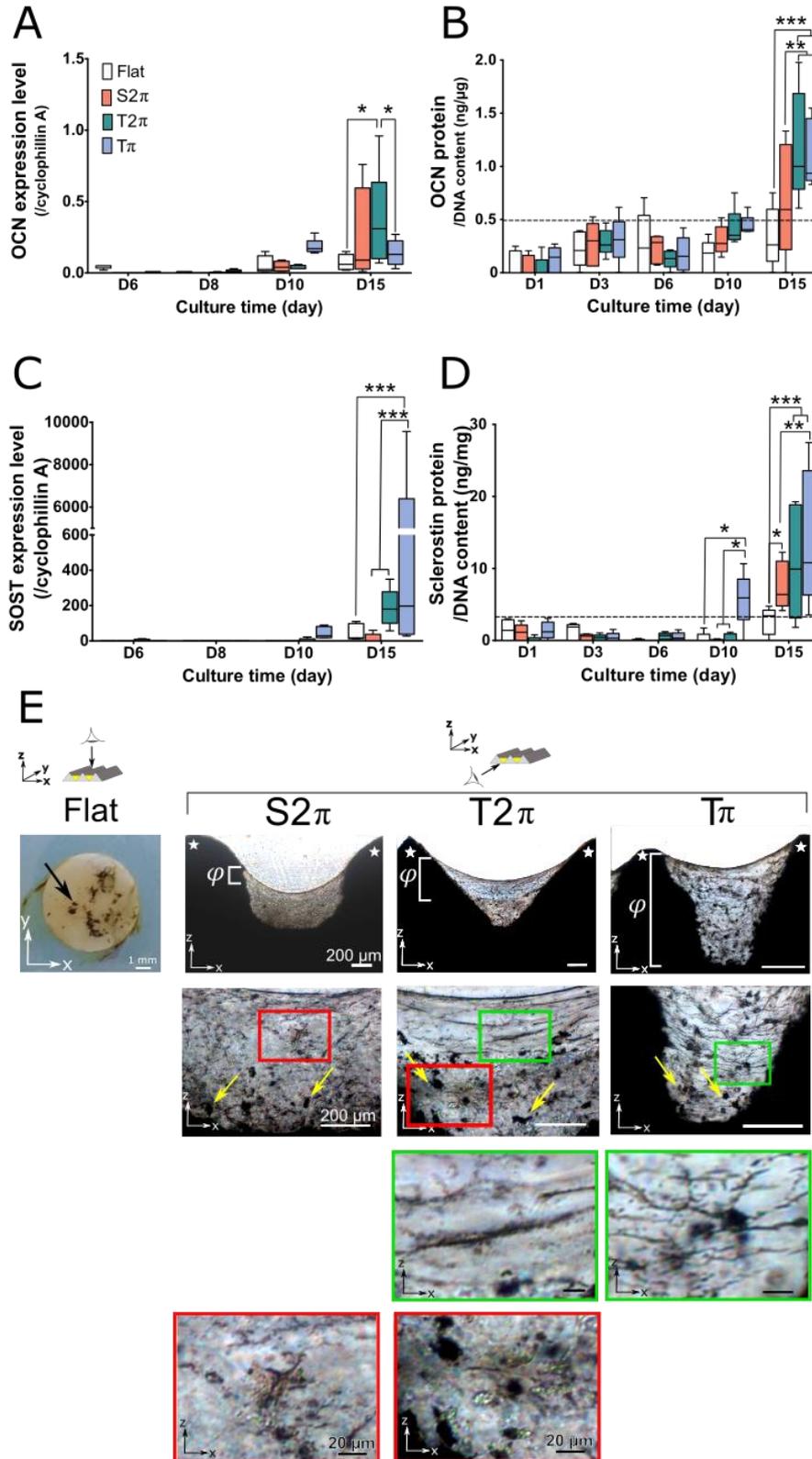


Figure 31 : Time course of expression of OCN and sclerostin in cell cultures on grooved substrates. Gene expression of (A) OCN and (C) SOST; protein expression in the culture medium of (B) OCN and (D) sclerostin, at successive days of culture in Flat and macrogrooved substrates. The sensitivity limit of the ELISA is given by the dotted line. (E) Von Kossa staining of calvaria cell cultures on Flat controls and of sections of embedded grooved substrates at D15. The white stars mark the tops of the ridges. The black arrow shows mineralized colonies on the Flat control, the yellow arrows the mineralized structures inside the ECM and the white line ϕ indicate the top layer of the tissue. $N=5$ ceramics/time point. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ vs other substrates. KruskalWallis test, with Dunn's post-hoc test.

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the impact of the macroarchitecture of HA bioceramics on osteoblastic behavior, and specifically on osteoblast differentiation, in order to promote osseointegration of implants *in vivo* and to optimize the design of scaffolds for *in vitro* three-dimensional bone tissue models. Our hypothesis was that macroarchitectures would promote osteogenesis, and in particular that the osteoblast differentiation of calvaria cells would be accelerated in the tightest geometries, due to an increase of cell-cell and cell-scaffold interactions (Nelson and Chen, 2002; Urquia Edreira et al., 2016).

In our study, we have shown that cells settle in higher density at the bottom of the grooves of macroarchitected ceramics, likely due to gravity effects on cells which landed on slanted « top » and « slope » areas. Cells attached in greater numbers on grooved ceramics, compared to *Flat* controls (Figure 26A), suggesting that adhesion to the bioceramics is promoted by the macroarchitecture. The differences in microtopography (Roughness, Figure 25) detect between the different patterns do not correlate either with plating efficiency (Figure 26) or with the dynamics of cell growth or metabolic activity (Figure 27). At D6, the $T\pi$ architecture displayed the highest DNA content (Figure 27B), suggestive of an early effect of substrate closure on growth rate. Higher metabolic activity at D1 on macrogrooved ceramics may result from higher cell density but also suggests a cell activity promoting effect of the macrotopography. As previously shown, cells are also able to sense structures of several hundred micrometers (Knychala et al., 2013), and in macroarchitectures the tissue growth rate has been shown to be proportional to the local curvature (Bidan et al., 2013; Rumpler et al., 2008). However, despite the fact that in our tightest geometry the final tissue volume layed was the highest in our tightest geometry, our results do not apparently support a strictly proportional relationship between tissue deposition and closure, as the amount of tissue layed in the $T2\pi$ grooves is lower than in the $S2\pi$ pattern.

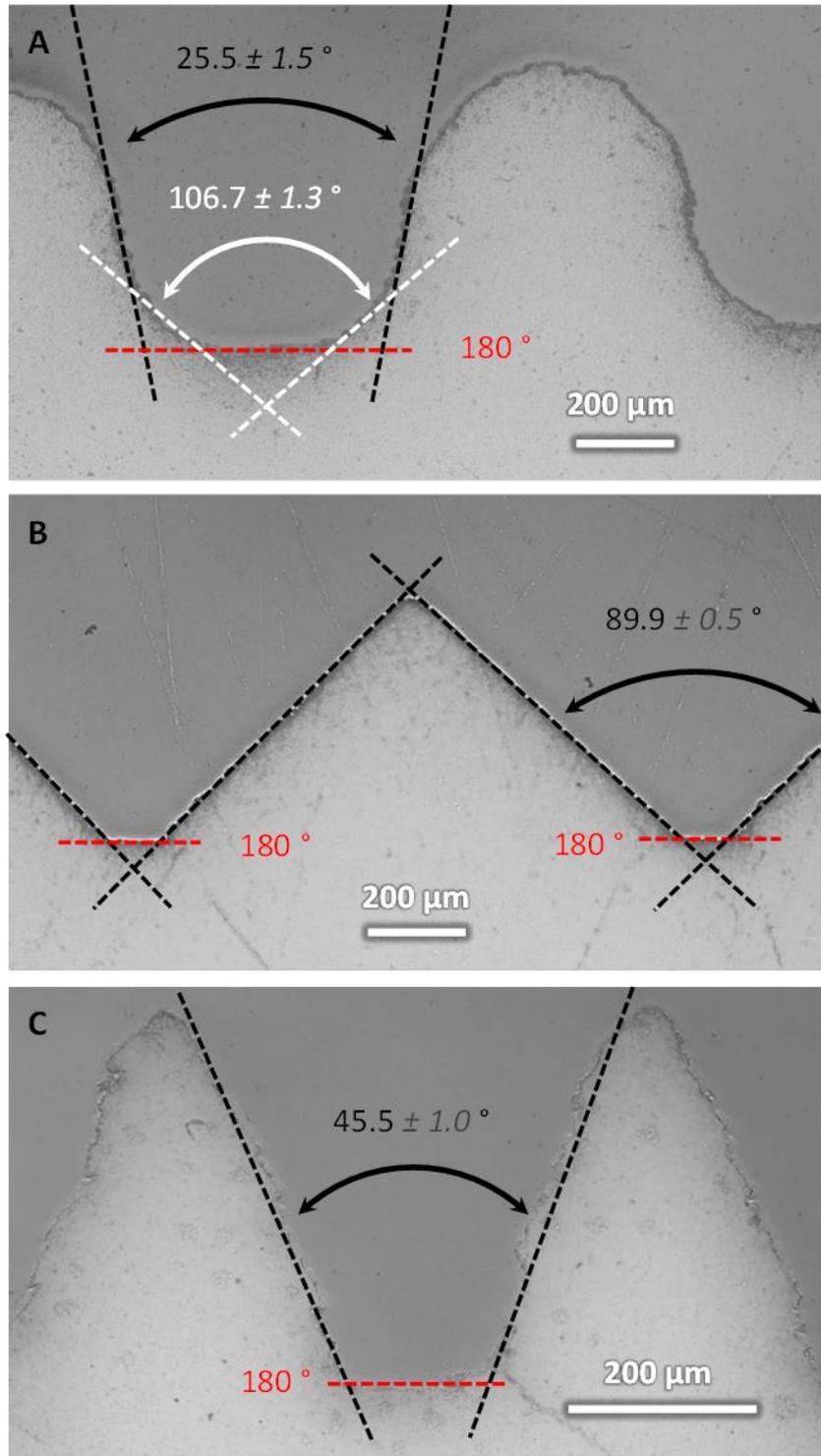


Figure 32 : Assessment of opening angles of the three macroarchitected substrates (A) $S2\pi$, (B) $T2\pi$ and (C) $T\pi$. The bottom of the groove is indicated by the red dotted line. Scale bar = 200 μm

Although larger at the bottom than the $T2\pi$ substrate ($\approx 107^\circ$, Figure 32), the opening angle of the sine waveform ($S2\pi$) substrate becomes tighter on the slopes ($\approx 26^\circ$), corresponding to an average angle of « 66° ». The geometry of the sinusoidal shape could explain both the higher tissue volume layed in its grooves compared to the $T2\pi$

substrate (tighter angle of the slopes) and the slower dynamics of the culture in the $S2\pi$ pattern (larger angle at the bottom) (Figures 27A-31). Of note, Rumpler et al. used the MC3T3-E1 cell line while in this study we grew mouse primary calvaria cells, which can both synthesize ECM and differentiate into mineralizing cells. As a cellular osteoblast model, primary calvaria cell cultures are directly pertinent to *in vivo* applications for skullcap defect repairs, but also of high general interest for *in vitro* models of osteogenesis (see (Mechiche Alami et al., 2016) for review) as they reproduce in culture the whole process of primary osteogenesis, permitting in particular the complete differentiation of the osteoblast lineage (Malaval et al., 1999), up to and including osteocytes (see below). Additionally, the heterogeneous cellular population extracted from the calvaria includes auxiliary cell types of high value for the *in vitro* reconstitution of a realistic bone microenvironment, such as dedicated macrophages (osteomacs, (Chang et al., 2008)). Others additional factors, such as different cell plating densities or distinct substrate chemical compositions might have contributed to the differences between our results and those of previous studies.

Fibronectin, a marker of immature bone ECM, is densely labeled in the top tissue layer in each pattern and absent from the bottom of the grooves only in the $T\pi$ macroarchitectures. Early FN deposition has been shown to be required for osteoblast differentiation and bone formation (Damsky, 1999) in a model in which cells would first lay down fibronectin and collagen, similar to what has been hypothesized for the closure-driven process of osteon formation *in vivo* (Parfitt, 1994). Interestingly, in the $S2\pi$ and $T2\pi$ macrogrooves, labeling for OPN, a early marker of osteoblast differentiation is distributed between two regions: in a thin layer at the top of the tissue and in higher amounts inside the ECM. These observations could be linked with OPN distribution within bone nodules grown on plastic, where OPN is present in the exterior layers, secreted by proliferative preosteoblastic cells, as well as inside the nodule, trapped in the matrix during ECM mineralization by mature osteoblasts (Bouet et al., 2015b; Liu et al., 1994). The surge of OPN level in qRT-PCR at D15 indeed fits with the maturation of bone extracellular matrix (Denhardt and Guo, 1993). However, no surge in assayable OPN is found in the culture medium, probably due to protein trapping within the mineralized matrix. Surprisingly, immunostaining signal of OPN in $T\pi$ macrogrooves was weaker than in other macroarchitectures. This could reflect the

masking of the antigen by the mineral or a different maturation/turnover of the ECM in a tissue that would be more advanced, as suggested by the lower FN labeling and the higher sclerostin expression.

Von Kossa staining highlights the presence of mineralized structures, including fibers within the matrix layered inside the grooves. While spots of mineralization matrix are visible in all three groove types, the layer of highly oriented matrix fibers increases in thickness with substrate closure, encompassing the whole tissue in the $T\pi$ substrates (Figure 31E). In these, mineralized fibers appear parallel to the bottom of the grooves on sections, i.e. perpendicular to the groove axis. This can reflect a « contact guidance » process, defined as the adjustment of cell and matrix orientation and alignment according to substrate geometry. While this has been well studied in nano and microgrooves ((Holthaus et al., 2012; Loesberg et al., 2007), (Knychala et al., 2013) observed that cells were no longer guided in structures larger than 200 μm . In our ECM-rich 3D cultures in $T\pi$ macrogrooves, a contact guidance process could be the consequence of a mechanical constraint exerted by the closed substrate on the tissue in contact, which would orient by proxy the laying/modeling of the rest of the tissue throughout the depth of the grooves. Other, more open geometries ($T2\pi$ and $S2\pi$), would apply less constraints on the cells and their ECM, resulting in a lessening/absence of this preferential orientation, except near the tissue-medium interface (Dalby et al., 2007; Knychala et al., 2013).

We observed that substrate closure also affected osteoblast differentiation, with an earlier and higher level of gene and protein expression of osteoblast markers OPN, OCN and ultimately sclerostin in macroarchitected ceramics. Osteoblast differentiation in $T\pi$ substrates is also faster, with important levels of both sclerostin gene and protein as early as D10. This clearly establishes the differentiation and activity of osteocytes within the tissue layered in the grooves (Poole et al., 2005). Thus, osteoblastic cells, trapped inside the matrix, would differentiate into osteocytes and induce matrix mineralization, similarly to what is observed in vivo (Bonewald, 2011; Clarke, 2008) at a much faster rate in closed macroarchitectures. Thus, the $T\pi$ macroarchitecture, with the most acute angle accelerates osteocyte differentiation respective to other macrostructures.

5. Conclusion

In this study, we fabricated macrogrooved bioceramics that could promote cell attachment, and proved to be non deleterious for long term cell culture. Our results suggest that osteoblast differentiation is promoted by angular structures, with a correlation between the angle of closure and the rate of osteoblast differentiation. Moreover, closure affects the organization of the ECM, in correlation with the promotion of osteogenesis. Bioceramics with closed, highly constraining macroarchitectural features could be used in bone tissue engineering to promote both osteoblast differentiation and abundant bone matrix formation, thus ensuring a fast osseointegration of implants as well as a model in basic research for testing drugs affecting osteoblast behavior.

Aknowledgements

The authors thank Dr Maura STRIGINI (INSERM U1059, Saint-Etienne, France) for helpful suggestions on the manuscript and Norbert LAROCHE and Sylvie PEYROCHE for their technical help. This work was funded by the French “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM) and the European Space Agency (ERISTO program, CCN n°8 ESTEC, contract number 4200014232 – formerly 14232/00/NN/SH). We gratefully acknowledge additional funding from the Rhône-Alpes Region (ARC2 program, PhD fellowship to LJ). The authors have no conflicting financial interests.

References

- Bellows, C.G., and Aubin, J.E. (1989). Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* 133, 8–13.
- Bidan, C.M., Kommareddy, K.P., Rumpler, M., Kollmannsberger, P., Fratzi, P., and Dunlop, J.W.C. (2013). Geometry as a Factor for Tissue Growth: Towards Shape Optimization of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials* 2, 186–194.
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26, 229–238.
- Bouet, G., Cruel, M., Laurent, C., Vico, L., Malaval, L., and Marchat, D. (2015a). Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold. *Eur Cell Mater* 29, 250-266-267.
- Bouet, G., Boulefour, W., Juignet, L., Linossier, M.-T., Thomas, M., Vanden-Bossche, A., Aubin, J.E., Vico, L., Marchat, D., and Malaval, L. (2015b). The Impairment of Osteogenesis in Bone Sialoprotein (BSP) Knockout Calvaria Cell Cultures Is Cell Density Dependent. *PLoS ONE* 10, e0117402.
- Brown, A.E.X., and Discher, D.E. (2009). Conformational changes and signaling in cell and matrix physics. *Curr. Biol.* 19, R781-789.
- Chang, M.K., Raggatt, L.-J., Alexander, K.A., Kuliwaba, J.S., Fazzalari, N.L., Schroder, K., Maylin, E.R., Ripoll, V.M., Hume, D.A., and Pettit, A.R. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 181, 1232–1244.
- Charbonnier, B., Laurent, C., and Marchat, D. (2016). Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization. *Journal of the European Ceramic Society* 36, 4269–4279.
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, S131–S139.
- Dalby, M.J., Biggs, M.J.P., Gadegaard, N., Kalna, G., Wilkinson, C.D.W., and Curtis, A.S.G. (2007). Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. *J. Cell. Biochem.* 100, 326–338.

Damsky, C.H. (1999). Extracellular matrix–integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* 25, 95–96.

Denhardt, D.T., and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 7, 1475–1482.

Faia-Torres, A.B., Charnley, M., Goren, T., Guimond-Lischer, S., Rottmar, M., Maniura-Weber, K., Spencer, N.D., Reis, R.L., Textor, M., and Neves, N.M. (2015). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study. *Acta Biomater* 28, 64–75.

Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316–323.

Holthaus, M.G., Stolle, J., Treccani, L., and Rezwan, K. (2012). Orientation of human osteoblasts on hydroxyapatite-based microchannels. *Acta Biomaterialia* 8, 394–403.

Knychala, J., Bouropoulos, N., Catt, C.J., Katsamenis, O.L., Please, C.P., and Sengers, B.G. (2013). Pore Geometry Regulates Early Stage Human Bone Marrow Cell Tissue Formation and Organisation. *Annals of Biomedical Engineering* 41, 917–930.

Lan Levensgood, S.K., Polak, S.J., Wheeler, M.B., Maki, A.J., Clark, S.G., Jamison, R.D., and Wagoner Johnson, A.J. (2010). Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 31, 3552–3563.

Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., and Aubin, J.E. (1994). Simultaneous Detection of Multiple Bone-Related mRNAs and Protein Expression during Osteoblast Differentiation: Polymerase Chain Reaction and Immunocytochemical Studies at the Single Cell Level. *Developmental Biology* 166, 220–234.

Loesberg, W.A., te Riet, J., van Delft, F.C.M.J.M., Schön, P., Figdor, C.G., Speller, S., van Loon, J.J.W.A., Walboomers, X.F., and Jansen, J.A. (2007). The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials* 28, 3944–3951.

Magnaudeix, A., Usseglio, J., Lasgorceix, M., Lalloue, F., Damia, C., Brie, J., Pascaud-Mathieu, P., and Champion, E. (2016). Quantitative analysis of vascular colonisation and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model. *Acta Biomater* 38, 179–189.

Malaval, L., Liu, F., Roche, P., and Aubin, J.E. (1999). Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 74, 616–627.

Mechiche Alami, S., Gangloff, S.C., Laurent-Maquin, D., Wang, Y., and Kerdjoudj, H. (2016). Concise Review: In Vitro Formation of Bone-Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration. *Stem Cells Transl Med.*

Melchels, F.P.W., Domingos, M.A.N., Klein, T.J., Malda, J., Bartolo, P.J., and Hutmacher, D.W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science* 37, 1079–1104.

Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2002). Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters* 514, 238–242.

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, 273–286.

Poole, K.E.S., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., and Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 19, 1842–1844.

Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W., van Dongen, J.T., and Fratzl, P. (2008). The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface* 5, 1173–1180.

Saiz, E., Zimmermann, E.A., Lee, J.S., Wegst, U.G.K., and Tomsia, A.P. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent Mater* 29, 103–115.

Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., and Best, S.M. (2012). Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 23, 2335–2347.

Trappmann, B., and Chen, C.S. (2013). How cells sense extracellular matrix stiffness: a material's perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 948–953.

Urquia Edreira, E.R., Hayrapetyan, A., Wolke, J.G.C., Croes, H.J.E., Klymov, A., Jansen, J.A., and van den Beucken, J.J.J.P. (2016). Effect of calcium phosphate ceramic substrate geometry on mesenchymal stromal cell organization and osteogenic differentiation. *Biofabrication* 8, 25006.

Xia, L., Lin, K., Jiang, X., Fang, B., Xu, Y., Liu, J., Zeng, D., Zhang, M., Zhang, X., Chang, J., et al. (2014). Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials* 35, 8514–8527.

II. Conclusions et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que la macroarchitecture influence fortement le comportement des cellules ostéoblastiques. En particulier, la cinétique de différenciation ostéoblastique semble être accélérée sur les biocéramiques macroarchitecturées, par rapport au substrat plat (Flat), comme en témoigne l'expression génique et protéique de l'OPN. De plus, plus la courbure est importante ($T\pi > T2\pi > S2\pi > \text{Flat}$), plus les cellules parviennent à un stade de différenciation avancée. L'état de différenciation ostéoblastique semble suivre l'importance de la fermeture du substrat, sans toute fois affirmer l'existence un effet strict de proportionnalité.

