



# THESE DE DOCTORAT

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE

Présentée par

**Guénaëlle Bouët**

à

**L'UNIVERSITE JEAN MONNET SAINT-ETIENNE**

pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

---

***Impact de l'extinction génique de la sialoprotéine osseuse (BSP) sur la différenciation des ostéoblastes et l'ostéogénèse in vitro - Développement et validation d'un bioréacteur pour la culture ostéoblastique en trois dimensions***

---

*Soutenue le 23 septembre 2013*

Composition du Jury

Rapporteur : Dr. Joëlle Amédée

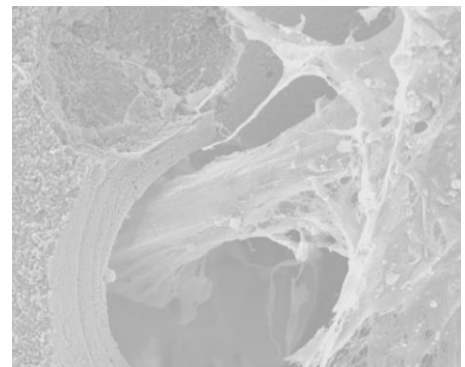
Rapporteur : Dr. Delphine Logeart

Examineur : Dr. Laurence Vico

Examineur : Dr. Mallein-Gerin

Directeur de thèse : Dr. Luc Malaval

Co-encadrant de thèse : Dr. David Marchat



## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à **Joëlle Amédée**, **Delphine Logeart** et **Frederic Mallein-Gerin**, qui ont accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie bien évidemment **Laurence Vico** de m'avoir permis de faire ma thèse au LBTO, c'est avec vous que tout à commencé.

La mauvaise graine que je suis a eu besoin de multiples ingrédients pour en arriver jusque là et devenir Docteur.

Tout d'abord, j'ai bénéficié de la sagesse et l'expérience de deux chefs très singuliers ! Je tiens donc à remercier **Luc** pour sa grande disponibilité et sa patience. Merci pour ton soutien et ta compréhension dans les moments les plus difficiles, qu'ils aient été professionnels ou personnels. Au nom de tous les « étudiants », je ne peux pas omettre de parler de ton immense culture qui nous laisse parfois, voire souvent, sur le carreau ! J'exprime ensuite toute ma reconnaissance à **David**, que je qualifierais de « chef-fou » ! J'ai toujours été impressionné par ton côté un peu « schiso », tantôt acharné de travail ultra-exigeant et perfectionniste qui m'a amené à me surpasser, tantôt complètement délirant et pas sérieux, à chanter « le petit bonhomme en mousse » ou pire encore... ça permet de détendre l'atmosphère ! De plus, j'ai apprécié ton franc parlé (certe, des fois ça pique !) qui a le mérite d'éviter toute ambiguïté. Ça tombe plutôt bien que je vous aime bien tous les deux parce que nous allons encore devoir nous supporter un petit moment.

J'ai une pensée pour **Florent Elefteriou**, c'est dans son labo et grâce à sa confiance qu'a grandi mon obstination à vouloir faire de la recherche malgré toutes les mises en garde d'autres collègues. Ses conseils m'ont mené vers l'équipe de **Pierre Jurdic** qui m'a lui-même mené vers le LBTO, merci.

Une thèse, d'autant plus quand celle-ci est pluridisciplinaire, implique d'interagir avec un certain nombre de spécialistes.

Je remercie ainsi tous mes collègues du LBTO pour l'aide qu'ils m'ont apporté à un moment ou l'autre de ma thèse ; **Marie-Thérèse** et **Mireille** pour la bio mol, la bioch et la bio cell, **Alain** pour son entrain, ses conversations interminables mais si drôles et intéressantes, son aide jusqu'au dernier moment (petit réglage du rétroprojecteur le jour de la soutenance !) et sa maîtrise du vidéomé, **Norbert** pour tous ses petits coups de main notamment en histo et au scanco, **Arnaud** et **Ghislaine** pour leur aide précieuse à l'animalerie, **Chantal** pour son aide administrative, **Virginie** pour le passage de flambeau avec notre ami le ZETO. Et bien sur **Marie-Hélène**, **Hubert**, **Aline**, **Sylvie**, **Bernard**, **Guillaume** et **Damien** (bon courage à ces deux tout nouveaux thésards !).

Un grand merci également à mes collègues de l'École des Mines, **Coralie** qui a confectionner tant de scaffolds, **Nicolas** qui a fabriqué les chambres de culture, **Laurent** et **Jérôme** qui ont tenté de comprendre et résonner le ZetOs, **Stéphane Avril** qui a été mon premier co-directeur et qui m'a permis de finir mes manips de thèse, **Françoise** pour son aide administrative et enfin **Antoine**, **Baptiste** et **Nathalie** qui ont été présents pour répondre à mes différentes questions.

Une pensée pour tous les étudiants qui sont passés au laboratoire et avec qui j'ai passé de bons moments, **Robin**, **Pierre**, **Mostafa**, **Malika**...

Merci à mes collègues