Le simple ajout de sillons macroscopiques stimule fortement le volume de MEC déposé par les cellules de calvaria, jusqu'à 4 fois plus. Dans la géométrie la plus aigüe ($T\pi$) et uniquement dans celui-ci, les fibres minéralisées de la MEC ont une orientation perpendiculaire à l'axe du sillon. Comme décrit par Bidan et al. dans son modèle théorique, en réponse à une courbure locale, les cellules forment des cordes d'actine, ce qui pourrait provoquer une synthèse stimulée de MEC. De plus, cette orientation des fibres minéralisée dans les sillons les plus fermés ($T\pi$) pourrait être dû à une sorte de contrainte passive exercée par le substrat sur le tissu en croissance, diluée au fur et à mesure que la structure s'ouvre. De plus, la maturation de la MEC semble se faire en deux temps, comme le suggère la coloration Von Kossa et les immunomarquages pour l'OPN et la FN. Nous n'avons malheureusement pas réussi à réaliser d'immunomarquages pour les marqueurs tardifs ostéoblastiques (OCN) et ostéocytaires (SOST), n'ayant pas pu trouver d'anticorps primaires satisfaisant et/ou de protocole adéquat. Cela constitue une limite de ce travail car nous n'avons pas pu visualiser directement d'ostéocytes, bien que la mise en évidence de l'expression de sclérostine à la fois en qRT-PCR et en ELISA nous permet raisonnablement d'affirmer leur présence au sein de notre tissu osseux.

Afin de mieux comprendre le phénomène de « contact guidance » sous-jacent à l'orientation de la matrice dans les sillons $T\pi$, une étude approfondie des comportements cellulaires dans ces cultures et fait l'objet d'un second article.

B. Etude 2 : Rôle de la macroarchitecture sur l'orientation cellulaire et son influence sur la croissance tissulaire

I. Exposé des travaux (Article 2, en préparation)

Impact of substrate macroarchitecture on osteoblast cell orientation and extracellular matrix deposition

Laura JUIGNET¹, Baptiste CHARBONNIER^{1,2}, Alain GUIGNANDON¹, Virginie DUMAS³, Wafa BOULEFTOUR¹, Coralie LAURENT^{1,2}, Laurence VICO¹, David MARCHAT^{1,2}, Nathalie DOUARD^{1,2}, Luc MALAVAL¹

¹Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéoarticulaires, INSERM, U1059, Saint-Etienne, F-42023, France

²Ecole des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie Santé, Campus Santé Innovations, Saint-Etienne, F-42023, France

³Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint Etienne, LTDS, UMR 5513 CNRS, Saint-Etienne, F-42023 France

Abstract

During the last twenty years, the impact of nano and micro-topographies on cell behavior and the mechanisms involved have been well documented. However, little is known on the manner in which geometry can affect tissue growth and specially osteoblast differentiation at macroscale, i.e. in structures larger than 100 μm . In this study, mouse calvaria cells were grown on hydroxyapatite (HA) bioceramics textured with different macrogrooves of increased degrees of closure: 1 sine and 2 triangle waveforms. We show that osteoblastic cells are able to sense and response to the local and macro-environment. A dense layer of mineralizing matrix was layed down in the macrogrooves. This tissue embedded cells in which stress fiber orientation was determined by the degree of closure of the macrogrooves, showing massive alignment perpendicular to the groove axis in the tighest geometry, a triangle waveform with a 517 μm spatial period (named $T\pi$). Nucleus deformation analysis showed a progressive rounding when going deeper in the tissue layer, in all geometries but the $T\pi$ pattern in which nuclei elongated toward the bottom of the grooves. However, no preferential orientation of cell nuclei was observed deeper than the tissue-culture medium interface, which may reflect a major influence of mineralization on embedded bone cells or singularities of their response to constraints in a 3D microenvironment.

Keywords: macrotopography, nucleus deformation, actin stress fibers, ECM orientation

1. Introduction

Cells interact with their environment, through chemical and mechanical signals, adapting their behavior to these stimuli. They can sense and react to various scales of topography, from structures smaller than 10 nm to patterns larger than several hundred micrometers (Dalby et al., 2004; Rumpler et al., 2008). Numerous studies on engineered substrates with defined topography have shown that nano (<100 nm) and microscale (<100 μm) patterns influence cell behavior, such as attachment, spreading and migration (Dumas et al., 2015; Jeon et al., 2010; Nguyen et al., 2016). However, the impact of macrotopography remains little explored, despite the fact that cells in vivo, and more particularly bone cells, are in direct contact with macrostructures such as trabeculae. The cell impact of substrate geometry has been studied through theoretical models, which suggest that tissue growth would be proportional to the local curvature/closure of the substrate (Bidan et al., 2012; Gamsjäger et al., 2013). Cells would react to the macroarchitecture by generating actin chords, also called stress fibers (Hirata et al., 2007; Rumpler et al., 2008). Stress fibers (SF), mostly made of actin microfilaments, are cytoplasmic structures involved in cell migration, mitosis, morphogenesis and mechanotransduction, and required for cell response to mechanical forces (Tojkander et al., 2012).

To explore the spatial relationship between bone cells and their environment at a tissue level, we used bioceramics textured with macroscopic grooves (Juignet et al., submitted) in which osteoblastic cells differentiate and lay down an abundant and complex network of extracellular matrix. As described previously (Juignet et al., submitted), extracellular matrix (ECM) synthesis is highly stimulated in macrogrooved substrates. Moreover, triangular grooves promote osteoblast differentiation, and mineralized fibers display a preferential orientation in the tightest geometry. To highlight the mechanisms involved in the cell response to substrate macroarchitecture, we analyzed cell behavior and matrix deposition by growing mouse calvaria cells on macrogrooved CaP bioceramics of different degrees of closure. Our hypothesis was that macroarchitectures will affect the mechanical stress experienced by the cells and orient cytoskeletal structuration and deposition of ECM components, resulting in a higher degree of orientation in the tightest geometries.

2. Material and methods

a. Scaffold design and synthesis

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) bioceramics with macroscopic grooves were produced through an additive manufacturing process, detailed in Charbonnier et al., 2016. Briefly, wax molds were produced by 3D printing and impregnated with a hydroxyapatite suspension. Molds were removed with a heat treatment at 500 °C for 2 hours (h), followed by a sintering at 1200 °C for 2 h. HA scaffolds display three different grooved macroarchitectures: 1 sine and 2 triangle waveforms with spatial period of $1247.2 \pm 6.6 \mu\text{m}$ (named $\text{S}2\pi$), $1243.5 \pm 8.2 \mu\text{m}$ (named $\text{T}2\pi$) and $517.0 \pm 8.7 \mu\text{m}$ (named $\text{T}\pi$), respectively (Figure 33). Scaffold diameters were $9.39 \pm 0.03 \text{ mm}$ for Flat controls, $10.59 \pm 0.03 \text{ mm}$ for $\text{S}2\pi$, $10.56 \pm 0.03 \text{ mm}$ for $\text{T}2\pi$ and $10.59 \pm 0.04 \text{ mm}$ for $\text{T}\pi$. Respective groove depth in the 3 microarchitectures were $603.1 \pm 10.4 \mu\text{m}$ for $\text{S}2\pi$, $532.2 \pm 11.0 \mu\text{m}$ for $\text{T}2\pi$ and $424.9 \pm 11.5 \mu\text{m}$ for $\text{T}\pi$. The HA area available for culture was $69.2 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ in Flat controls, $125.8 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ in $\text{S}2\pi$, $108.8 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ in $\text{T}2\pi$ and $173.2 \pm 7.1 \text{ mm}^2$ in $\text{T}\pi$. Measurements were done on 3 ceramics/geometry (for diameter and area) and 8 grooves/each of 3 ceramics (for groove depth). All values are mean \pm standard deviation of $N=3$ ceramics.

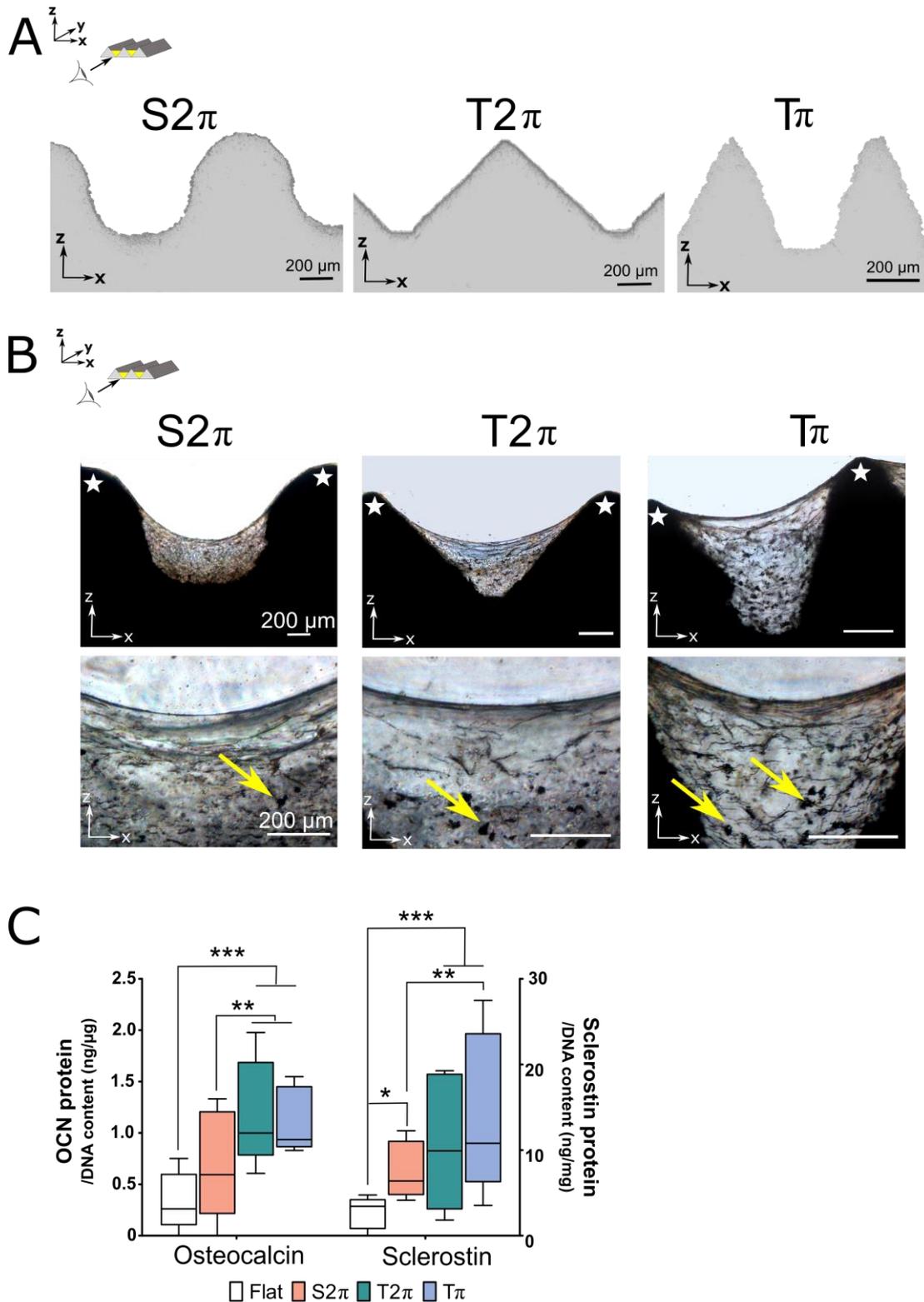


Figure 33 : Osteogenic cultures in the three macroarchitected bioceramics. (A) Images of the three different grooves bioceramics were acquired in optical microscopy after section and Von Kossa staining. Scale bar = 200 μ m. (B) Observations of ECM after Von Kossa staining on macroarchitected scaffolds after 15 days of culture. The white stars marks the tops of the ridges. The yellow arrows show mineralized structures inside the ECM. Scale bar = 200 μ m. (C) Osteocalcin and sclerostin concentrations in the culture medium of scaffold cultures, assessed by ELISA after 15 days of culture. N=5 scaffolds. \$: $p < 0.05$, \$\$\$: $p < 0.001$ between Flat vs grooved scaffolds, **, $p < 0.01$ vs other grooved scaffolds. KruskalWallis test, with Dunn's post-hoc test.

b. Cell culture

Mice (mixed 129sv/CD1 outbred background) were housed and bred in the PLEXAN facility (Platform of Experiments and Analysis, Faculty of medicine, University of Saint-Etienne, France). The procedures for care and killing of the animals were in accordance with the European Community Standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Nr C-18 0801). All animal experiments were approved by the « Comité du Bien-Etre Animal » (Animal welfare committee) of the PLEXAN. Mice were kept at standard temperature (22 ± 1 °C), in a light controlled environment (12 h light/12 h dark cycle). Animals were fed a standard pellet diet (A03 food, Scientific Animal Food and Engineering, Aury, France) and were allowed water ad libitum. Four day-old mice were killed by decapitation and the skull caps (calvaria) were dissected out. The calvaria were isolated, cleaned of all connective tissues, cut along the sagittal suture and pooled (Bellows and Aubin, 1989). The fragments were then digested at 37 °C in 0.2 % (w/v) type IV collagenase (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) in Ham's Nutrient Mixture F-12 (Sigma), under gentle stirring. Cells, extracted during the first 5 minutes (min) of digestion and six consecutive digestions of 5 to 15 min, were collected. After centrifugation, calvarial cells were pooled, filtered and plated in T-75 flasks in Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50 µg/ml streptomycin (Sigma) and 10 % (v/v) fetal calf serum (FCS, Biowest, Nuaille, France), hereafter referred as "culture medium". After 24 h, the cells were trypsinized and plated at 40 000 cells/scaffold. To induce osteogenesis, the culture medium was supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma) and 10 mM β-glycerophosphate (Sigma). Cell culture was performed at 37 °C under 5 % CO₂, and culture medium was changed every other day.

c. Sections

At day (D) 15 of culture, bioceramics were washed in PBS, fixed with 3.7 % PFA, dehydrated in acetone and embedded in methylmetacrylate. Blocks were cut with a diamond wire (ESCIL, Chassieu, France) at a 200 µm thickness. Sections were stained with Von Kossa, mounted and observed under an optical microscopy (Zeiss).

d. ELISA assays

After 15 days of culture, ELISA assay was performed on culture medium to measure osteocalcin (OCN, 60-1305, Immunotopics) and sclerostin (MSST00, R&D Systems) concentrations according to the manufacturer's instructions. Each sample was run in duplicate in the assays. Measurements were corrected for fresh culture medium values and normalized to DNA content.

e. Analysis of structure orientation

At D6 and D15, the cells were fixed in 3.7 % (w/v) buffered paraformaldehyde solution (PFA), for 15 min at room temperature, then rinsed in PBS. To label nuclei, the samples were incubated with 10 µg/ml 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma) for 20 min at room temperature. To label actin stress fibers, the samples were permeabilized for 3 min by 0.1 % Triton X-100, rinsed in PBS and incubated with rhodamine-phalloidin (1:50, Invitrogen) and 10 µg/ml DAPI (Sigma) for 45 min at 37 °C. Scaffolds were observed with a multiphoton confocal microscope (Nikon A1R MP Plus®, Tokyo, Japan) and images acquired with the NIS-Elements software (Nikon), with a 4 µm step along the Z-axis. Image analysis was performed with the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). After background removal, the « Directionality » plugin was used to determine the orientation of nuclei or stress fibers on each image of the stack. Degree (°) 0 is defined as parallel to the Y-axis of the scaffolds, i.e. to the top of the ridges; 90° is parallel to the X-axis, thus perpendicular to the groove orientation. Results are given in percentage of nuclei or stress fibers with a given orientation (2° steps) in each image of the stack, i.e. at increasing distance from the bottom of the groove (Z-axis). Three fields (450x450 µm) were analyzed in 3 different grooves of each of 4 different ceramics, seeded and grown with 4 different cell isolates.

f. Analysis of nucleus shape

Nuclei from D6 and D15 DAPI labeled scaffolds were imaged with the multiphoton confocal microscope. Image analysis was performed with the ImageJ software. After background removal, the « Shape descriptors » plugin was used to determine the cellular shape factor on each image of the stack. A « shape factor » (f) = 1 corresponds to a perfectly round shape; f decreases with nucleus elongation.

g. Statistical analysis

Quantitative data are presented as box-plots, with Min to Max whiskers. Statistical analysis was performed with the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test, using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3. Results

a. Times course of in vitro bone tissue formation in macrogrooved HAP scaffolds

After 15 days of culture, cells had laid an important network of extracellular matrix (ECM), which even reached the top of the ridges in $T\pi$. Von Kossa staining on sections revealed the presence of mineralized fibers, oriented parallel to the groove axis in $T\pi$ but with no preferential orientation in $S2\pi$ and $T2\pi$ (Figure 33B, detailed in Juignet et al.). Protein expression of OCN and sclerostin, respectively late osteoblast and osteocyte markers, was higher in the triangle waveforms, and more particularly in the $T\pi$ pattern (Figure 33C, detailed in Juignet et al., submitted).

b. Cytoskeleton dynamics: actin stress fibers

At D6 and D15, actin stress fibers were observed with confocal microscopy after phalloidin staining (Figure 34). On Flat HA substrates, cells had a very spread morphology and displayed abundant stress fibers, at all depth in the tissue and at both culture times investigated. In contrast, on grooved scaffolds, stress fiber formation and abundance varied according to depth and culture time. At the tissue-culture medium interface, there were more stress fibers at D6 on the $T2\pi$ pattern, compared to the two other geometries (Figure 34A, top row). After 15 days of culture, stress fiber density in the top tissue layers of macrogrooved scaffolds appeared higher and similar to the Flat controls (Figure 34B, top row).

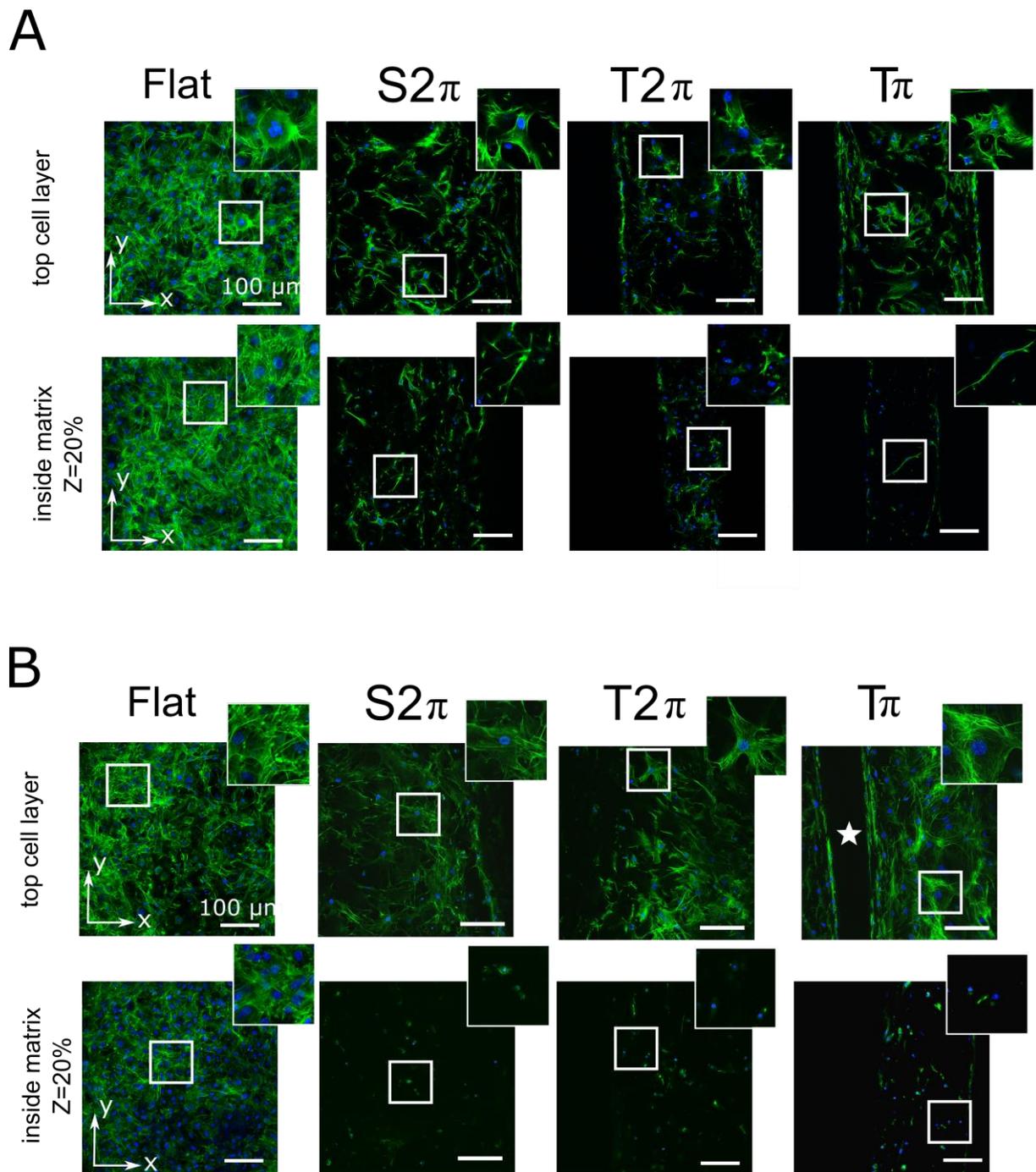


Figure 34 : Actin stress fibers distribution in cultures on macrogrooved scaffolds.
 (A) Fluorescent microscopy imaging of actin stress fibers at 6 days (top row) and 15 days (bottom row) of culture. Stress fibers are labeled with phalloidin (green) and nuclei with DAPI (blue). The « Top Cell Layer » row shows the tissue layer-culture medium interface, whose thickness varies with time and pattern. The « Inside Matrix » row shows a slice of the tissue layer at $Z=20\%$ of the height of the grooves on macrogrooved scaffolds and $Z=20\ \mu\text{m}$ on Flat controls (see Materials & methods for details). The white star marks the top of the ridge, the white frame correspond to the zoomed area. Scale bar = $100\ \mu\text{m}$.

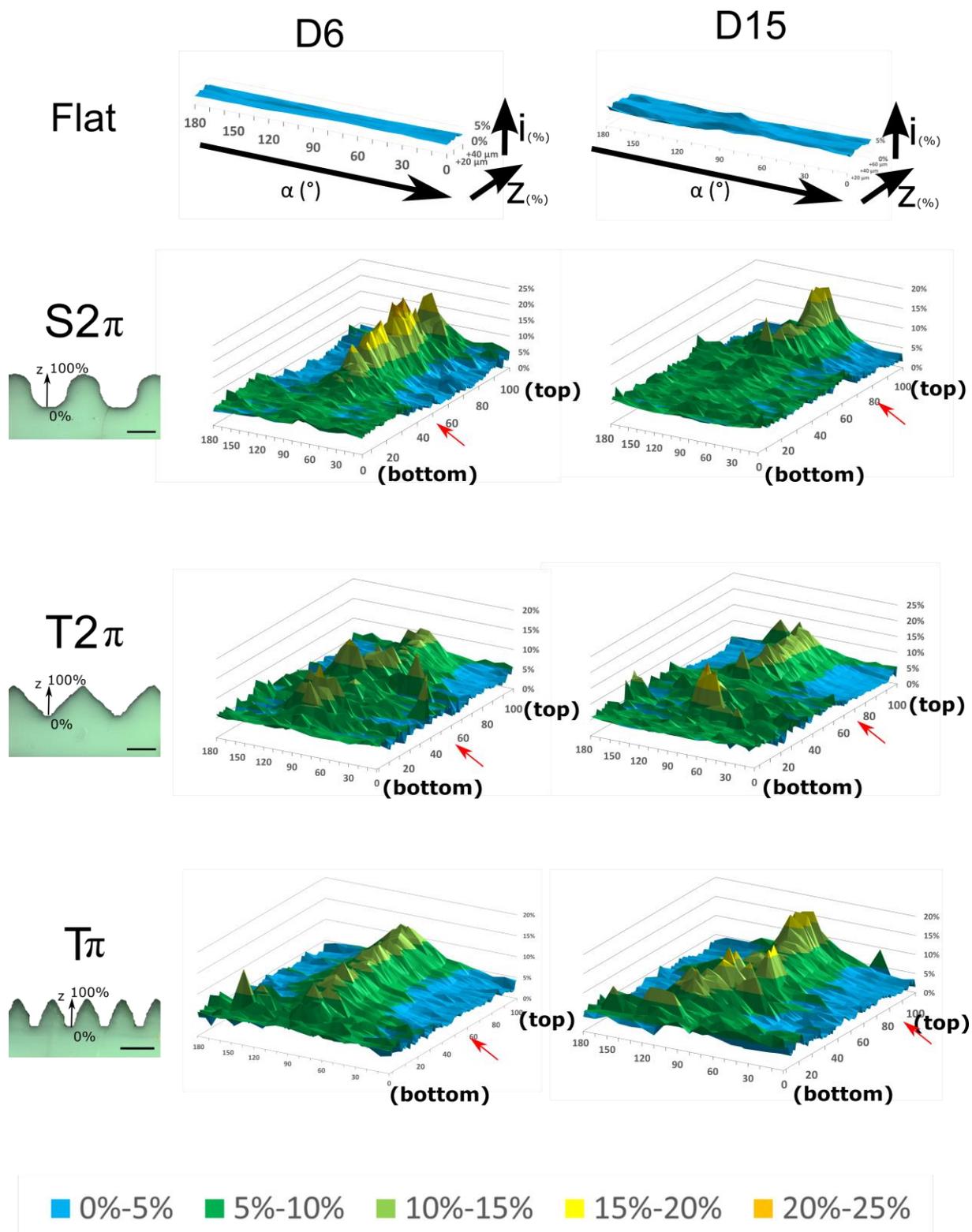


Figure 35 : Quantitative analysis of the orientation of actin stress fibers in cultures on macrogrooved scaffolds. The orientation angle $\alpha=0^\circ$ is defined as parallel to the top of the ridges (= Y-axis). Depth (Z) is expressed in percentage of height for macrogrooved scaffolds, with 0% at the bottom of the groove and 100% at the top of the ridge. The red arrow marks the tissue-culture medium interface. The proportion of actin stress fibers with a given orientation α angle (i) is shown in the vertical dimension. Values for (i) have been distributed in 5% classes, each identified by a color code (see legend at the bottom of the Figure). Each 3D picture thus maps the proportion (i) of stress fibers found oriented at a given angle (α), at a given depth (Z) in the grooves. Mean ($n=4$ scaffolds, with 3 fields/scaffolds).

c. Nucleus shape and orientation

Shape and orientation of DAPI stained nuclei were quantified at D6 and D15 of the cultures. On Flat controls, the average nucleus shape factor remained around $f \approx 0.7-0.8$, near to circular (Figure 36). On $S2\pi$ and $T2\pi$ macroarchitectures at D6, nucleus shapes showed a linear trend between the tissue-medium interface and the bottom of the grooves, from a more elongated shape in the top part of the tissue layer ($f \approx 0.5$) to a roundish shape, similar to Flat controls at the bottom ($f \approx 0.8$, Figure 36). D15 cultures showed the same linear trend, but with a shift to higher values, i.e. overall more roundish shapes, especially in the $S2\pi$ pattern ($f \approx 0.9$ at the bottom). In $T\pi$, at D6, nuclear shapes followed the same linear trend observed in the $S2\pi$ and $T2\pi$ patterns. Strikingly, at D15, this trend was reversed. While the nuclei at the top of the tissue layer (between $Z=100\%$ and $\approx 80\%$) showed the same drive towards higher f (at $Z=80\%$, $f \approx 0.6$), deeper cells showed a progressive and strikingly proportional increased nucleus elongation, down to $f \approx 0.4$ for $Z=0-10\%$. A statistical analysis of the spatial orientation of the major axis of cell nuclei was performed with the same protocol used for stress fibers (Figure 37). It revealed a bimodal distribution of nucleus orientation at the tissue-medium interface (i.e. for Z values above the red arrow) in the $S2\pi$ pattern, with a 90° peak and two peaks at 0° and 180° which are equivalent (nucleus “direction” being an artefact of the software analysis), at both D6 and D15 (Figure 37, top row). This nuclear orientation pattern disappeared inside the tissue layer (i.e. for Z values below the red arrow). A similar but less pronounced clustering was observed in $T2\pi$ in the same area (Figure 37, middle row), while in $T\pi$, no preferential nucleus orientation could be detected at any time, even in the bottom of the grooves at D15 (Figure 37, bottom row) where nucleus elongation was maximal (Figure 36).

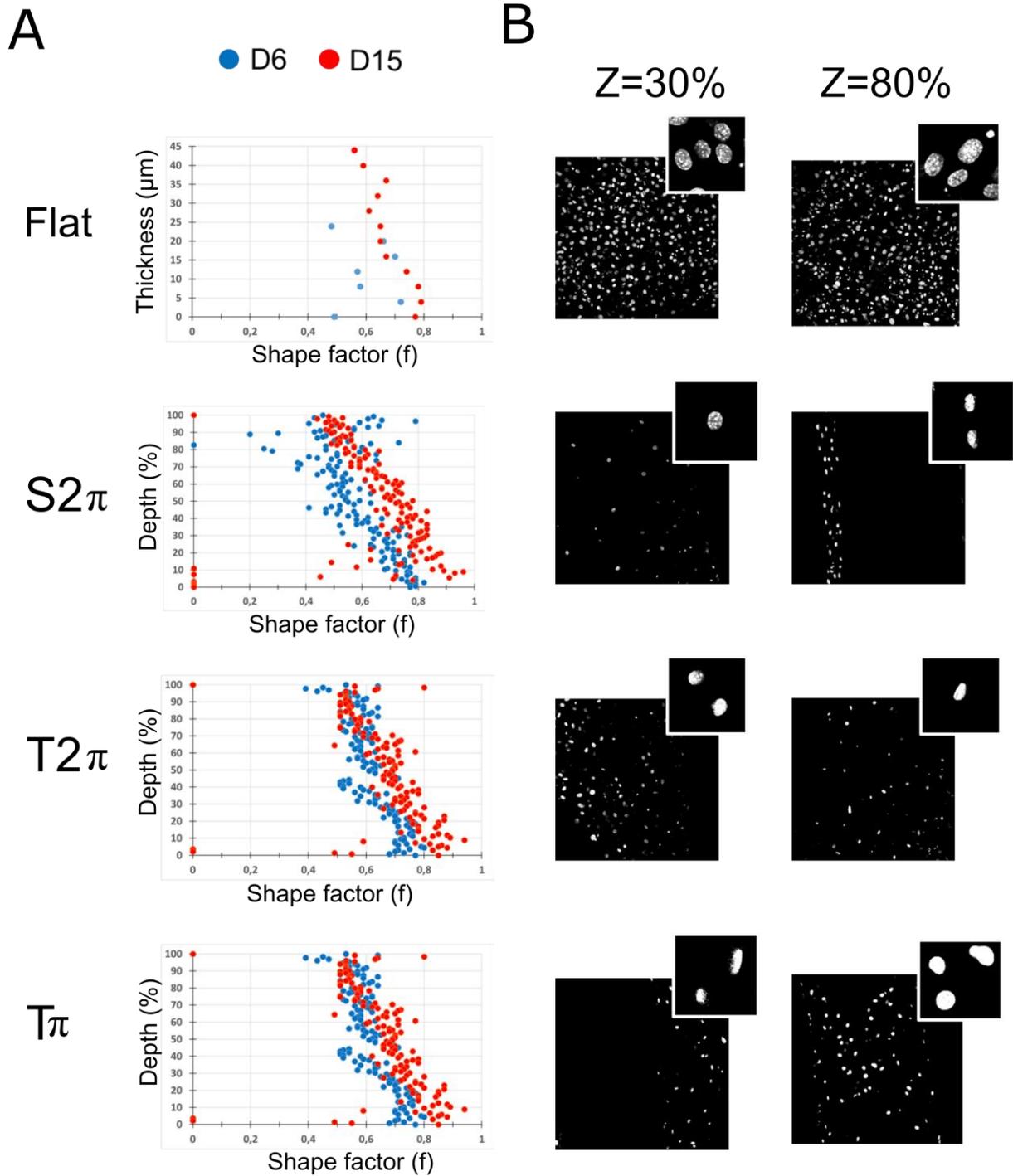


Figure 36 : Quantitative analysis of nuclear shape factor in cultures on macrogrooved scaffolds. (A) Plotting of nucleus shape factor (f) value in D6 (blue dots) and D15 (red dots). Depth (Z) is expressed in percentage of height, with 0% at the bottom of the groove and 100% to the top of the ridge. Each point gives the average of f values on each image of the stack. (B) Confocal images of DAPI-stained cell nuclei at $Z=30\%$ (lower tissue layer) and $Z=80\%$ (upper tissue layer), at D15. Scale bars = 100 μm .

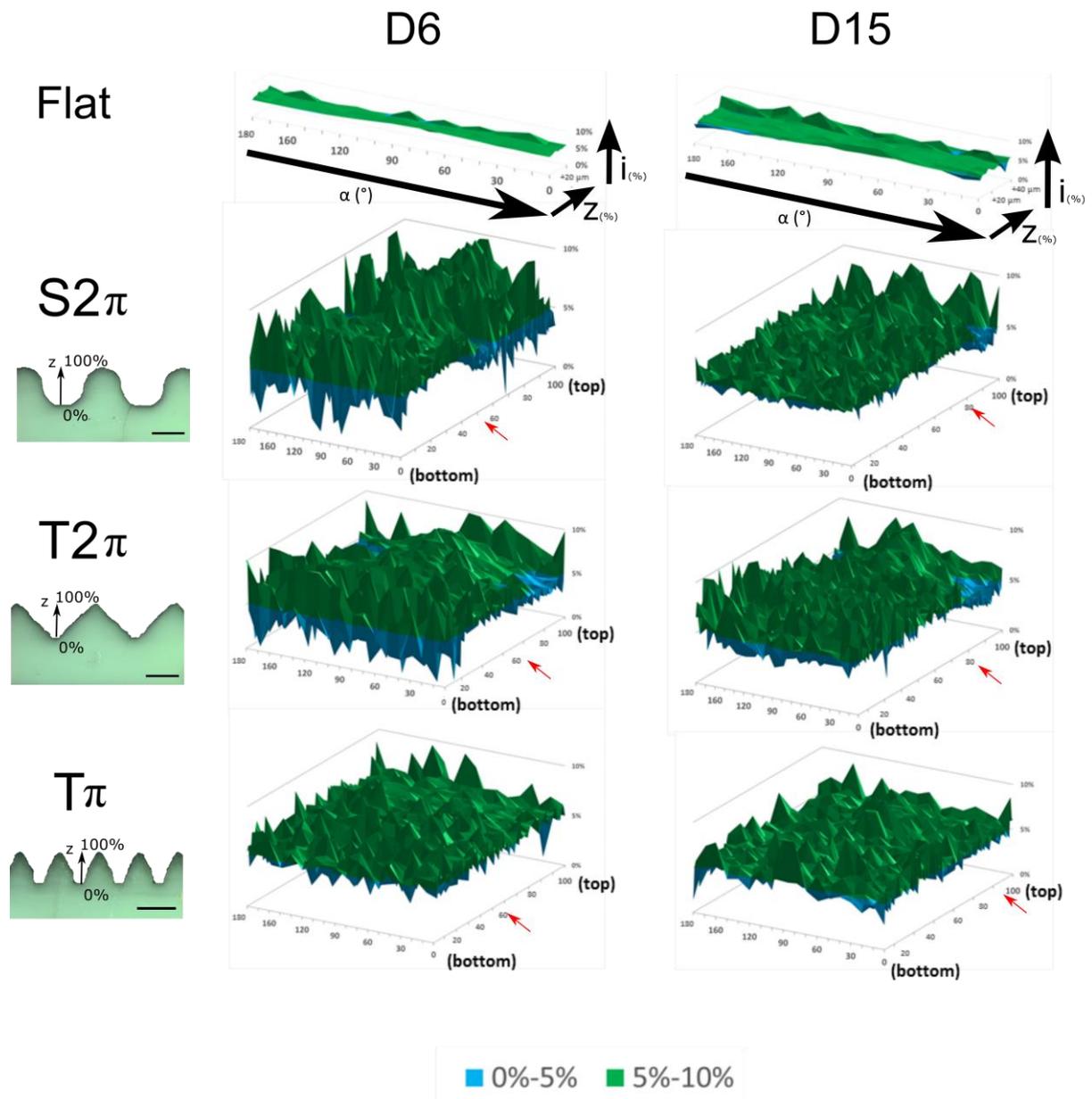


Figure 37 : Quantitative analysis of the orientation of cell nuclei in culture on macrogrooved scaffolds. The orientation angle $\alpha=0^\circ$ is defined as parallel to the groove (= Y-axis). Depth (Z) is expressed in percentage groove height for macrogrooved scaffolds, with 0% at the bottom of the groove and 100% at the top of the ridge. The red arrow marks the tissue-culture medium interface. The proportion (i) of nuclei with a given orientation α angle orientation of their major radius is shown in the vertical dimension. Values for (i) have been distributed in 5% classes, each identified by a color code (see legend at the bottom of the Figure). Each 3D picture thus maps the proportion (i) of nuclei found oriented at a given (α) angle, at a given (Z) depth in the grooves. Mean (n=4 scaffolds, with 3 fields/scaffold).

4. Discussion

The aim of this study was to understand the influence of macrotopography on cell orientation, its role in extracellular matrix organization and in the formation of three-dimensional tissue structures. Our hypothesis was that macroarchitectures, in contrast to a flat substrate, will mechanically constrain the tissue in formation -a process defined as « contact guidance » (Nguyen et al., 2016)- and induce, through cellular shape and behavior response, a guided orientation of matrix (collagen) fibers.

Stress fibers labelling revealed that their abundance at the interface between tissue and culture medium (top cell layer) was similar in flat controls and grooved scaffolds. One hypothesis is that this interface would be perceived by the cells in the same way as a two-dimensional substrate, despite the 3D set up of the whole culture. The ECM deposited would form a flat, rigid substrate on which the cells could spread. Indeed the amount of stress fibers is higher at D15, similar to the Flat controls, suggesting that the denser network of ECM layed down results in a higher stiffness of the substrate (Discher et al., 2005; Solon et al., 2007; Trappmann and Chen, 2013).

The mechanical stress of the cytoskeleton is highly regulated and activates responding pathways, such as the MAPK kinase cascade involved in cell migration and differentiation (Brown and Discher, 2009). A predictive model of bone tissue growth driven by the macroscopic geometry of substrate has been develop by Bidan et al. (2012). Their hypothesis is that cells attached to a concave surface would create tensile elements, also called actin chords. The chords would generate a local mechanical stress, to which the cells would respond by synthetizing ECM (Bidan et al., 2012; Rumpler et al., 2008). A key aspect of a chord system would be its preferential orientation. Inside the tissue layers generated in our scaffolds, the orientation of stress fibers varied depending on the degree of closure. While in $S2\pi$, stress fibers did not display any preferential orientation, suggestive of the absence of contact guidance, in angular grooves, the orientation of the stress fibers increased with the tightening of the geometry, as if constrained by the substrate, and perpendicular to the axis of the grooves, as would chords. The impressive alignment of stress fibers in the $T\pi$ pattern suggests that tension forces, resulting in mechanical interactions between the cells in response to substrate closure, organize the whole volume of the tissue.

Beside the orientation of actin stress fibers, deformation of the nucleus, the most rigid component of the cell, has also been linked to cellular mechanical response, with a

direct impact on gene expression (Reddy et al., 2008; Taddei et al., 2004). Interestingly, while in contrast to the cytoskeleton and the mineralized ECM the nuclei did not orient in a preferential direction in the depth of the tissue layers of angular grooves, their shape was nonetheless affected in a time and depth dependent manner. In all macroarchitected scaffolds, the nuclei located in the top tissue layer showed the highest elongation factor, pointing to a high tissular tension that would progressively decrease in deeper cells, buried in the tissue layer (Caille et al., 1998). The striking reversal at D15 for this pattern in $T\pi$, which display increased nuclear deformation in the culture, is a sign of increasing tissue tension. This would be expected for cells trapped in a dense, highly oriented matrix and displaying a high level of polarization, even though the number of stress fibers is lower than in the interface layer. ECM mineralization could also play a role in the process of nuclear deformation, which remains to be evaluated in this model. Overall, as mentioned, the behavior of the nuclei, while reflecting cell tension, appeared remarkably uncoupled from the stress fibers system, at least inside the tissue. Although several studies have shown that nucleus shape and orientation are influenced by stress fibers (Khatau et al., 2009; Kim et al., 2014; McKee et al., 2011; Vishavkarma et al., 2014), it is noteworthy that they were all done on cultures grown in plastic, two-dimensional substrate, laying very little ECM. Such models are similar to the cell-medium interface of the scaffolds, in which nuclei displayed a bimodal orientation, with one mode at least paralleling the stress fibers (Figure 37). The other peak (at $0/180^\circ$) may reflect the top and/or slopes of the scaffolds, which would explain that it is absent in the $T\pi$ pattern, in which the grooves are filled up, and the top of the ridges are nearly devoid of cells from the onset of the cultures (not shown here, Juignet et al., submitted). Deep within the tissue layed inside the macrogooves of our biomaterials, bone cells undertake multiple interactions in all direction of space, a condition very different from thin 2D cultures. Further investigations will be required to analyze the coupling between nucleus and cytoskeleton in the mechanotransduction response of bone cells in such 3D environnements.

5. Conclusion

In this study, we showed that in macrogrooved bioceramics with increased degrees of closure ($T_{\pi} > T_{2\pi} > S_{2\pi}$), cells are able to sense the substrate macroarchitecture and align their cytoskeleton in response to the degree of closure. That nucleus deformation is unexpectedly not linked to the stress fiber reorientation and could reflect constraints due to matrix mineralization or highlight specificities of bone cell behaviour in a 3D tissue culture.

Aknowledgements

The authors thank Dr Joëlle Amédée (INSERM U1026, Bordeaux, France) for helpful suggestions during this study. The work was funded by the French “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM) and by the Rhône-Alpes Region through the “ARC2 program” (PhD fellowship to LJ). The authors have no conflicting financial interests.

References

- Bellows, C.G., and Aubin, J.E. (1989). Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* 133, 8–13.
- Bidan, C.M., Kommareddy, K.P., Rumpler, M., Kollmannsberger, P., Bréchet, Y.J.M., Fratzi, P., and Dunlop, J.W.C. (2012). How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *PLoS ONE* 7, e36336.
- Brown, A.E.X., and Discher, D.E. (2009). Conformational changes and signaling in cell and matrix physics. *Curr. Biol.* 19, R781-789.
- Caille, N., Tardy, Y., and Meister, J.J. (1998). Assessment of strain field in endothelial cells subjected to uniaxial deformation of their substrate. *Ann Biomed Eng* 26, 409–416.
- Charbonnier, B., Laurent, C., and Marchat, D. (2016). Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization. *Journal of the European Ceramic Society* 36, 4269–4279.
- Dalby, M.J., Riehle, M.O., Johnstone, H., Affrossman, S., and Curtis, A.S.G. (2004). Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. *Cell Biol. Int.* 28, 229–236.
- Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139–1143.
- Dumas, V., Guignandon, A., Vico, L., Mauclair, C., Zapata, X., Linossier, M.T., Bouleftour, W., Granier, J., Peyroche, S., Dumas, J.-C., et al. (2015). Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment. *Biomed. Mater.* 10, 55002.
- Gamsjäger, E., Bidan, C.M., Fischer, F.D., Fratzi, P., and Dunlop, J.W.C. (2013). Modelling the role of surface stress on the kinetics of tissue growth in confined geometries. *Acta Biomaterialia* 9, 5531–5543.
- Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2007). Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1115–1127.

- Jeon, H., Hidai, H., Hwang, D.J., Healy, K.E., and Grigoropoulos, C.P. (2010). The effect of micronscale anisotropic cross patterns on fibroblast migration. *Biomaterials* 31, 4286–4295.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19017–19022.
- Kim, D.-H., Cho, S., and Wirtz, D. (2014). Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J. Cell. Sci.* 127, 2528–2541.
- McKee, C.T., Raghunathan, V.K., Nealey, P.F., Russell, P., and Murphy, C.J. (2011). Topographic Modulation of the Orientation and Shape of Cell Nuclei and Their Influence on the Measured Elastic Modulus of Epithelial Cells. *Biophys J* 101, 2139–2146.
- Nguyen, A.T., Sathe, S.R., and Yim, E.K.F. (2016). From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J. Phys.: Condens. Matter* 28, 183001.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243–247.
- Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W., van Dongen, J.T., and Fratzl, P. (2008). The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface* 5, 1173–1180.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93, 4453–4461.
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., and Gasser, S.M. (2004). The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* 38, 305–345.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125, 1855–1864.
- Trappmann, B., and Chen, C.S. (2013). How cells sense extracellular matrix stiffness: a material’s perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 948–953.

Vishavkarma, R., Raghavan, S., Kuyyamudi, C., Majumder, A., Dhawan, J., and Pullarkat, P.A. (2014). Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading. PLoS ONE 9, e107895.

II. Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu observer que la macroarchitecture du substrat provoquait une réponse mécanique des cellules ostéoblastiques. La double étude quantitative de la déformation du cytosquelette et du noyau nous a permis d'analyser cette réponse.

L'état de stress mécanique des cellules varie en fonction de leur profondeur au sein des sillons, mais également selon qu'elles soient incluses ou non dans la couche tissulaire. Ainsi, dans la couche cellulaire supérieure, les cellules forment énormément de fibres de stress que ce soit sur le substrat plat ou dans les macroarchitecturés. Mais à l'intérieur du tissu, si les cellules continuent d'exprimer des fibres de stress, leur quantité est considérablement réduite, indiquant que les cellules sont et se considèrent dans un environnement tridimensionnel. L'évolution de la déformation du noyau suit également cette observation, avec une forme de plus en plus arrondie au fur et à mesure que les cellules sont situées dans la profondeur de la couche tissulaire. Cependant, dans la géométrie la plus aigüe (« $T\pi$ ») et uniquement dans celle-ci, les fibres de stress sont orientées perpendiculairement au substrat (parallèlement au fond du biomatériau) sur toute la profondeur du sillon, comme les fibres minéralisées décrites dans l'article 1. Cela confirme donc que le substrat exerce une contrainte passive sur les cellules, qui vont alors synthétiser la matrice extracellulaire orientée selon le signal mécanique qu'elles perçoivent. Une expérience complémentaire sera prochainement réalisée afin de déterminer si l'orientation des cellules influence l'organisation du dépôt de collagène par celles-ci. Un développement logique de ce travail serait d'analyser et de localiser l'expression des acteurs de voie de réponses aux contraintes mécaniques, tels les RhoGTPases ou YAP/TAZ (Aragona et al., 2013; Halder et al., 2012; Hoffman et al., 2011).

Au sein de substrats macroarchitecturés, nous avons montré que les cellules étaient capables de recréer un environnement tridimensionnel, proche de leur condition de développement *in vivo*. Nous avons mis à profit ces macrostructures pour développer un modèle de culture 3D sous perfusion, dans lequel des effets de l'utilisation de molécules pharmacologiques ainsi que de stress mécaniques, sous la forme de forces de cisaillement, pourraient être testés.

C. Etude 3 : Développement d'un modèle de culture tridimensionnelle pour l'ostéogénèse *in vitro*

I. Contexte

Les cultures de cellules en trois dimensions ont l'avantage de se rapprocher de la physiologie *in vivo*, par rapport à des cultures classiques en boîte de Pétri, tout en constituant des modèles simplifiés et contrôlés. Cependant, la culture cellulaire 3D nécessite l'utilisation d'un bioréacteur, afin de créer un flux qui va perfuser et permettre un renouvellement du milieu de culture jusqu'au centre du biomatériau. Ce flux de perfusion provoque par là même des contraintes mécaniques, sous la forme de forces de cisaillement.

Les travaux présentés préalablement nous ont permis de déterminer que les cellules étaient sensibles à la courbure du substrat, qu'il était donc possible de moduler le comportement cellulaire en fonction de ce paramètre. Le passage à un environnement perfusé ainsi que l'ajout de contraintes mécaniques (forces de cisaillement) pouvaient nous permettre de confirmer nos résultats exposés précédemment mais surtout d'explorer les interactions cellules-substrat en réponse à un stress mécanique.

II. Matériel et méthodes

1. *Les cultures cellulaires*

a. La lignée C3H10T1/2 (clone 8)

La lignée C3H10T1/2 (clone 8) a été isolée en 1972 à partir de cellules embryonnaires de souris C3H (Reznikoff et al., 1973). Il s'agit d'une lignée cellulaire immortalisée mais non cancéreuse. De morphologie fibroblastique, les cellules C3H10T1/2 sont capables, en présence de facteurs spécifiques, de s'engager soit dans le lignage ostéoblastique (acide ascorbique, β -glycérophosphate), soit dans le lignage adipocytaire (rozigitazone, insuline) (David et al., 2007). Utilisées entre les passages P11 et P15, les C3H10T1/2 ont été cultivées dans du DMEM complet (DMEM, 10% SVF, 1% Pénicilline-Streptomycine, 1% Glutamax®).

La lignée cellulaire C3H10T1/2 a été utilisée dans cette étude pour les expériences de mises au point de l'ensemencement.

b. Les cellules primaires de calvaria de souris

Les cellules primaires de calvaria de souris sont des populations riches en progéniteurs ostéoblastiques isolées à partir de calvaria de souris grâce à des digestions répétées avec la collagénase (Ecarot-Charrier et al., 1983). Cultivées dans du milieu de culture α MEM complet (α MEM, 10% SVF, 1% Pénicilline-streptomycine, 1% Glutamine) en présence d'acide ascorbique ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de β -glycérophosphate (10 mM), les cellules primaires de calvaria sont capables de former des colonies ostéoblastiques minéralisées (aussi appelées « nodules osseux »). Elles constituent donc un bon modèle d'étude de la différenciation ostéoblastique. Cependant, en raison de la quantité considérable de cellules nécessaires dans le cadre de cette étude (et donc d'animaux), ces cellules n'ont été utilisées qu'une fois les conditions d'ensemencement validées avec les cellules de lignée (voir ci-dessus). Pour plus de détails sur les cellules primaires murines, voir la **Revue bibliographique, Partie C.I.1.**

2. Les matériaux

Les matériaux utilisés au cours de cette étude étaient en hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA). Ils ont été fabriqués via un procédé de fabrication additive : (1) des moules de cires sont fabriqués par impression 3D, (2) une barbotine d'HA est coulée dans ces moules, (3) l'ensemble subit un premier traitement thermique (500°C pendant 2 heures) qui va permettre l'élimination du moule de cire (4) suivi d'un frittage à 1200°C pendant 2 heures. Du fait du processus de fabrication (impression d'un moule de cire avec une résolution machine de $26 \mu\text{m}$), les matériaux en HA possédaient une rugosité interne périodique. Les biomatériaux formaient des cylindres dont les dimensions finales étaient de 10 mm de diamètre et 5 mm de hauteur.

Les pores de ces matériaux pouvaient présenter deux géométries, circulaires ou triangulaires, mais de surface de section identique. Les pores circulaires formaient des cylindres de $740 \pm 15 \mu\text{m}$ de diamètre et les pores triangulaires étaient des pyramides isocèles, qui présentaient deux angles de 45° et un angle de 90° (Figure 38).

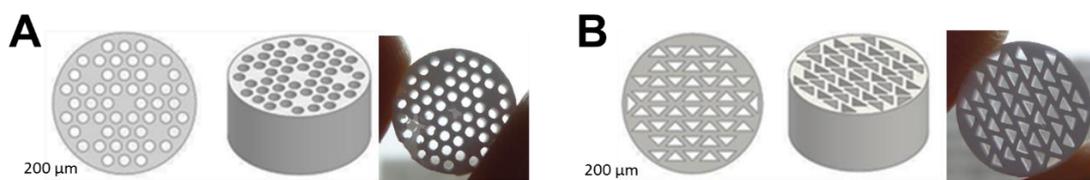


Figure 38 : Les biomatériaux en hydroxyapatite utilisés pour l'étude en bioréacteur. Schémas et photographies du (A) biomatériau à pores circulaires et (B) biomatériau à pores triangulaires. Barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$

La mise au point des différents paramètres a été faite avec des matériaux modèles en PMMA, à pores circulaires (dimensions identiques). Ces matériaux avaient l'avantage d'être rapidement réalisables et d'être biocompatibles.

3. Techniques d'ensemencement testées

a. Rotation

Les matériaux ont été placés dans des tubes stériles d'un diamètre légèrement supérieur au matériau (11 mm Ø) puis recouverts d'une suspension cellulaire (3×10^6 cellules dans 10 mL), l'ensemble étant ensuite complété avec du milieu de culture, puis le tube fermé hermétiquement. Le tube d'ensemencement était placé sur un agitateur rotatif (20 tours par minute soit $0,21 \text{ m.s}^{-1}$) à 37°C . Le matériau en rotation se déplaçait au sein de la suspension cellulaire qui le traversait de part en part.

b. Sous vide

Les tubes contenant les matériaux et la suspension cellulaire ont été placés dans une fiole à vide stérile. Un vide (-100 mmHg) a été appliqué 3x1 minute afin d'aspirer les bulles d'air hors des pores du matériau. Les tubes ont ensuite été fermés hermétiquement puis placés à 37°C pendant 2h. Après une heure, ils ont été remués délicatement de façon à ce que le matériau se retourne à l'intérieur du tube.

c. Sous vide suivi de rotation

Les tubes d'ensemencement sont préparés comme décrit en (a), soumis à 3x1 minute de vide (voir b), puis immédiatement mis en rotation (voir a).

4. Evaluation de l'ensemencement

Afin de valider une méthode d'ensemencement des matériaux, trois critères ont été pris en compte : une bonne reproductibilité du nombre de cellules ensemencés sur les matériaux, une homogénéité de répartition intra et inter-pores et la maximisation du nombre de cellules attachées.

a. Evaluation indirecte

Après ensemencement, la suspension cellulaire a été récupérée et centrifugée à 100g. Le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans un volume connu de milieu de culture. Le nombre de cellules a ensuite été compté sur cellule de Malassez puis

soustrait du nombre de cellules initial. Le nombre obtenu était une évaluation du nombre de cellulesensemencées sur le biomatériau.

Nombre cellules_{ensemencées} = nombre cellules_{totales} – nombre cellules_{restant dans la suspension}

b. Comptage cellulaire

Après ensemencement, le matériau a été récupéré, rincé au PBS et fixé dans du paraformaldéhyde à 3,7% (PFA). L'ADN nucléaire a ensuite été marqué au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 450-490 \text{ nm}$), agent fluorescent se liant fortement à l'ADN qui marque les noyaux des cellules et donc de permettre de les localiser. Après découpe verticale avec une scie à fil diamantée, les matériaux ont été observés au vidéomicroscope à fluorescence et des images acquises avec une caméra AxioCam® utilisant le logiciel AxioVision®. L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel ImageJ, afin d'observer la répartition et de compter le nombre de cellules.

c. Dosage d'ADN

La quantification du nombre de cellules a été réalisée par dosage de l'ADN via la technique fluorimétrique Picogreen. Le dosage Picogreen peut être utilisé pour des quantités d'[ADN]_{extraits} très faibles du fait de sa sensibilité particulièrement élevée. Le complexe ADN-Picogreen est fluorescent ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 538 \text{ nm}$). A l'aide d'une gamme, il est possible de déterminer le nombre de cellulesensemencées en fonction de la quantité d'ADN récoltée.

Après ensemencement, le biomatériau a été récolté, rincé au PBS puis incubé dans un tampon de digestion (1 mg/ml protéinase K dans du DirectPCR lysis reagent (Viagen Biotech)) 5h à 55°C. La digestion a lysé les cellules et libéré l'ADN tout en le protégeant des DNases. Les lysats cellulaires ont ensuite été récoltés, vortexés puis incubés au bain-marie à 85°C pendant 45 min pour inactiver la protéinase K. Après centrifugation, les surnageants, contenant l'ADN, ont été récoltés et stockés à -20°C jusqu'au dosage. Lors du dosage Picogreen, l'extrait a été dilué dans du Tris-EDTA (facteur de dilution à déterminer par essai préalable) de façon à ce que la concentration mesurée soit comprise dans la gamme d'étalonnage. Les extraits ont ensuite été déposés dans un même volume de Picogreen. Après 5 min d'incubation, la fluorescence a été lue sur un spectrofluoromètre (CFX96, BIO-RAD).

5. Le bioréacteur BOSE ElectroForce® 5270 BioDynamic®

Le bioréacteur BOSE *ElectroForce*® 5270 *BioDynamic*® est un bioréacteur installé sur la plateforme « Ingénierie et Vieillesse des Tissus Vivants » (IVTV) au Campus Santé Innovations de Saint-Etienne. Dispositif de culture sous perfusion, il permet la culture de prélèvement biologiques sous perfusion ainsi que celle de structures macroporeuses, dans un environnement mécanique et physicochimique contrôlé. Les échantillons peuvent être stimulés mécaniquement au moyen d'un flux pulsatile (force de cisaillement) et/ou de forces de traction/compression. Le comportement des échantillons peut également être suivi en direct avec la présence de capteurs de force et de pression.

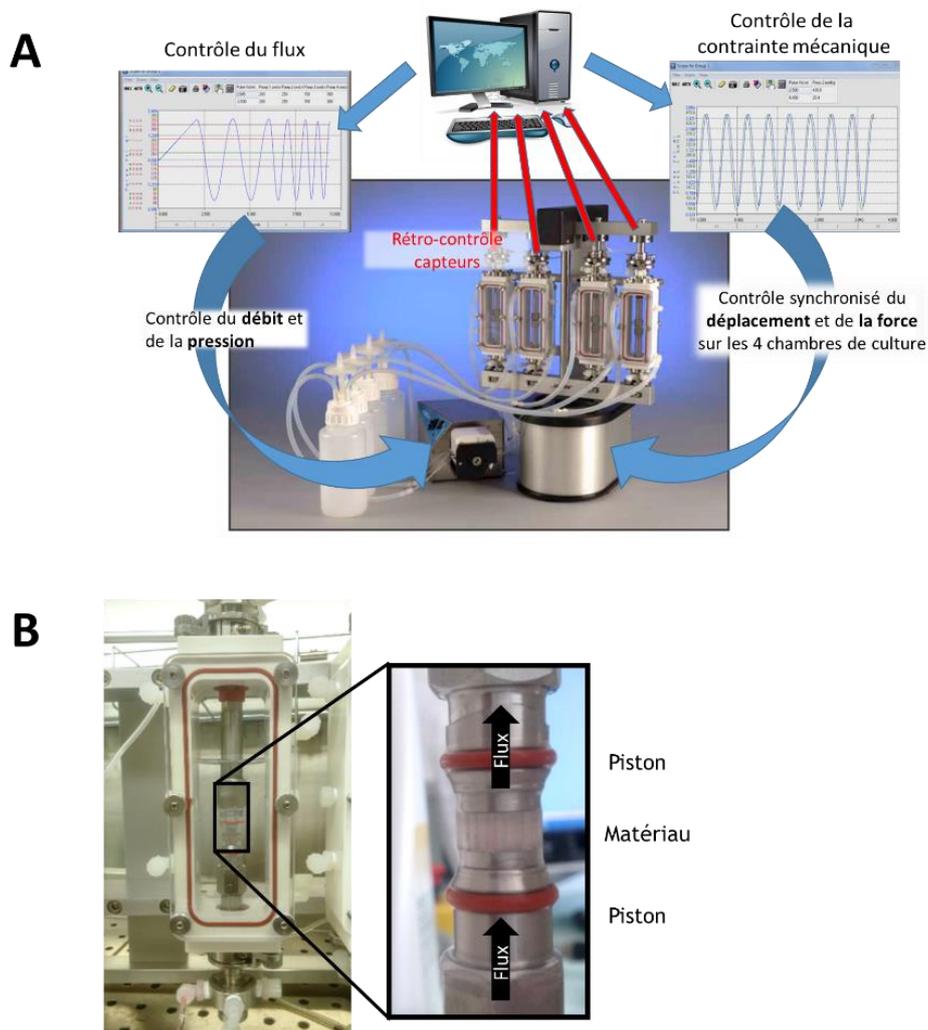


Figure 39 : Le bioréacteur Bose de la plateforme Equipex IVTV.

(A) Le système *ElectroForce*® 5270 *BioDynamic*®, permettant un contrôle et un enregistrement en temps réel des paramètres mécaniques. (B) Photographie de la chambre de culture utilisée dans cette étude. Le milieu de culture arrive par le piston du bas, perfuse l'ensemble des pores du biomatériau et est évacué par le piston du haut, le tout est glissé dans une jupe de silicone.

Les chambres pour la culture osseuse se composent de deux pistons entre lesquels va se placer le biomatériau ; l'ensemble (piston+matériau) est glissé dans une jupe de silicone qui va assurer l'étanchéité du circuit. Chaque piston porte à son extrémité une grille métallique dont les pores font soit 40 μm soit 100 μm . Leur rôle, d'après le fabricant, est d'homogénéiser le flux au contact du biomatériau.

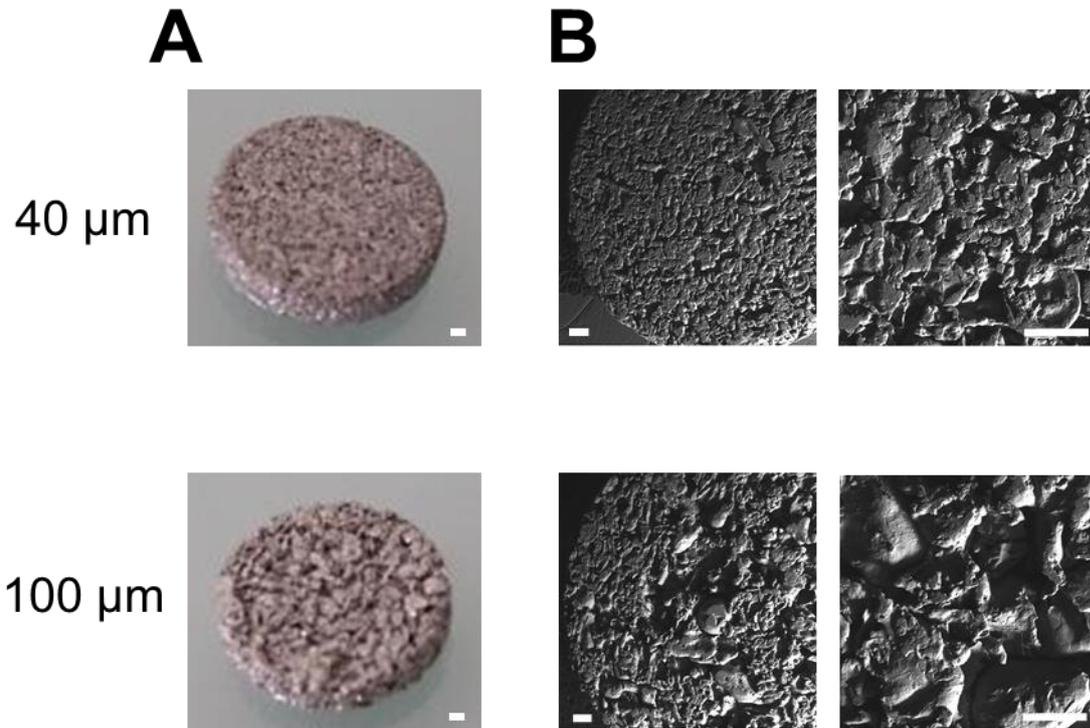


Figure 40 : Grilles métalliques du dispositif de perfusion du bioréacteur BOSE. (A) Photographies des grilles métalliques du BOSE. (B) Images prises en microscopie électronique à balayage, montrant la microarchitecture des grilles. Barre d'échelle = 500 μm .

Dans le cadre de nos expériences, la pompe utilisée était une pompe péristaltique multi-canaux fonctionnant à des débits compris entre 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 44 mL/min (Ismatec, France).

Le milieu de culture était contenu dans un réservoir, relié par un tube à la pompe péristaltique qui l'aspirait et l'envoyait vers la chambre de culture. Le milieu arrivait par le piston du bas, traversait le biomatériau puis était évacué par le piston du haut. Il était ensuite réinjecté dans le réservoir (circuit fermé).

6. Evaluation de la différenciation ostéoblastique au sein des cultures 3D

a. Dosages ELISA

Au cours de la culture dans le bioréacteur, 50% du milieu de culture était renouvelé tous les 3-4 jours. Ce milieu usagé, appelé perfusat, était ensuite aliquoté et stocké à

-20°C jusqu'à utilisation. Des dosages ELISA pour l'OPN ont été réalisés sur ces perfusats (R&D Systems, ref DY441).

b. Immunomarquages

Après 15 jours de culture, les biomatériaux ont été récupérés, rincés au PBS, fixés au PFA et découpés à l'aide d'une scie à fil diamanté (Eslec). Après perméabilisation (3 minutes, 0,1% Triton X-100 dans du PBS), des immunomarquages pour la fibronectine (1:100, Sigma, ref F3648) et l'ostéopontine (1:100, Santa-Cruz, ref sc-21742) ont été réalisés.

c. Coloration du minéral

Après 15 jours de culture dans le bioréacteur BOSE, les matériaux en PMMA ont été récupérés, rincés et fixés au PFA. Le matériau a été plongé dans une solution de rouge Alizarine 2% dans l'eau déminéralisée (w/v, pH≈4,1) afin de mettre en évidence la présence de dépôt de calcium.

7. Analyses statistiques

L'analyse des résultats quantitatifs a été réalisée avec le test non-paramétrique Kruskal-Wallis, suivi d'un post-hoc Dunn's, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

III. Résultats

1. Ensemencement

Les résultats obtenus selon les différentes techniques sont donnés dans la Table 4.

a. Méthode de comptage

Le dénombrement indirect des cellules par soustraction s'est révélé être une technique peu fiable, avec des écarts de valeur très importants quelque soit la technique d'ensemencement utilisée. En dénombrement direct, que ce soit par comptage direct ou par quantification ADN, le nombre de cellules ensemencé trouvé était sensiblement identique selon la technique d'ensemencement. Cependant la quantification ADN s'est révélée être plus rapide et moins fastidieuse.

Table 4 : Evaluation de la qualité de l'ensemencement des biomatériaux 3D. Utilisation de la quantification indirecte, par soustraction, ou de la quantification directe, par comptage des cellules marquées au DAPI ou par dosage ADN. N= 5 matériaux par méthode de comptage et par méthode d'ensemencement. Test statistique : Kruskal-Wallis, avec test post-hoc de Dunn's.

Méthode de comptage	Technique d'ensemencement	Nombre de cellules (min; max)	Nombre de cellules (médiane)	Différences statistiques
Soustraction (indirecte)	Rotation	110000; 720000	240000	NS
	Sous vide	140000; 520000	240000	
	Rotation+vide	68000; 840000	230000	
Comptage (directe)	Rotation	5392; 143232	60500	NS
	Sous vide	5768; 43376	12790	
	Rotation+vide	6048; 50800	22850	
Dosage ADN (directe)	Rotation	18574; 328965	201200	«Sous vide» vs «rotation+vide» : p<0.01
	Sous vide	17798; 27526	24130	
	Rotation+vide	40273; 66547	58370	

b. Technique d'ensemencement

La technique de rotation seule a permis d'obtenir un nombre de cellules repiquées dans le matériau important. Cependant, elle présentait le désavantage d'être très peu reproductible : le nombre de cellules ensemencé variait considérablement d'un matériau à l'autre mais aussi à l'intérieur d'un même matériau, certains pores pouvaient être remplis de cellules alors que d'autres étaient totalement vides (non montré). A l'inverse, la technique d'ensemencement sous vide était très reproductible mais peu de cellules étaient repiquées dans le biomatériau, avec une concentration principale aux extrémités. En couplant ces deux techniques (rotation + « sous vide »), le nombre de cellules repiquées doublait par rapport au seul ensemencement « sous vide » tout en conservant une très bonne reproductibilité et une bonne répartition des cellules sur toute la longueur des pores. L'ensemencement couplé était d'ailleurs significativement plus efficace que l'ensemencement seul « sous vide » (p<0,01). Cependant, la densité

de cellules repiquées reste toujours inférieure à celle de l'ensemencement en rotation seule, et donc optimale.

L'ensemencement ainsi que la quantification ayant nécessité de nombreuses mises au point, les expérimentations sur le bioréacteur avaient déjà débuté. Les résultats présentés par la suite ont été réalisés sur des cultures cellulaires ensemencées par rotation seule.

2. Culture cellulaire

a. Choix de la grille

Comme décrit ci-dessus, les pistons du bioréacteur BOSE peuvent comporter des grilles, dont le but (selon le fabricant) est d'homogénéiser le flux à l'entrée de l'échantillon. Afin de choisir le système le plus adapté à la culture cellulaire, chaque type de grille a été testée. Après 7 jours de culture au sein du bioréacteur ($300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}/234 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), les matériaux en PMMA ont été récupérés, marqués au DAPI et observés en microscopie à fluorescence.

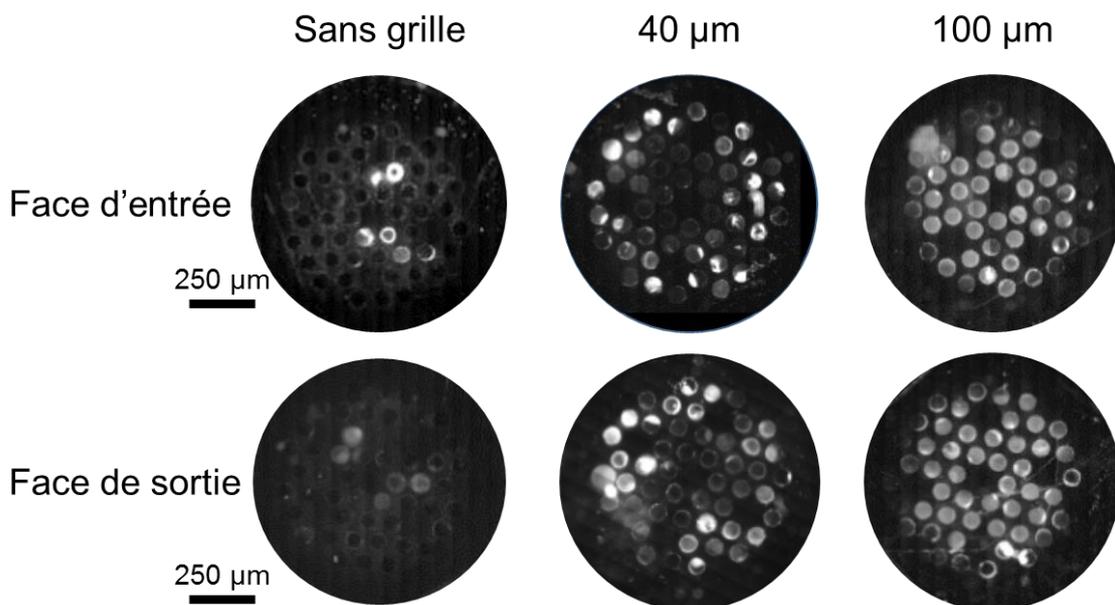


Figure 41 : Optimisation du montage de perfusion des biomatériaux 3D cultivés dans le bioréacteur BOSE. Les cellules ont été cultivées dans un matériau en PMMA au sein du bioréacteur, pendant 7 jours, sous un flux de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, avec la présence ou non d'une grille métallique dans le piston. Photographies en mosaïque des faces d'entrée et de sortie du matériau après marquage des noyaux cellulaires au DAPI.

En absence de grille, seuls très peu de pores comportent des cellules, que ce soit en entrée ou en sortie du matériau (Figure 41). Les pores contenant des cellules se trouvaient principalement au centre du matériau. L'ajout d'une grille en amont augmentait considérablement le nombre de pores comblés, où les cellules avaient réussi à croître. Cependant, la porosité affectait l'homogénéité de la croissance

cellulaire. Si la grille de 40 μm semblait favoriser les canaux situés à la périphérie du matériau, la grille de 100 μm permettait d'obtenir une croissance presque homogène, dans la plupart des pores du matériau à l'exception des plus périphériques.

Au vu de ces résultats, les cultures ultérieures ont été réalisées en plaçant dans le piston une grille de 100 μm .

b. Choix du débit

Une étude de flux a ensuite été réalisée afin de déterminer la vitesse de perfusion optimale pour la croissance cellulaire. Trois débits de perfusion ont été testés afin de déterminer lequel permettrait à la fois une croissance homogène sur toute la longueur des canaux et le maintien d'un flux suffisant pendant des cultures à long terme (> 7 jours) : 50, 300 et 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ces débits ont été choisis en fonction de protocoles décrits dans la littérature (Bancroft et al., 2002; Cartmell et al., 2003; McCoy et al., 2012b).

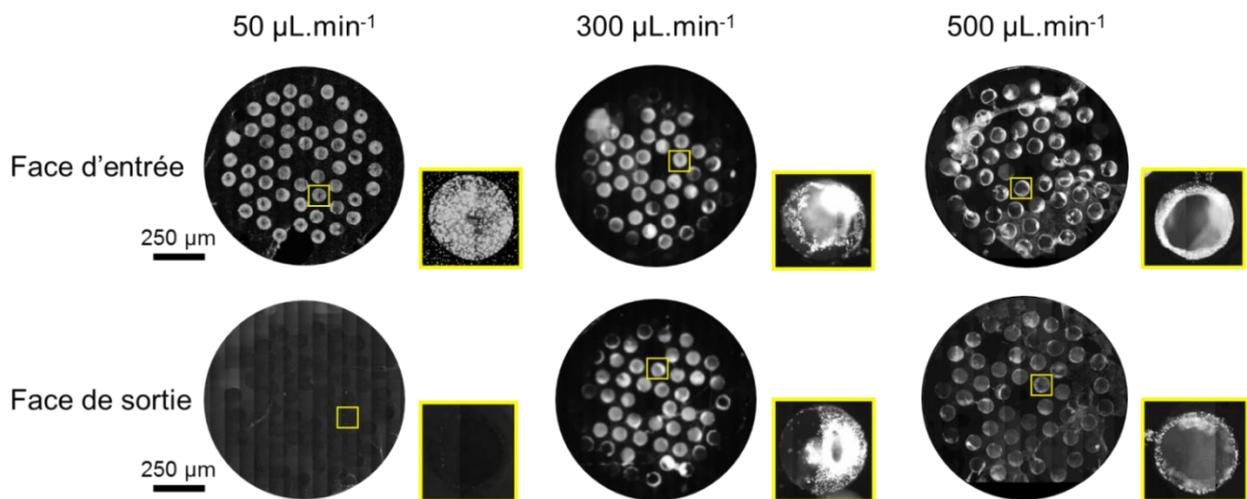


Figure 42 : Optimisation du flux de perfusion des cultures 3D dans le bioréacteur BOSE. Les cellules ont été cultivées dans un matériau en PMMA au sein du bioréacteur, pendant 7 jours, sous un flux de perfusion de 50, 300 ou 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Photographies en mosaïque des faces d'entrée et de sortie du matériau après marquage des noyaux cellulaires au DAPI.

Après 7 jours de culture, les matériaux ont été retirés du bioréacteur, fixés au PFA, marqués au DAPI et observés en microscopie à fluorescence (Figure 42). A un débit de 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (vitesse de 39 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), les pores du matériau étaient totalement bouchés en face d'entrée ; aucun noyau n'était visible sur la face de sortie, indiquant que toutes les cellules en sortie étaient mortes. A 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (234 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), les faces d'entrée et de sortie semblaient identiques ; les pores avaient commencé à être comblés mais ne l'étaient pas encore totalement. A 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (389 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), la croissance des cellules apparaissait relativement homogène dans les différents pores

du matériau (Figure 42, faces d'entrée et de sortie relativement semblables) mais semblait plus faible qu'au débit « $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ », surtout en sortie du matériau (combement moindre).

Afin d'assurer une croissance cellulaire à la fois suffisante et homogène, un débit de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ nous a semblé être le plus approprié pour notre étude.

c. Différenciation ostéoblastique

Une fois le système mis au point, nous avons utilisé pour les expérimentations suivantes des matériaux en hydroxyapatite, dont les pores étaient soit circulaires (comme précédemment), soit triangulaires. Les matériauxensemencés ont été mis en culture pendant 15 jours (30 pour le dosage ELISA) au sein du bioréacteur.

Au cours de la culture, les cellules ont proliféré et synthétisé une matrice extracellulaire (Figure 43). Après observation à la fois en microscopie optique et électronique à balayage, cette matrice apparaissait relativement fine dans les pores circulaires, les cellules semblant avoir juste recouvert l'intérieur des pores. Dans les pores triangulaires, par contre, les cellules avaient synthétisé une matrice épaisse d'une centaine de micromètres, mais uniquement dans les angles. De plus, cette MEC apparaissait bien plus épaisse dans les angles de 45° que dans l'angle de 90° . Noter que les images en MEB permettent d'observer la microtopographie de surface, liée à la résolution de l'imprimante 3D des moules des biomatériaux HA.

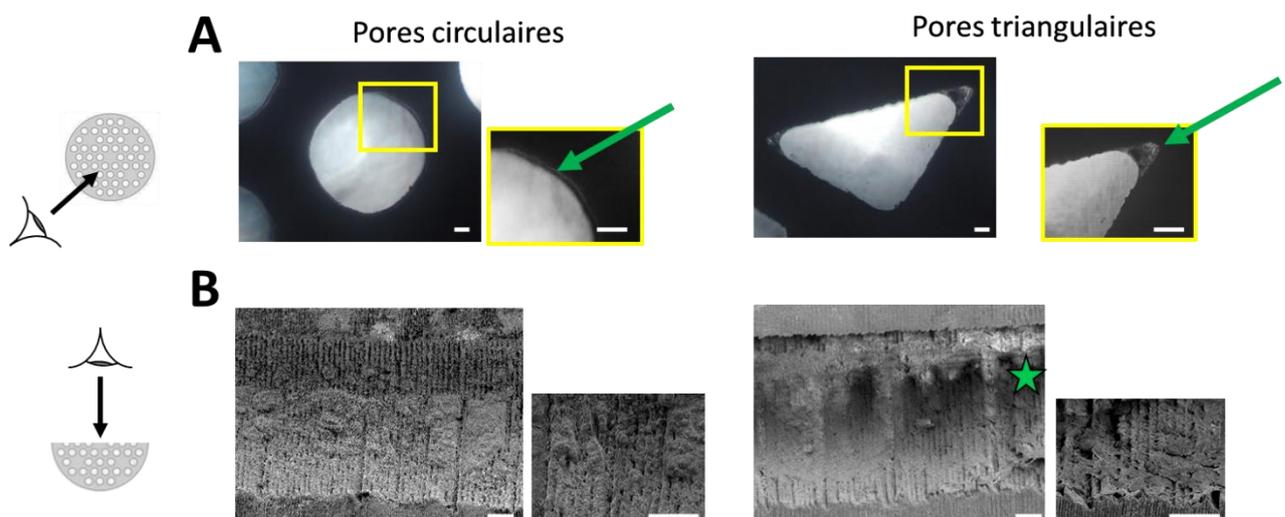


Figure 43 : Dépôt de matrice extracellulaire au sein des biomatériaux 3D.

Les cellules ont été cultivées dans un biomatériau en HA au sein du bioréacteur, pendant 15 jours, sous un flux de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Observations du dépôt de MEC dans des deux types de pores en (A) microscopie optique et en (B) microscopie électronique à balayage après découpe. Le cadre jaune correspond à un zoom sur une zone d'intérêt. La flèche verte indique la présence de la MEC dans le pore, l'étoile verte indique l'emplacement de l'angle dans le biomatériau coupé en deux. Barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$.

Sur les perfusats récoltés lors des changements de milieu de culture, un dosage ELISA a été réalisé pour l'OPN (Figure 44A). Au cours de la culture, la concentration d'OPN dans le milieu recyclé augmentait selon une courbe à allure sigmoïde. Il est intéressant de noter que les valeurs semblaient stagner entre D14 et D18 puis repartaient à la hausse. A partir de D21, les cellules semblaient sécréter plus d'OPN au sein des pores triangulaires (noir), par rapport aux cellules cultivées au sein des pores circulaires (bleu).

Après 15 jours de culture, des biomatériaux ont été récupérés et un double immunomarquage a été réalisé afin de mettre en évidence la localisation de la fibronectine (FN) et de l'OPN (Figure 44B). Pour faciliter l'observation, les biomatériaux ont été coupés en deux, dans le sens de la longueur des pores. Si, dans les pores circulaires, l'OPN et la FN semblaient être colocalisées et ne laissaient pas apparaître de structures particulières, dans les pores triangulaires la FN synthétisée par les cellules semblait être orientée parallèlement aux macrostructures dans les zones de faible densité cellulaire, mais en un réseau perpendiculaire à cette rugosité de surface dans les zones de matrice dense, proches des angles. De plus, si nous avons également observé une colocalisation entre FN et OPN, il est intéressant de noter que l'OPN était présente seule le long des angles (Figure 44B). Une coloration au Rouge Alizarine a mis en évidence la minéralisation de la matrice déposée dans les pores circulaires d'un matériau-modèle en PMMA après 15 jours de culture de cellules de calvaria, confirmant l'ostéogénèse au sein des biomatériaux dans ce modèle (Figure 44C).

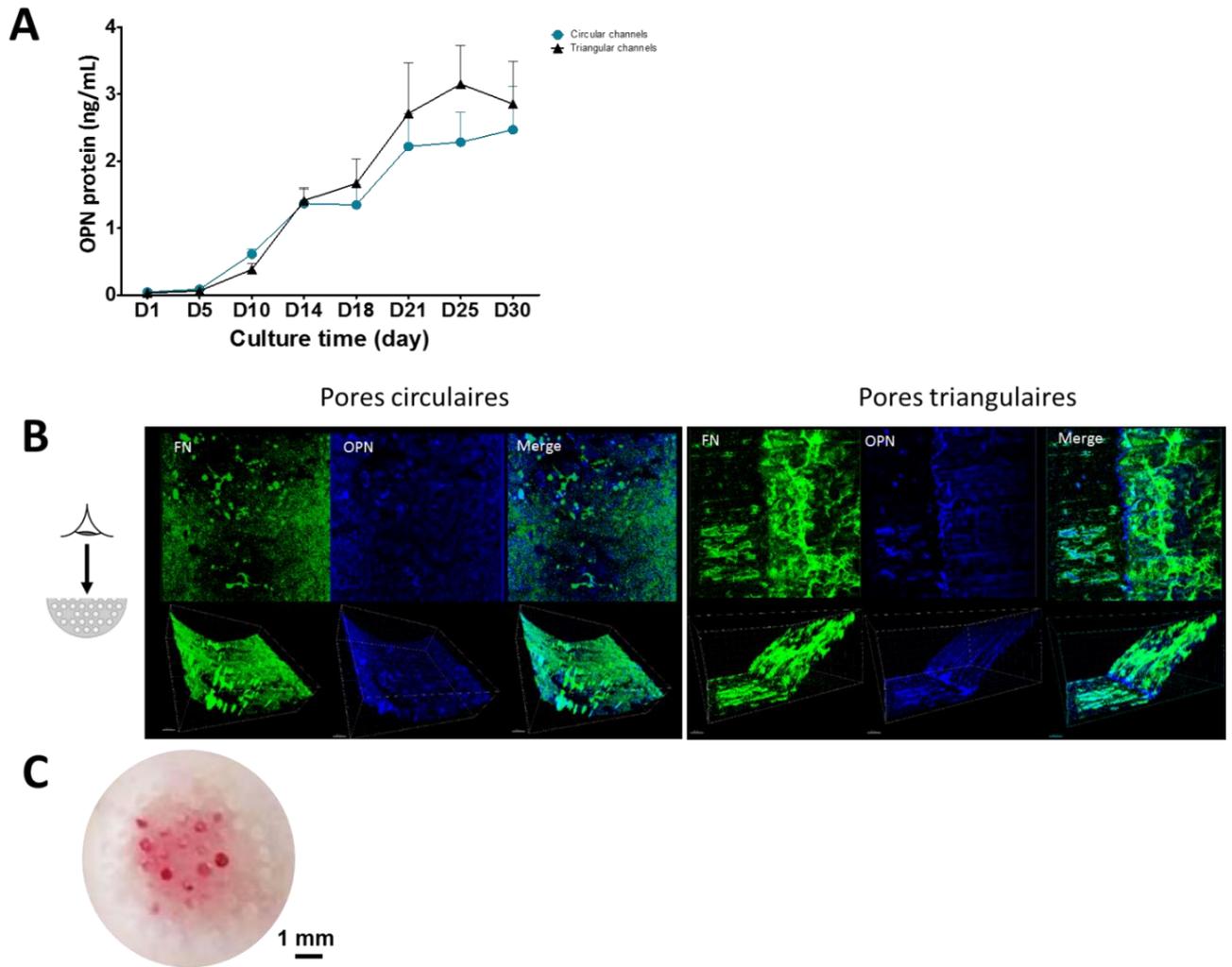


Figure 44 : Différenciation ostéoblastique dans les biomatériaux 3D cultivés dans le bioréacteur BOSE. Les cellules ont été cultivées dans le bioréacteur sous un flux de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. (A) Dosage ELISA de l'ostéopontine sur les perfusats de culture des matériaux HA à pores circulaires (bleu) et à pores triangulaires (noir) (Moyenne \pm SD, $n=4$ biomatériaux/géométrie). (B) Observations en microscopie confocale d'immunomarquages pour la fibronectine (vert) et l'ostéopontine (bleu) sur des biomatériaux HA cultivés dans le bioréacteur pendant 15 jours et coupés en deux. (C) Coloration Rouge Alizarine sur un matériau-modèle en PMMA après 15 jours de culture. Kruskal-Wallis avec test post hoc de Dunn's (NS).

IV. Discussion

L'utilisation de modèles 3D passe tout d'abord par une bonne qualité de l'ensemencement, c'est-à-dire une répartition homogène des cellules au sein des canaux et une bonne reproductibilité. Sans cela, il est extrêmement compliqué d'interpréter les résultats obtenus à la fois au sein d'une même expérience mais aussi entre plusieurs expériences distinctes. Bien que les ensemencements dynamiques soient souvent décrits comme améliorant le nombre de cellules ensemencées, il convient tout de même de noter que, dans notre cas, la rotation seule ne permet pas une bonne reproductibilité de l'ensemencement bien que les densités observées soient plus élevées (Du et al., 2009; Kim et al., 1998; Wendt et al., 2003). Cela peut être expliqué par l'architecture de notre biomatériau, des canaux de plusieurs millimètres sans interconnexion où l'air aurait des difficultés à être expulsé. C'est pourquoi combiner rotation et vides multiples permet un passage de la suspension cellulaire dans chaque pore, assurance d'une bonne reproductibilité. Malheureusement, les densités d'ensemencement obtenues restaient très inférieures à la rotation seule, et le rendement de cette approche demandera à être amélioré.

Après l'ensemencement, les biomatériaux sont placés au sein du bioréacteur BOSE et cultivés sous perfusion, en milieu ostéogénique. La perfusion permet d'assurer l'apport des nutriments aux cellules sur toute la longueur du pore, mais également génère un stimulus mécanique sous forme de forces de cisaillement. Ces forces de cisaillement pourraient être utilisées pour moduler le comportement des cellules *in vitro*, comme par exemple en stimulant l'ostéogénèse (Bancroft et al., 2002; Barron et al., 2012; McCoy et al., 2012a). Après 7 jours de culture dans le BOSE, un flux de perfusion de $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) a considérablement stimulé la croissance des cellules, au point que la perfusion n'était plus assurée sur toute la longueur des canaux (cellules mortes en sortie). A l'inverse, un flux dix fois plus important, de $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), a permis une bonne perfusion sur l'ensemble des pores mais limitait la croissance des cellules. Le flux de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) assure un bon compromis, c'est-à-dire une bonne croissance cellulaire homogène sur le long des pores qui se maintient pendant toute la durée de la culture. Il convient donc d'adapter le débit au système utilisé, comprenant la combinaison d'un bioréacteur et d'un matériau particulier. Ces raisons expliquent la discordance existant entre les

différentes études sur la différenciation ostéoblastique sous perfusion, rendant leur comparaison difficile (Bouet et al., 2015c; Cartmell et al., 2003).

Tout comme dans nos études préliminaires présentées ci-dessus et réalisées sur les substrats macroarchitecturés en boîte de culture, la croissance des cellules de calvaria sous perfusion dans le bioréacteur est apparue stimulée par les angles de 45° (mimant le motif « $T\pi$ ») et moins active dans les angles de 90° (« $T2\pi$ »). Cependant, contrairement à ce que l'on pouvait attendre, la croissance des cellules primaires de calvaria dans les biomatériaux HA était très limitée dans les pores circulaires alors que les mises au point avaient montré qu'après 7 jours de culture les cellules avaient formé une couche tissulaire conséquente. De plus, la coloration au Rouge d'Alizarine a permis d'observer la présence d'une MEC minéralisée importante dans les pores centraux des matériaux en PMMA. Cette différence est sans doute due aux types cellulaires utilisés (C3H10T1/2 pour les mises au point vs cellules primaires de calvaria pour les cultures ostéogéniques), aux compositions de matériaux différents (PMMA vs HA) mais aussi aux textures/microtopographies (surface non polie en PMMA, résolution d'impression des biomatériaux HA). Nous avons tout de même réussi à mettre en évidence la présence de matrice minéralisée déposée par les cellules de calvaria dans un matériau en PMMA, et par conséquent le fait que les progéniteurs sont capables de se différencier en ostéoblastes matures dans nos conditions de culture. De plus, le dosage ELISA a montré la sécrétion de quantités importantes d'OPN par les cultures en biomatériaux HA. L'augmentation des quantités dosées avec le temps de culture reflète certainement l'accumulation d'OPN dans le milieu (le circuit de perfusion est fermé) ; celle-ci est sans doute aussi compensée par la dégradation de la protéine en fragments non dosables (Bouet et al., 2015b). La contribution de ces mécanismes opposés aux valeurs finales dosées n'a pas été évaluée. Le plateau de la courbe entre J14 et J18 pourrait correspondre à la diminution d'OPN observée sur les cultures cellulaires en boîte de Pétri entre J6 et J15 (voir **Etude 1**), diminution qui pourrait être compensée par l'accumulation d'OPN neuve dans le milieu. Il est intéressant de noter que, bien que l'ensemencement des biomatériaux ait été réalisé avec la technique de rotation seule (la moins reproductible), l'écart des valeurs entre les matériaux de géométries différentes s'est maintenu sur la durée de la culture, et la variabilité inter-matériau (voir les écarts-types) est demeurée raisonnable.

Bien que le dosage ELISA ait indiqué une augmentation de l'OPN sécrétée dans les biomatériaux, la qualification du stade de différenciation des ostéoblastes s'est révélée être difficile. En effet, en raison de la forte affinité des ARN messagers pour l'hydroxyapatite, il n'a pas été possible de recueillir suffisamment de matériels pour réaliser des analyses qRT-PCR. De même, des dosages ELISA pour des marqueurs ostéoblastiques matures (ostéocalcine, sclérostine) ne se sont pas révélés concluants du fait de la trop grande dilution de ces protéines dans le milieu de culture circulant et/ou une dégradation trop rapide.

V. Conclusion

Le but de cette étude était de développer un modèle tridimensionnel d'ostéogénèse sous perfusion afin d'explorer les interactions des cellules entre elles et avec leur environnement en réponse des stimuli physiques (forces de cisaillement). Pour utiliser un bioréacteur commercialisé, le bioréacteur BOSE ElectroForce® 5270 BioDynamic®, nous avons développé des biocéramiques en hydroxyapatite à l'architecture adaptée et reproductible. Grâce à cette architecture (canaux longitudinaux), il serait possible de modéliser les flux et les comportements cellulaires dans ce modèle de culture, ce qui se révélerait beaucoup plus difficile dans des structures poreuses à organisation complexe. La modélisation numérique pourrait alors permettre de mieux expliquer et comprendre le comportement des cellules vis-à-vis de divers stimuli.

Après avoir mis au point une technique d'ensemencement reproductible de nos matériaux mais dont la densité de repiquage pourrait être optimisée, le système de culture BOSE nous a permis de cultiver de manière viable des cellules de calvaria de souris sur une durée de 7 à 30 jours. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de différence dans le stade de différenciation ostéoblastique entre les cellules cultivées au sein des pores circulaires et triangulaires, la synthèse de MEC était stimulée dans les angles de 45° des pores triangulaires, en accord avec les résultats obtenus en cultures statiques sur des biomatériaux macroarchitecturés (**Etudes 1 et 2**).

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour optimiser la méthode d'ensemencement et mettre au point une technique permettant d'extraire une quantité suffisante d'ARN messagers pour évaluer l'état de différenciation des cellules. Des études de flux complémentaires avec des cultures de cellules primaires de calvaria de souris en biomatériaux HA permettraient d'ajuster le débit à ce type cellulaire pour stimuler d'avantage leur croissance dans les cultures en 3D. Ces mises au point supplémentaires n'ont pas été possibles au cours de cette étude du fait de contraintes de temps et de coût.

*DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES*

L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre les effets de la macroarchitecture du substrat sur le comportement des ostéoblastes par le développement d'un modèle d'ostéogénèse *in vitro* soumis à des contraintes mécaniques. Ces contraintes mécaniques, sous la forme de forces cisaillement, peuvent être obtenues grâce à l'utilisation d'un bioréacteur qui va créer un flux de perfusion à l'intérieur des biomatériaux. Le but de ce modèle serait, à terme, de tester des molécules pharmacologiques affectant l'ostéogénèse dans un modèle reproductible de physiologie osseuse *in vivo*.

Pour répondre à cet objectif, la première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier l'influence de la géométrie du substrat sur des biomatériaux macroarchitecturés en culture classique (boîte de Pétri). Des cellules ont été cultivées sur des biomatériaux en hydroxyapatite de différentes géométries : plat (Flat), sillons semi-circulaires ($S2\pi$), sillons triangulaires à angle de 90° ($T2\pi$) ou angle de 45° ($T\pi$). Nous avons observé que plus l'angle était refermé, plus la différenciation ostéoblastique était rapide. Cela s'est traduit par une augmentation des niveaux d'expression génique et protéique d'ostéocalcine et de sclérostine. La présence de sclérostine nous indique même la présence d'ostéocyte au sein de notre tissu, démontrant ainsi que les ostéoprogéniteurs ont été capables de réaliser une différenciation ostéoblastique complète. Il est également intéressant de noter que, contrairement à ce qui a été observé dans la littérature, le dépôt de MEC n'était pas strictement proportionnel à la courbure du substrat. Ce n'est qu'au sein de la structure à l'angle le plus fermé (i.e. « $T\pi$ ») que des structures fibreuses minéralisées, orientées parallèlement au fond du substrat ont été observées. Cette orientation s'est confirmée au niveau cellulaire, avec une orientation similaire des fibres de stress et un étirement des noyaux cellulaires. La courbure du substrat influence donc le comportement des cellules en modifiant très probablement leur signalisation intracellulaire. Des investigations plus approfondies seront requises pour comprendre les mécanismes qui sont impliqués, en particulier analyser les changements dans la rigidité de la MEC, signes d'un stade de maturation matricielle différent, et les voies de signalisation cellulaires qui pourraient y répondre (rôle des connexines, de YAP/TAZ, de la famille Hippo (Aragona et al., 2013; Halder et al., 2012; Hoffman et al., 2011)). L'observation de la cinétique du dépôt du tissu, via des coupes histologiques, ainsi qu'un marquage des cellules proliférantes, (immunomarquage Ki67), permettrait également de mieux comprendre pourquoi, contrairement à ce que nous attendions, le dépôt de MEC est

important dans le motif $S2\pi$ par rapport aux motifs $T2\pi$. Il serait également intéressant de cultiver les cellules sur des temps plus importants, afin de voir si le profil d'expression de l'ostéocalcine et de sclérostine sur le matériau plat finit par rattraper celui des biomatériaux macroarchitecturés.

La seconde partie de ces travaux a été le développement d'un modèle d'ostéogénèse 3D au sein d'un bioréacteur à perfusion. A partir des observations ainsi que des résultats précédents, nous avons confirmé qu'une biocéramique à sillons triangulaires était la plus apte à permettre une différenciation ostéoblastique optimale, avec un dépôt tissulaire plus abondant dans les angles 45° , où la fermeture de l'angle correspond à celle du motif « $T\pi$ » (Figure 45).

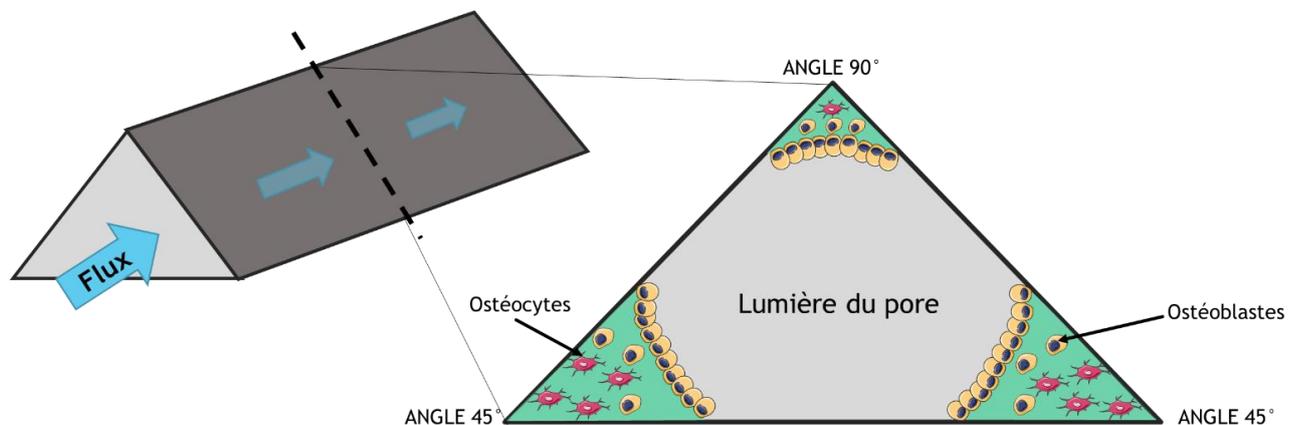


Figure 45 : Section transversale d'un pore triangulaire après culture au sein du bioréacteur (schéma hypothétique).

Les cellules ostéoblastiques ont déposé une matrice extracellulaire dense (en vert) au niveau des angles, et de manière plus importante dans les angles 45° . Les ostéoprogéniteurs se sont différenciés en ostéoblastes dont certains, emmurés dans la MEC, ont atteint le stade ostéocytaire. Ces cellules et cette MEC forment un tissu osseux *in vitro*, capable de répondre aux contraintes mécaniques de l'environnement.

Cependant, si nous avons validé le système de culture (biocéramique, perfusion, bioréacteur), cela n'a malheureusement pas été fait avec les mêmes types cellulaires (C3H10T1/2 vs cellules primaires de calvaria de souris) ni la même composition (hydroxyapatite vs PMMA), ce qui pourrait expliquer les variations des résultats obtenus, et notamment sur le dépôt de MEC.

Le coût relativement élevé de cette étude en bioréacteurs (matière première, temps-machine, temps-personnel, pour un nombre important de matériaux) ne nous permettrait pas de poursuivre ce projet avec des matériaux en hydroxyapatite. Un nouveau projet développé au sein de notre laboratoire, en collaboration avec l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Saint-Etienne (ENISE), débutera prochainement, basé en partie sur les résultats de ces travaux de thèse. Des biomatériaux en titane TiA6V, de

même géométrie (canaux circulaires et triangulaires) que ceux que nous avons utilisés, seront cultivés au sein du bioréacteur BOSE avec des cellules souches squelettiques humaines (PT2501, Lonza) et sur le long terme (15 à 30 jours). Les résultats obtenus avec ces nouvelles caractéristiques (composition, cellules) pourront alors être comparés avec nos données, que ce soit en termes de croissance cellulaire, d'état de différenciation ou présence de minéralisation.

Un autre développement potentiel de ce travail serait son application à la réparation de défauts osseux *in vivo*, avec des matériaux présentant les différents types de géométries, afin d'observer si, comme dans nos résultats, l'ostéointégration est réellement favorisée par des structures fermées (« $T\pi$ »). L'application peut également s'étendre au revêtement de matériaux existants, comme par exemple les matériaux en titane destinés aux prothèses. Si les biomatériaux en titane sont souvent recouverts d'un revêtement en hydroxyapatite pour stimuler l'ostéointégration, leur surface est « lisse » ou présente des nano-motifs. L'ajout d'une macrostructure permettrait de stimuler le dépôt d'un néo-tissu, ainsi que de sa minéralisation accélérée. De plus, la présence de motifs seuls permet d'induire une ostéogénèse tout en passant de facteurs de croissance dont BMP-2, connu pour avoir provoqué des ossifications ectopiques en raison d'une libération non contrôlée dans l'organisme. Une autre étude a également montré que des céramiques en HA silicatée à pores triangulaires stimulaient la vascularisation *in vivo*, et ce en absence de VEGF (Magnaudeix et al., 2016).

Pour conclure ce manuscrit, il est important de souligner que l'ingénierie tissulaire osseuse ne se borne pas uniquement à la réparation de défauts osseux mais intervient également dans le développement de modèles *in vitro* s'efforçant de reproduire de manière à la fois fidèle et contrôlable la physiologie des tissus *in vivo*. Ces modèles peuvent en particulier enrichir la compréhension de la physiopathologie osseuse et pourraient servir, à terme, à tester et valider de nouvelles molécules pharmacologiques (Bouet et al., 2015c). A l'heure où les modèles animaux sont de plus en plus remis en cause et où la réglementation sur leur utilisation se durcit de plus en plus, les modèles de culture 3D apparaissent comme une alternative à ceux-ci.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akay, G., Birch, M.A., and Bokhari, M.A. (2004). Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials* 25, 3991–4000.
- Anselme, K., Ponche, A., and Bigerelle, M. (2010). Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* 224, 1487–1507.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 154, 1047–1059.
- Balla, V.K., Bodhak, S., Bose, S., and Bandyopadhyay, A. (2010). Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and in vitro biological properties. *Acta Biomater.* 6, 3349–3359.
- Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., Dolder, J. van den, Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., and Mikos, A.G. (2002). Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12600–12605.
- Barati, D., Shariati, S.R.P., Moeinzadeh, S., Melero-Martin, J.M., Khademhosseini, A., and Jabbari, E. (2016). Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 223, 126–136.
- Barron, M.J., Goldman, J., Tsai, C.-J., and Donahue, S.W. (2012). Perfusion flow enhances osteogenic gene expression and the infiltration of osteoblasts and endothelial cells into three-dimensional calcium phosphate scaffolds. *Int. J. Biomater.* 2012, 915620.
- Bellows, C.G., and Aubin, J.E. (1989). Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* 133, 8–13.

Bianchi, M., Urquia Edreira, E.R., Wolke, J.G.C., Birgani, Z.T., Habibovic, P., Jansen, J.A., Tampieri, A., Marcacci, M., Leeuwenburgh, S.C.G., and van den Beucken, J.J.J.P. (2014). Substrate geometry directs the in vitro mineralization of calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater.* 10, 661–669.

Bianco, P., and Robey, P.G. (2015). Skeletal stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 142, 1023–1027.

Bidan, C.M., Kommareddy, K.P., Rumpler, M., Kollmannsberger, P., Bréchet, Y.J.M., Fratzl, P., and Dunlop, J.W.C. (2012). How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *PLoS One* 7, e36336.

Bidan, C.M., Kommareddy, K.P., Rumpler, M., Kollmannsberger, P., Fratzl, P., and Dunlop, J.W.C. (2013). Geometry as a Factor for Tissue Growth: Towards Shape Optimization of Tissue Engineering Scaffolds. *Adv. Healthc. Mater.* 2, 186–194.

Biggs, M.J.P., Richards, R.G., Gadegaard, N., Wilkinson, C.D.W., and Dalby, M.J. (2007). The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 399–404.

Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R., and Gluck, S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855–857.

Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* 26, 229–238.

Bonewald, L.F., Harris, S.E., Rosser, J., Dallas, M.R., Dallas, S.L., Camacho, N.P., Boyan, B., and Boskey, A. (2003). Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. *Calcif. Tissue Int.* 72, 537–547.

Botchwey, E.A., Pollack, S.R., Levine, E.M., Johnston, E.D., and Laurencin, C.T. (2004). Quantitative analysis of three-dimensional fluid flow in rotating bioreactors for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 69, 205–215.

Bouet, G., Cruel, M., Laurent, C., Vico, L., Malaval, L., and Marchat, D. (2015a). Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold. *Eur. Cell. Mater.* 29, 250-266-267.

Bouet, G., Boulefour, W., Juignet, L., Linossier, M.-T., Thomas, M., Vanden-Bossche, A., Aubin, J.E., Vico, L., Marchat, D., and Malaval, L. (2015b). The Impairment of Osteogenesis in Bone Sialoprotein (BSP) Knockout Calvaria Cell Cultures Is Cell Density Dependent. *PLoS ONE* 10, e0117402.

Bouet, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., and Vico, L. (2015c). In vitro three-dimensional bone tissue models: from cells to controlled and dynamic environment. *Tissue Eng. Part B Rev.* 21, 133–156.

Brammer, K.S., Choi, C., Frandsen, C.J., Oh, S., Johnston, G., and Jin, S. (2011). Comparative cell behavior on carbon-coated TiO₂ nanotube surfaces for osteoblasts vs. osteo-progenitor cells. *Acta Biomater.* 7, 2697–2703.

Brown, A.E.X., and Discher, D.E. (2009). Conformational changes and signaling in cell and matrix physics. *Curr. Biol. CB* 19, R781-789.

Caille, N., Tardy, Y., and Meister, J.J. (1998). Assessment of strain field in endothelial cells subjected to uniaxial deformation of their substrate. *Ann. Biomed. Eng.* 26, 409–416.

Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136, 1307–1322.

Carpenter, T.O., Moltz, K.C., Ellis, B., Andreoli, M., McCarthy, T.L., Centrella, M., Bryan, D., and Gundberg, C.M. (1998). Osteocalcin Production in Primary Osteoblast Cultures Derived from Normal and Hyp Mice. *Endocrinology* 139, 35–43.

Carrier, R.L., Papadaki, M., Rupnick, M., Schoen, F.J., Bursac, N., Langer, R., Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. (1999). Cardiac tissue engineering: Cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 580–589.

Cartmell, S.H., Porter, B.D., García, A.J., and Guldberg, R.E. (2003). Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Eng.* 9, 1197–1203.

Cha, H.D., Hong, J.M., Kang, T.-Y., Jung, J.W., Ha, D.-H., and Cho, D.-W. (2012). Effects of micro-patterns in three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications. *J. Micromechanics Microengineering* 22, 125002.

Chang, M.K., Raggatt, L.-J., Alexander, K.A., Kuliwaba, J.S., Fazzalari, N.L., Schroder, K., Maylin, E.R., Ripoll, V.M., Hume, D.A., and Pettit, A.R. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 1232–1244.

Charbonnier, B., Laurent, C., Blanc, G., Valfort, O., and Marchat, D. (2016a). Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations. *Adv. Eng. Mater.* n/a-n/a.

Charbonnier, B., Laurent, C., and Marchat, D. (2016b). Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization. *J. Eur. Ceram. Soc.* 36, 4269–4279.

Chen, N.X., Ryder, K.D., Pavalko, F.M., Turner, C.H., Burr, D.B., Qiu, J., and Duncan, R.L. (2000). Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 278, C989–C997.

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 3, S131–S139.

Conconi, M.T., Tommasini, M., Baiguera, S., De Coppi, P., Parnigotto, P.P., and Nussdorfer, G.G. (2002). Effects of prostaglandins E1 and E2 on the growth and differentiation of osteoblast-like cells cultured in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 10, 451–456.

Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., and Hayes, J.S. (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur. Cell. Mater.* 24, 1–17.

Dabrowski, B., Swieszkowski, W., Godlinski, D., and Kurzydowski, K.J. (2010). Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 95B, 53–61.

Dalby, M.J., Riehle, M.O., Johnstone, H., Affrossman, S., and Curtis, A.S.G. (2004). Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. *Cell Biol. Int.* *28*, 229–236.

Dalby, M.J., Biggs, M.J.P., Gadegaard, N., Kalna, G., Wilkinson, C.D.W., and Curtis, A.S.G. (2007). Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. *J. Cell. Biochem.* *100*, 326–338.

Damsky, C.H. (1999). Extracellular matrix–integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* *25*, 95–96.

Das, K., Balla, V.K., Bandyopadhyay, A., and Bose, S. (2008). Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants. *Scr. Mater.* *59*, 822–825.

David, V., Martin, A., Lafage-Proust, M.-H., Malaval, L., Peyroche, S., Jones, D.B., Vico, L., and Guignandon, A. (2007). Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* *148*, 2553–2562.

Davidson, E.H., Reformat, D.D., Allori, A., Canizares, O., Janelle Wagner, I., Saadeh, P.B., and Warren, S.M. (2012). Flow perfusion maintains ex vivo bone viability: a novel model for bone biology research. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *6*, 769–776.

Denhardt, D.T., and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *7*, 1475–1482.

Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* *310*, 1139–1143.

Douard, N., Leclerc, L., Sarry, G., Bin, V., Marchat, D., Forest, V., and Pourchez, J. (2016). Impact of the chemical composition of poly-substituted hydroxyapatite particles on the in vitro pro-inflammatory response of macrophages. *Biomed. Microdevices* *18*, 27.

Du, D., Furukawa, K.S., and Ushida, T. (2009). 3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1670–1678.

Dubey, D.K., and Tomar, V. (2009). Role of the nanoscale interfacial arrangement in mechanical strength of tropocollagen–hydroxyapatite-based hard biomaterials. *Acta Biomater.* 5, 2704–2716.

Dumas, V., Guignandon, A., Vico, L., Mauclair, C., Zapata, X., Linossier, M.T., Boulefour, W., Granier, J., Peyroche, S., Dumas, J.-C., et al. (2015). Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment. *Biomed. Mater.* 10, 55002.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183.

Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F.H., van der Rest, M., and Pereira, G. (1983). Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell Biol.* 96, 639–643.

Engelmayr, G.C., Papworth, G.D., Watkins, S.C., Mayer, J.E., and Sacks, M.S. (2006). Guidance of engineered tissue collagen orientation by large-scale scaffold microstructures. *J. Biomech.* 39, 1819–1831.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.

Faia-Torres, A.B., Charnley, M., Goren, T., Guimond-Lischer, S., Rottmar, M., Maniura-Weber, K., Spencer, N.D., Reis, R.L., Textor, M., and Neves, N.M. (2015). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study. *Acta Biomater.* 28, 64–75.

Fedarko, N.S., Moerike, M., Brenner, R., Robey, P.G., and Vetter, U. (1992). Extracellular matrix formation by osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 7, 921–930.

Fernandes, R.J., Harkey, M.A., Weis, M., Askew, J.W., and Eyre, D.R. (2007). The post-translational phenotype of collagen synthesized by SAOS-2 osteosarcoma cells. *Bone* 40, 1343–1351.

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., Rigo, Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., et al. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2015, 2015, e421746.

Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 235, 176–190.

Fricain, J.C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S.M., Siadous, R., Catros, S., Lalande, C., Bareille, R., Renard, M., et al. (2013). A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 34, 2947–2959.

Fronzoza, C., Sohrabi, A., and Hungerford, D. (1996). Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. *Biomaterials* 17, 879–888.

Frost, H.M. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat. Rec.* 226, 414–422.

Fukumoto, S., and Martin, T.J. (2009). Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 230–236.

Gamsjäger, E., Bidan, C.M., Fischer, F.D., Fratzl, P., and Dunlop, J.W.C. (2013). Modelling the role of surface stress on the kinetics of tissue growth in confined geometries. *Acta Biomater.* 9, 5531–5543.

Goldstein, A.S., Juarez, T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C., and Mikos, A.G. (2001). Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 22, 1279–1288.

Gothard, D., Smith, E.L., Kanczler, J.M., Rashidi, H., Qutachi, O., Henstock, J., Rotherham, M., El Haj, A., Shakesheff, K.M., and Oreffo, R.O.C. (2014). Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur. Cell. Mater.* 28, 166-207-208.

Grayson, W.L., Marolt, D., Bhumiratana, S., Fröhlich, M., Guo, X.E., and Vunjak-Novakovic, G. (2011). Optimizing the medium perfusion rate in bone tissue engineering bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1159–1170.

Habraken, W.J.E.M., Wolke, J.G.C., and Jansen, J.A. (2007). Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 234–248.

Hadjidakis, D.J., and Androulakis, I.I. (2006). Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396.

Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 591–600.

Handel, M., Hammer, T.R., Noeaid, P., Boccaccini, A.R., and Hofer, D. (2013). 45S5-Bioglass(®)-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng. Part A* 19, 2703–2712.

Hausser, H.-J., and Brenner, R.E. (2005). Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 216–222.

Hench, L.L. (2006). The story of Bioglass. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17, 967–978.

Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2007). Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1115–1127.

Hoey, D.A., Chen, J.C., and Jacobs, C.R. (2012). The primary cilium as a novel extracellular sensor in bone. *Bone Res.* 3, 75.

Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316–323.

Holthaus, M.G., Stolle, J., Treccani, L., and Rezwan, K. (2012). Orientation of human osteoblasts on hydroxyapatite-based microchannels. *Acta Biomater.* 8, 394–403.

Holtorf, H.L., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., and Mikos, A.G. (2005). Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann. Biomed. Eng.* 33, 1238–1248.

Holy, C.E., Shoichet, M.S., and Davies, J.E. (2000). Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 376–382.

Hosseinkhani, H., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., and Tabata, Y. (2005). Perfusion Culture Enhances Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells in Collagen Sponge Reinforced with Poly(Glycolic Acid) Fiber. *Tissue Eng.* 11, 1476–1488.

Hunter, G.K., Kyle, C.L., and Goldberg, H.A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* 300 (Pt 3), 723–728.

Ichinohe, N., Takamoto, T., and Tabata, Y. (2008). Proliferation, Osteogenic Differentiation, and Distribution of Rat Bone Marrow Stromal Cells in Nonwoven Fabrics by Different Culture Methods. *Tissue Eng. Part A* 14, 107–116.

Ingber, D.E. (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 20, 811–827.

Jeon, H., Hidai, H., Hwang, D.J., Healy, K.E., and Grigoropoulos, C.P. (2010). The effect of micronscale anisotropic cross patterns on fibroblast migration. *Biomaterials* 31, 4286–4295.

Kapur, S., Baylink, D.J., and William Lau, K.-H. (2003). Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone* 32, 241–251.

Karageorgiou, V., and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474–5491.

- Karsenty, G. (2000). Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 85–89.
- Karsenty, G., and Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 481, 314–320.
- Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., and Schwartz, M.A. (2004). Integrins in mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 279, 12001–12004.
- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., and Karsenty, G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 276, 7101–7107.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19017–19022.
- Kim, B.-S., Putnam, A.J., Kulik, T.J., and Mooney, D.J. (1998). Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 46–54.
- Kim, D.-H., Cho, S., and Wirtz, D. (2014). Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J. Cell Sci.* 127, 2528–2541.
- Kim, S.W., Pajevic, P.D., Selig, M., Barry, K.J., Yang, J.-Y., Shin, C.S., Baek, W.-Y., Kim, J.-E., and Kronenberg, H.M. (2012). Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 2075–2084.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245–248.
- Kirmizidis, G., and Birch, M.A. (2009). Microfabricated grooved substrates influence cell-cell communication and osteoblast differentiation in vitro. *Tissue Eng. Part A* 15, 1427–1436.

Knychala, J., Bouropoulos, N., Catt, C.J., Katsamenis, O.L., Please, C.P., and Sengers, B.G. (2013). Pore Geometry Regulates Early Stage Human Bone Marrow Cell Tissue Formation and Organisation. *Ann. Biomed. Eng.* 41, 917–930.

Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., and Yamamoto, S. (1981). Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* 23, 899–901.

Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., and Takayanagi, H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat. Med.* 11, 880–885.

Komori, T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 339, 189–195.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., et al. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.

Krause, C., Korchynskyi, O., de Rooij, K., Weidauer, S.E., de Gorter, D.J.J., van Bezooijen, R.L., Hatsell, S., Economides, A.N., Mueller, T.D., Löwik, C.W.G.M., et al. (2010). Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 285, 41614–41626.

Kreke, M.R., Sharp, L.A., Lee, Y.W., and Goldstein, A.S. (2008). Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 14, 529–537.

Kristensen, H.B., Andersen, T.L., Marcussen, N., Rolighed, L., and Delaisse, J.-M. (2014). Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. *Am. J. Pathol.* 184, 778–789.

Kuboki, Y., Jin, Q., and Takita, H. (2001). Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83–A Suppl 1, S105-115.

Kwon, R.Y., Temiyasathit, S., Tummala, P., Quah, C.C., and Jacobs, C.R. (2010). Primary cilium-dependent mechanosensing is mediated by adenylyl cyclase 6 and cyclic AMP in bone cells. *FASEB J.* 24, 2859–2868.

Lamers, E., Frank Walboomers, X., Domanski, M., te Riet, J., van Delft, F.C.M.J.M., Luttge, R., Winnubst, L.A.J.A., Gardeniers, H.J.G.E., and Jansen, J.A. (2010). The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials* 31, 3307–3316.

Lan Levensgood, S.K., Polak, S.J., Wheeler, M.B., Maki, A.J., Clark, S.G., Jamison, R.D., and Wagoner Johnson, A.J. (2010). Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 31, 3552–3563.

Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920–926.

Leclerc, E., David, B., Griscom, L., Lepioufle, B., Fujii, T., Layrolle, P., and Legallais, C. (2006). Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials* 27, 586–595.

Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., et al. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* 130, 456–469.

Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Lasky, L.C., and Yang, S.-T. (2001). Effects of Filtration Seeding on Cell Density, Spatial Distribution, and Proliferation in Nonwoven Fibrous Matrices. *Biotechnol. Prog.* 17, 935–944.

Lichte, P., Pape, H.C., Pufe, T., Kobbe, P., and Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury* 42, 569–573.

Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., and Aubin, J.E. (1994). Simultaneous Detection of Multiple Bone-Related mRNAs and Protein Expression during Osteoblast Differentiation: Polymerase Chain Reaction and Immunocytochemical Studies at the Single Cell Level. *Dev. Biol.* 166, 220–234.

Loesberg, W.A., te Riet, J., van Delft, F.C.M.J.M., Schön, P., Figdor, C.G., Speller, S., van Loon, J.J.W.A., Walboomers, X.F., and Jansen, J.A. (2007). The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials* 28, 3944–3951.

Magnaudeix, A., Usseglio, J., Lasgorceix, M., Lalloue, F., Damia, C., Brie, J., Pascaud-Mathieu, P., and Champion, E. (2016). Quantitative analysis of vascular colonisation and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model. *Acta Biomater.* 38, 179–189.

Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., and Aubin, J.E. (1994). Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J. Cell. Physiol.* 158, 555–572.

Malaval, L., Liu, F., Roche, P., and Aubin, J.E. (1999). Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 74, 616–627.

Malone, A.M.D., Anderson, C.T., Tummala, P., Kwon, R.Y., Johnston, T.R., Stearns, T., and Jacobs, C.R. (2007). Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13325–13330.

Maniatopoulos, C., Sodek, J., and Melcher, A.H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 254, 317–330.

Martínez, M.E., del Campo, M.T., Medina, S., Sánchez, M., Sánchez-Cabezudo, M.J., Esbrit, P., Martínez, P., Moreno, I., Rodrigo, A., Garcés, M.V., et al. (1999). Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif. Tissue Int.* 64, 280–286.

McCoy, R. j., Jungreuthmayer, C., and O'Brien, F. j. (2012a). Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1583–1594.

- McCoy, R.J., Jungreuthmayer, C., and O'Brien, F.J. (2012b). Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* *109*, 1583–1594.
- McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O., and Teitelbaum, S.L. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.* *105*, 433–440.
- McKee, C.T., Raghunathan, V.K., Nealey, P.F., Russell, P., and Murphy, C.J. (2011). Topographic Modulation of the Orientation and Shape of Cell Nuclei and Their Influence on the Measured Elastic Modulus of Epithelial Cells. *Biophys. J.* *101*, 2139–2146.
- Mechiche Alami, S., Gangloff, S.C., Laurent-Maquin, D., Wang, Y., and Kerdjoudj, H. (2016). Concise Review: In Vitro Formation of Bone-Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*
- Melchels, F.P.W., Domingos, M.A.N., Klein, T.J., Malda, J., Bartolo, P.J., and Hutmacher, D.W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Prog. Polym. Sci.* *37*, 1079–1104.
- Miller, S.C., de Saint-Georges, L., Bowman, B.M., and Jee, W.S. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* *3*, 953-960-961.
- Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuan, P., Sricholpech, M., Boskey, A.L., and Yamauchi, M. (2009). Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol.* *28*, 44–52.
- Mulari, M., Vääräniemi, J., and Väänänen, H.K. (2003). Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* *61*, 496–503.
- Murphy, C.M., Haugh, M.G., and O'Brien, F.J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* *31*, 461–466.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17–29.

Nastase, M.V., Young, M.F., and Schaefer, L. (2012). Biglycan. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 963–975.

Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2002). Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Lett.* 514, 238–242.

Nguyen, A.T., Sathe, S.R., and Yim, E.K.F. (2016). From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J. Phys. Condens. Matter* 28, 183001.

Oh, S., Oh, N., Appleford, M., and Ong, J.L. (2006). Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2, 49–56.

Oh, S.H., Kim, T.H., Im, G.I., and Lee, J.H. (2010). Investigation of pore size effect on chondrogenic differentiation of adipose stem cells using a pore size gradient scaffold. *Biomacromolecules* 11, 1948–1955.

Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W.H., Beddington, R.S.P., Mundlos, S., Olsen, B.R., et al. (1997). *Cbfa1*, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* 89, 765–771.

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, 273–286.

Pelham, R.J., and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13661–13665.

Persidis, A. (1999). Tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 17, 508–510.

Peterson, L.J., Rajfur, Z., Maddox, A.S., Freel, C.D., Chen, Y., Edlund, M., Otey, C., and Burridge, K. (2004). Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol. Biol. Cell* 15, 3497–3508.

- Poole, K.E.S., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., and Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1842–1844.
- Pritchard, C.A., Hayes, L., Wojnowski, L., Zimmer, A., Marais, R.M., and Norman, J.C. (2004). B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5937–5952.
- Rahaman, M.N., Day, D.E., Bal, B.S., Fu, Q., Jung, S.B., Bonewald, L.F., and Tomsia, A.P. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 7, 2355–2373.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243–247.
- Reznikoff, C.A., Brankow, D.W., and Heidelberger, C. (1973). Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* 33, 3231–3238.
- Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., and Boccaccini, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413–3431.
- Ripamonti, U., Roden, L.C., and Renton, L.F. (2012). Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials* 33, 3813–3823.
- Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldridge, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E., et al. (2008). Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *J. Biol. Chem.* 283, 5866–5875.
- Rouwkema, J., Rivron, N.C., and van Blitterswijk, C.A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26, 434–441.
- Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W., van Dongen, J.T., and Fratzl, P. (2008). The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J. R. Soc. Interface* 5, 1173–1180.

Saiz, E., Zimmermann, E.A., Lee, J.S., Wegst, U.G.K., and Tomsia, A.P. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* 29, 103–115.

Saldaña, L., Bensiamar, F., Boré, A., and Vilaboa, N. (2011). In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater.* 7, 4210–4221.

Santos, A., Bakker, A.D., Zandieh-Doulabi, B., Semeins, C.M., and Klein-Nulend, J. (2009). Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 1280–1287.

Scarano, A., Degidi, M., Perrotti, V., Degidi, D., Piattelli, A., and Iezzi, G. (2014). Experimental evaluation in rabbits of the effects of thread concavities in bone formation with different titanium implant surfaces. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 16, 572–581.

Seménov, M., Tamai, K., and He, X. (2005). SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280, 26770–26775.

Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., and Best, S.M. (2012). Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2335–2347.

Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., and Mikos, A.G. (2002). Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 136–148.

Sims, N.A., and Martin, T.J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Rep.* 3, 481.

Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93, 4453–4461.

Sottile, J., and Hocking, D.C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* 13, 3546–3559.

Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., and Gasser, S.M. (2004). The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* 38, 305–345.

Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, S.A., and Alberts, A.S. (2000). Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol. Cell* 5, 13–25.

Tong, S., Xu, D., Liu, Z., Du, Y., and Wang, X. (2016). Synthesis of the New-Type Vascular Endothelial Growth Factor-Silk Fibroin-Chitosan Three-Dimensional Scaffolds for Bone Tissue Engineering and In Vitro Evaluation. *J. Craniofac. Surg.* 27, 509–515.

Trappmann, B., and Chen, C.S. (2013). How cells sense extracellular matrix stiffness: a material's perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 948–953.

Tsigkou, O., Hench, L.L., Boccaccini, A.R., Polak, J.M., and Stevens, M.M. (2007). Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80, 837–851.

Unsworth, B.R., and Lelkes, P.I. (1998). Growing tissues in microgravity. *Nat. Med.* 4, 901–907.

Urquia Edreira, E.R., Hayrapetyan, A., Wolke, J.G.C., Croes, H.J.E., Klymov, A., Jansen, J.A., and van den Beucken, J.J.J.P. (2016). Effect of calcium phosphate ceramic substrate geometry on mesenchymal stromal cell organization and osteogenic differentiation. *Biofabrication* 8, 25006.

Viateau, V., Manassero, M., Sensébé, L., Langonné, A., Marchat, D., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., and Bensidhoum, M. (2016). Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10, E177-187.

Vishavkarma, R., Raghavan, S., Kuyyamudi, C., Majumder, A., Dhawan, J., and Pullarkat, P.A. (2014). Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading. *PloS One* 9, e107895.

Voegele, T.J., Voegele-Kadletz, M., Esposito, V., Macfelda, K., Oberndorfer, U., Vecsei, V., and Schabus, R. (2000). The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res.* 20, 3575–3581.

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P.H., and Franceschi, R.T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 14, 893–903.

Wang, N., Tytell, J.D., and Ingber, D.E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 75–82.

Weber, I.T., Harrison, R.W., and Iozzo, R.V. (1996). Model Structure of Decorin and Implications for Collagen Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 31767–31770.

Wei, J., Hanna, T., Suda, N., Karsenty, G., and Ducy, P. (2014). Osteocalcin Promotes β -Cell Proliferation During Development and Adulthood Through Gprc6a. *Diabetes* 63, 1021–1031.

Wendt, D., Marsano, A., Jakob, M., Heberer, M., and Martin, I. (2003). Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 205–214.

Xia, L., Lin, K., Jiang, X., Fang, B., Xu, Y., Liu, J., Zeng, D., Zhang, M., Zhang, X., Chang, J., et al. (2014). Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials* 35, 8514–8527.

Xue, W., Krishna, B.V., Bandyopadhyay, A., and Bose, S. (2007). Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta Biomater.* 3, 1007–1018.

Yan, X.-Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J.A., and Both, S.K. (2014). Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Eng. Part C Methods* 20, 198–204.

Yeatts, A.B., and Fisher, J.P. (2011). Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48, 171–181.

Yoon, J.-K., Kim, H.N., Bhang, S.H., Shin, J.-Y., Han, J., La, W.-G., Jeong, G.-J., Kang, S., Lee, J.-R., Oh, J., et al. (2016). Enhanced Bone Repair by Guided Osteoblast Recruitment Using Topographically Defined Implant. *Tissue Eng. Part A* 22, 654–664.

You, J., Reilly, G.C., Zhen, X., Yellowley, C.E., Chen, Q., Donahue, H.J., and Jacobs, C.R. (2001). Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 13365–13371.

Yu, X., Botchwey, E.A., Levine, E.M., Pollack, S.R., and Laurencin, C.T. (2004). Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11203–11208.

Zhang, Y., Zhou, P., and Kimondo, J.W. (2012). Adiponectin and osteocalcin: relation to insulin sensitivity. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 90, 613–620.

ANNEXES

Publications et communications

I. Articles

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Boulefour, W., Thomas, M., Laurent, C., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro (soumis à Acta Biomaterialia)

Juignet, L., Charbonnier, B., Guignandon, A., Dumas, V., Boulefour, W., Laurent, C., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. Impact of macroarchitecture on osteoblast cell orientation and extracellular matrix deposition (in preparation)

Boulefour, W., **Juignet, L.**, Verdière, L., Machuca, I., Thomas, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Concordet, J.P., Aubert, D., Teixeira, M., Vico, L., Lafage-Proust, M.H., Malaval, L. Double knockout of Osteopontin and Bone Sialoprotein genes results in high cortical porosity and hypomineralization (in preparation)

Boulefour, W., **Juignet, L.**, Bouet, G., Granito, R.N., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J.E., Lafage-Proust, M.-H., Vico, L., Malaval, L. 2016. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. Matrix Biology 52–54, 60–77

Bouet G., Boulefour W., **Juignet L.**, Linossier M.T., Thomas M., Vanden-Bossche A., Aubin J.E., Vico L., Marchat D., Malaval L. 2015. The impairment of osteogenesis in bone sialoprotein (BSP) knockout calvaria cell cultures is cell density dependent. PLoS ONE 10, e0117402.

II. Communications orales

- How are the differentiation and activity of osteoblasts affected by the substrate geometry ?

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Linossier, M.T., Thomas, M., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. 18^e journées françaises de biologie des tissus minéralisés, 1^{er}-3 juin 2016, Nancy, France

- Impact of substrate curvature of hydroxyapatite scaffold on osteogenesis.

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Thomas, M., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. Journée des chercheurs IVTV, 8 mars 2016, Saint-Etienne, France

- Modèle 3D multicellulaire de remodelage osseux *in vitro* sous perfusion.

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. Journée Bien Vieillir, 29 novembre 2014, Lyon, France

- Modèle d'ostéogénèse in vitro sur support en PMMA dans un bioréacteur BOSE.

Juignet, L., Charbonnier, B., Peyroche, S., Dumas, V., Douard, N., Marchat, D., Vico, L., Malaval, L. Rencontre Ingénierie Santé, 15-16 octobre 2014, Saint-Priest-en-Jarez, France

III. Communications affichées

- Impact of cell substrate curvature on matrix deposition and osteoblastic behavior.

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) annual meeting, 16-19 septembre 2016, Atlanta, Etats-Unis

- Impact of cell substrate shape on matrix deposition and osteoblastic behavior.

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. 22nd Congress of European Society of Biomechanics, 10-13 juillet 2016, Lyon, France

- Impact of cell substrate shape on matrix deposition and osteoblastic behavior.

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. XVII^e European Cells & Materials congress, 20-23 juin 2016, Davos, Suisse

- Comment la géométrie du substrat influence-t-elle l'ostéogénèse ?

Juignet, L., Charbonnier, B., Dumas, V., Laurent, C., Thomas, M., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. Journée de l'école doctorale Sciences, Ingénierie, Santé, 16 juin 2016, Saint-Etienne, France

- Development of an in vitro model of osteogenesis in 3D biomaterials.

Juignet, L., Dumas, V., Peyroche, S., Vico, L., Marchat, D., Douard, N., Malaval, L. 17^e journées françaises de biologie des tissus minéralisés, 4-6 février 2015, Clermont-Ferrand, France

- Modèle in vitro d'ostéogénèse sur support en PMMA dans le bioréacteur BOSE® Electroforce® 5270.

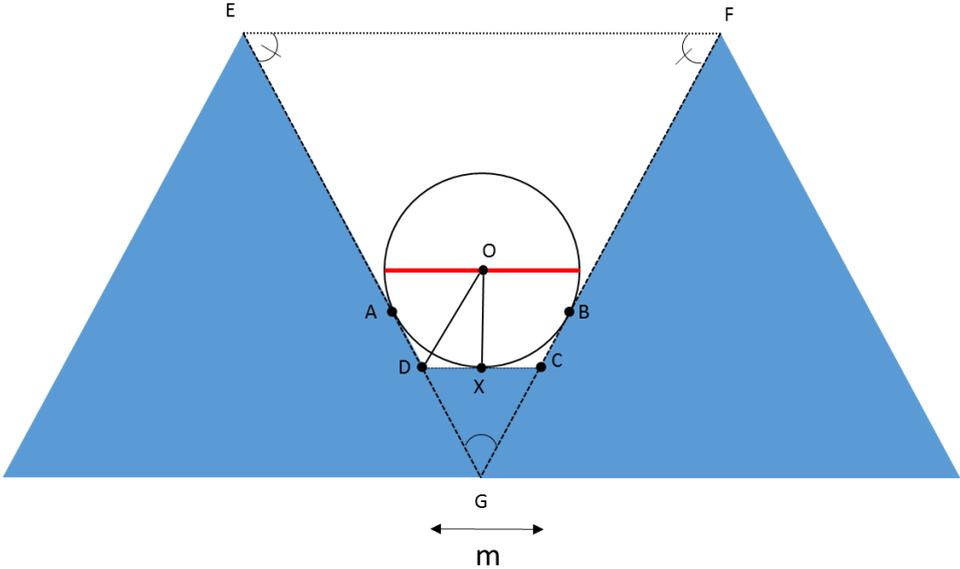
Juignet, L., Charbonnier, B., Peyroche, S., Dumas, V., Douard, N., Marchat, D., Vico, L., Malaval, L. Rencontres Ingénierie Santé (RIS), 15-16 octobre 2014, Saint-Priest-en-Jarez, France

Calcul de la courbure du substrat sur les matériaux macroarchitecturés

	Notation
Nombre de sillons/substrat	N
Diamètre moyen des substrats	D
Profondeur des sillons	H
Largeur du méplat des sillons	m
Angle	A
Hauteur de MEC	h

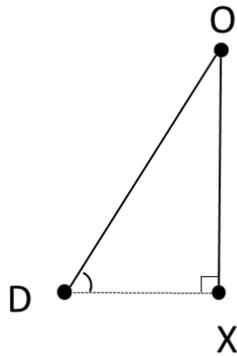
I. Matériaux à sillons triangulaires

1. Rayon de courbure



Sachant $m=DC$ et le cercle de la courbure, de centre O et de rayon OX

Sachant que l'angle $\widehat{AD}X$ est l'angle supplémentaire de \widehat{GEF} (i.e. somme des angles égale à 180°) :



$$\tan \widehat{ODX} = \frac{OX}{DX}$$

$$OX = DX \cdot (\tan \widehat{ODX}) = \left(\frac{m}{2}\right) \cdot \tan \widehat{ODX}$$

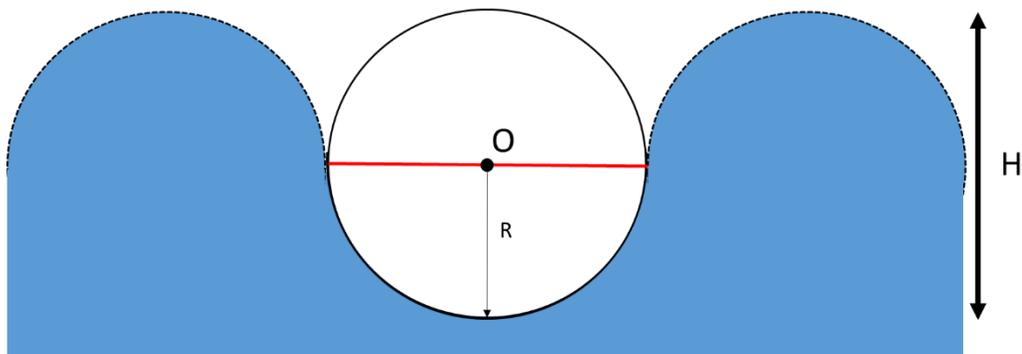
2. Courbure

La courbure K correspond à l'inverse du rayon de courbure

$$K = \frac{1}{R} = \frac{1}{OX} = \frac{1}{\left(\frac{m}{2}\right) \cdot (\tan \widehat{ODX})}$$

II. Matériaux à sillons circulaires

1. Rayon de courbure



$$H = 2R$$

$$R = \frac{H}{2}$$

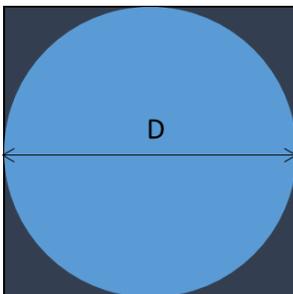
2. Courbure

La courbure K correspond à l'inverse du rayon de courbure

$$K = \frac{1}{R} = \frac{1}{\frac{H}{2}} = \frac{2}{H}$$

Calcul de la surface et du volume au sein des matériaux macroarchitecturés

	Notation
Nombre de sillons/substrat	N
Diamètre moyen des substrats	D
Profondeur des sillons	H
Largeur du méplat des sillons	m
Angle	A
Hauteur de MEC	h

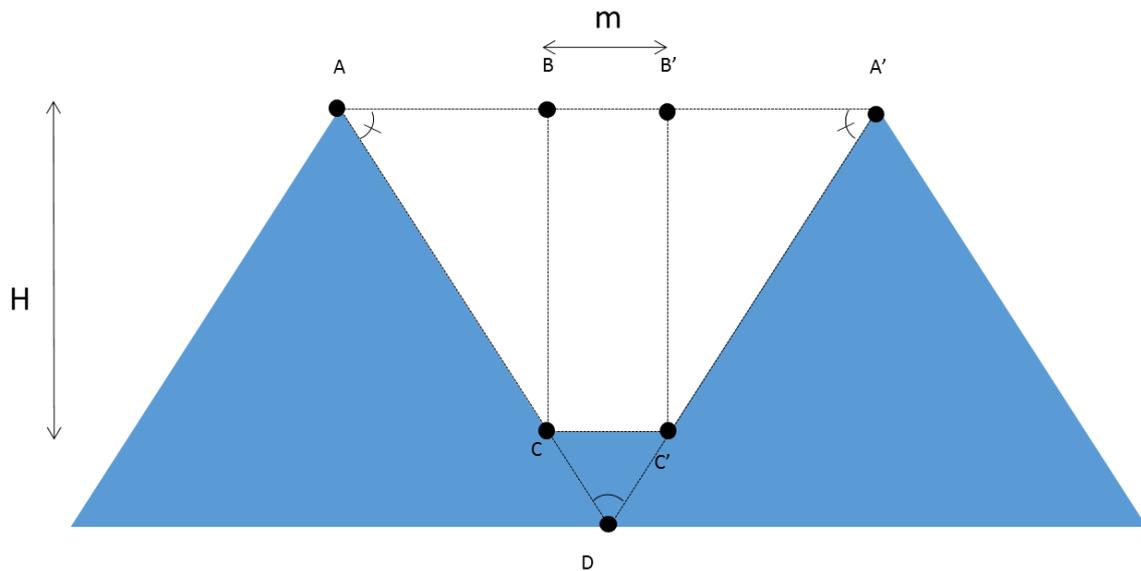


$$\text{Aire du substrat} = \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

$$\text{Aire du carré équivalent} = D^2$$

$$\text{Aire } \frac{\text{substrat}}{\text{carré}} \text{ équivalent} = \frac{\pi}{4}$$

I. Matériau



1. Calcul de l'aire du matériau

a. Aire du sillon diamétral

Aire du sillon diamétral = $(AC + CC' + C'A') \times D = (2AC + CC') \times D$

$$\triangleright AC = \frac{BC}{\sin A} = \frac{H}{\sin A}$$

$$\text{Aire du sillon diamétral} = \left(\frac{2H}{\sin A} + m \right) \cdot D$$

b. Aire du matériau

$$\text{Aire du matériau} = \text{aire sillon diamétral} \times N \times \frac{\pi}{4}$$

$$\text{Aire du matériau} = \left(\frac{2H}{\sin A} + m \right) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$

2. Volume du matériau

a. Section du sillon diamétral

Section du sillon diamétral = aire $(AA'C'C)$

Aire $(AA'C'C)$ = aire $(BB'C'C)$ + aire (ABC) + aire $(B'A'C')$ = aire $(BB'C'C)$ + 2.aire (ABC)

- Aire $BB'C'C = BB' \times BC = m \cdot H$

- Aire $ABC = \frac{AB \times BC}{2} = \frac{AB \times H}{2}$

- $AB = \frac{BC}{\tan A} = \frac{H}{\tan A}$

$$\text{Aire } ABC = \frac{\frac{H}{\tan A} \times H}{2} = \frac{H^2}{2 \tan A}$$

$$\text{Aire } AA'C'C = m.H + 2 \cdot \frac{\left(\frac{H^2}{\tan A}\right)}{2} = mH + \frac{H^2}{\tan A}$$

b. Volume du sillon diamétral

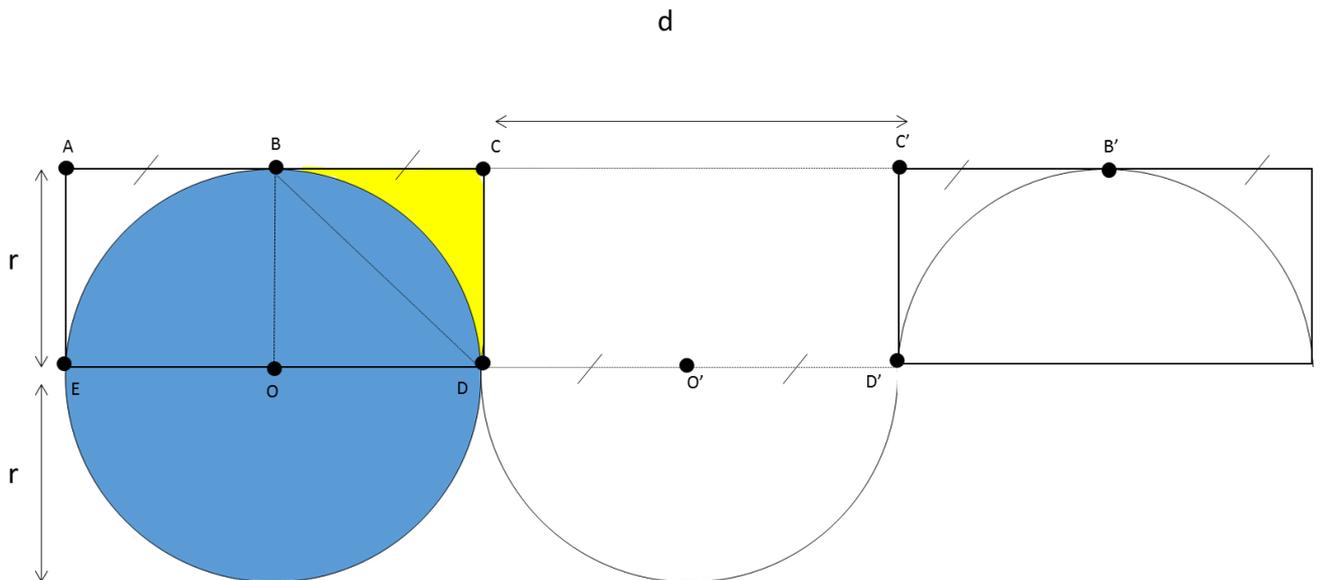
Volume sillon diamétral = (section du sillon diamétral).D

$$\text{Volume sillon diamétral} = \left(mH + \frac{H^2}{\tan A}\right) \cdot D$$

c. Volume du matériau

Volume du matériau = (volume du sillon diamétral).N. $\frac{\pi}{4}$

$$\text{Volume du matériau} = \left(mH + \frac{H^2}{\tan A}\right) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$



3. Calcul de l'aire du matériau

a. Aire du sillon diamétral

Aire du sillon diamétral = aire de 2 demi-cylindres

$$\text{Aire du sillon diamétral} = 2 \cdot \frac{2\pi \cdot r \cdot D}{2} = 2\pi \cdot r \cdot D$$

b. Aire du matériau

$$\text{Aire du matériau} = \text{aire sillon diamétral} \times N \times \frac{\pi}{4}$$

$$\text{Aire du matériau} = 2\pi \cdot r \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4} = \frac{\pi^2 \cdot r \cdot D \cdot N}{2}$$

4. Volume du matériau

a. Section du sillon diamétral

Section du sillon diamétral = aire du demi-disque DD' + aire CC'D'D + 2.aire **BCD**

- Aire du demi – disque DD' = $\frac{\pi \cdot r^2}{2}$

- Aire CC'D'D = CC' × CD = r · d = r × 2r = 2r²

- Aire **BCD** = aire BCDO – $\frac{\text{aire cercle } O}{4} = (BC \times CD) - \frac{\pi \cdot r^2}{4} = r^2 - \frac{\pi \cdot r^2}{4}$

$$\begin{aligned} \text{Section du sillon diamétral} &= \frac{\pi \cdot r^2}{2} + 2r^2 + 2 \cdot \frac{(4 - \pi)r^2}{4} = \frac{\pi \cdot r^2}{2} + \frac{4r^2}{2} + \frac{(4 - \pi)r^2}{2} \\ &= \frac{\pi \cdot r^2 + 4r^2 + 4r^2 - \pi r^2}{2} = \frac{8r^2}{2} = 4r^2 \end{aligned}$$

b. Volume du sillon diamétral

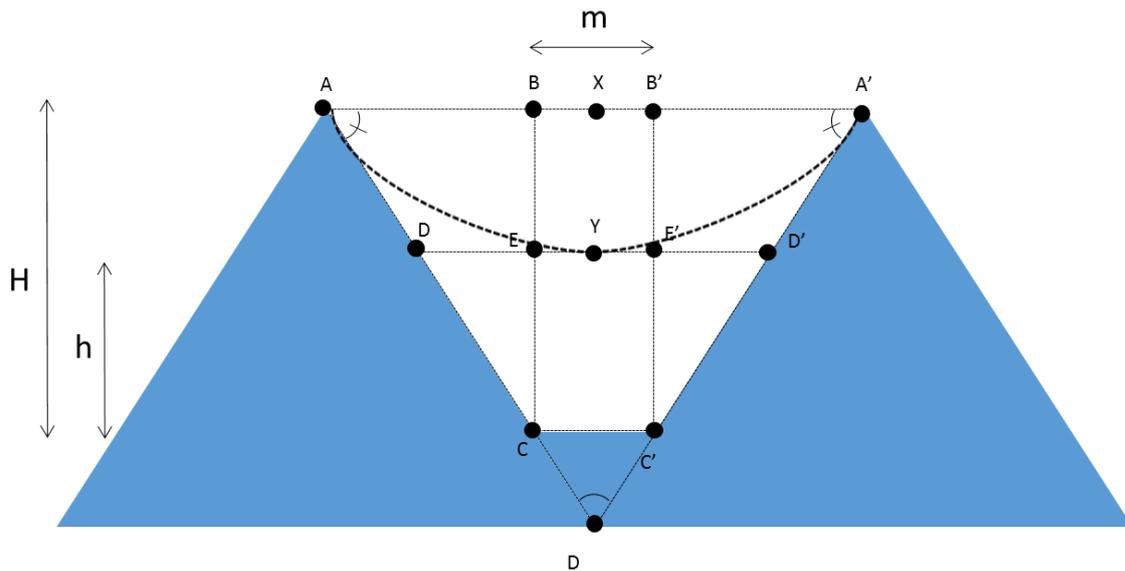
$$\text{Volume du sillon diamétral} = \text{section du sillon diamétral} \times D = 4r^2 \cdot D$$

c. Volume du matériau

$$\text{Volume du matériau} = (\text{volume du sillon diamétral}) \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$

$$\text{Volume du matériau} = 4r^2 \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$

II. Matrice extracellulaire



1. Calcul du volume de matrice extracellulaire déposée

a. Section du sillon diamétral rempli de MEC (MECd)

Section MECd = aire AYA'C'C

Aire AYA'C'C = aire de la section du sillon – aire demi-ellipse AYA'

- Aire demi – ellipse AYA' = $\frac{\pi.(AX).(XY)}{2} = \frac{\pi.(AB+BX).(H-h)}{2} = \frac{\pi.(AB+\frac{m}{2}).(H-h)}{2}$

- $AB = \frac{BC}{\tan A} = \frac{H}{\tan A}$

$$\text{Aire demi – ellipse AYA}' = \frac{\pi. \left(\frac{H}{\tan A} + \frac{m}{2} \right). (H - h)}{2}$$

$$\text{Section MECd} = \left(mH + \frac{H^2}{\tan A} \right) - \frac{\pi. \left(\frac{H}{\tan A} + \frac{m}{2} \right). (H - h)}{2}$$

b. Volume de MEC dans le sillon diamétral

Volume de MEC dans le sillon diamétral = section MECd × D

$$= \left(mH + \frac{H^2}{\tan A} \right) - \frac{\pi. \left(\frac{H}{\tan A} + \frac{m}{2} \right). (H - h)}{2} . D$$

c. Volume de MEC sur le matériau

$$\text{Volume MEC} = (\text{volume de MECd}). N. \frac{\pi}{4}$$

$$\text{Section MECd} = 4r^2 - \frac{\pi \cdot 2r \cdot (H - h)}{2} = 4r^2 - \pi \cdot r(H - h)$$

b. Volume de MEC dans le sillon diamétral

$$\text{Volume MECd} = \text{section ECd} \times D = (4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h)) \cdot D$$

c. Volume de MEC sur le matériau

$$\text{Volume MEC} = (\text{volume MECd}) \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$

$$\text{Volume MEC} = (4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h)) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}$$

5. Normalisation du volume de MEC par la surface de matériau

$$\frac{\text{Volume de MEC}}{\text{Aire du matériau}} = \frac{(4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h)) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}}{\left(rH + \frac{H^2}{\tan A}\right) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}} = \frac{(4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h))}{\left(rH + \frac{H^2}{\tan A}\right)}$$

6. Normalisation du volume de MEC par le volume de matériau

$$\begin{aligned} \frac{\text{Volume de MEC}}{\text{Volume du matériau}} &= \frac{(4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h)) \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}}{4r^2 \cdot D \cdot N \cdot \frac{\pi}{4}} = \frac{4r^2 - \pi \cdot r \cdot (H - h)}{4r^2} \\ &= \frac{4r^2}{4r^2} - \frac{\pi \cdot r \cdot (H - h)}{4r^2} = 1 - \frac{\pi \cdot (H - h)}{4r} \end{aligned}$$

RESUME

In vivo, les cellules osseuses évoluent dans un microenvironnement complexe, tridimensionnel et interagissent avec celui-ci à de nombreuses échelles, depuis le nanomètre (tropocollagène) jusqu'à des structures de plusieurs centaines de micromètres (trabécules). Paradoxalement, la majeure partie de nos connaissances sur la physiologie cellulaire est issue d'expériences réalisées sur des cellules cultivées sur du plastique et en deux dimensions. Ces différences ne peuvent qu'avoir une influence sur le comportement des cellules, qui n'entretiennent plus les mêmes relations spatiales entre elles, ainsi qu'avec leur environnement. De plus, si ces dernières années, nombre d'études ont été réalisées sur l'influence de la topographie à des échelles nano et micrométriques, peu d'études ont montré le rôle de la géométrie du substrat à une échelle tissulaire, soit au sein de structures supérieures à 100 µm.

Afin d'étudier l'influence de la macroarchitecture du substrat sur le comportement cellulaire, des céramiques en hydroxyapatite à architecture contrôlée ont étéensemencées avec des cellules primaires de calvaria de souris. Une première étude a été entreprise sur des substrats macroarchitecturés, présentant des sillons de différentes géométries : sillons semi-circulaires (Wave), sillons triangulaires à angle de 90° ou à angle de 45°. Plus la géométrie du substrat était refermée (45°>90°>Wave), plus la différenciation ostéoblastique était rapide. Cela s'est traduit par une augmentation des niveaux d'expression génique et protéique d'ostéocalcine et de sclérostine, indiquant la présence d'ostéocytes au sein de l'important tissu déposé par les cellules. De plus, au sein de la géométrie à l'angle le plus fermé (i.e. « 45° »), des structures fibreuses minéralisées, orientées parallèlement au fond du substrat ont été observées. Cette orientation s'est confirmée au niveau cellulaire, avec une orientation similaire des fibres de stress et un étirement des noyaux cellulaires. La géométrie du substrat influence donc le comportement des cellules en modifiant très probablement leur signalisation intracellulaire.

Ces investigations ont été poursuivies par le développement d'un modèle d'ostéogénèse 3D sous perfusion au sein du bioréacteur BOSE *ElectroForce*® 5270 *BioDynamic*® de la plateforme Equipex IVTV, afin d'explorer les interactions cellulaires-substrat en réponse à des contraintes mécaniques (forces de cisaillement). Le dépôt tissulaire était particulièrement abondant au sein des pores triangulaires à angle de 45°, confirmant les données obtenues sur les substrats macroarchitecturés et laissant penser que ce type de pores est le plus à même de permettre une différenciation ostéoblastique optimale.

Les résultats de ces travaux pourront permettre des avancées dans la compréhension de la biologie de l'os, mais également dans la conception d'implants innovants destinés à la réparation de défauts osseux, avec une ostéointégration stimulée via la présence de structures à géométrie fermée, tel que des sillons triangulaires à angles de 45°.

Mots-clés : macrotopographie, différenciation ostéoblastique, matrice extracellulaire, hydroxyapatite.

ABSTRACT

In vivo, cells reside in a complex and three-dimensional microenvironment, with which they interact at multiple scales, from the nanometer (tropocollagen) to structures of several hundred of micrometers (trabeculae). However, most of our knowledge on cell physiology has been obtained from cells grown in Petri dishes, on plastic and in two dimensions. In those conditions, the spatial relationships between cells and their environment can only be deeply modified. Moreover, if the impact of substrate closure at a cellular level is particularly well documented, very few studies have shown its role at a tissue level (i.e. greater than 100 μm), and thus focused mostly on the matrix deposition rather than on the osteoblastic differentiation.

In order to study the effects of substrate macroarchitecture on cells, primary mouse calvarial cells were seeded on hydroxyapatite-based bioceramics, made from wax molds by 3D printing. A first study was conducted on macroarchitected substrates. These bioceramics have three patterns of different degrees of closure: semi-circular grooves (Wave), triangular grooves with 90° angle and triangular grooves with 45° angle. The tighter was the substrate geometry (45° > 90° > Wave), the faster was osteoblastic differentiation. This resulted in increased levels of gene and protein expression of osteocalcin and sclerostin, indicating the presence of osteocytes inside the tissue layed by cells. Moreover, in the tightest geometry (i.e. 45°), mineralized fibrous structures, oriented parallel to the bottom substrate were observed. This orientation was confirmed at the cellular level, with a similar orientation of stress fibers and a stretch of cell nuclei. Thus, the substrate macroarchitecture influences the cellular behavior by, most likely, modifying the intracellular signaling.

These investigations were pursued with the development of a 3D model of osteogenesis under perfusion, in the BOSE 5270 ElectroForce® BioDynamic® bioreactor of the IVTV Equipex platform, to explore cell-substrate interactions in response to mechanical stress (shear forces). Tissue deposition was particularly abundant in the triangular pores with 45° angles, confirming our previous observations and suggesting that this geometry was able to promote osteoblast differentiation.

Our results could lead to breakthroughs in the understanding of the bone biology but also in the design of innovative implants for the repair of bone defects, with a stimulated osseointegration throught the presence of structures with closed geometries, such as triangular grooves with 45° angles.

Key-words: macroarchitecture, osteoblast differentiation, extracellular matrix, hydroxyapatite.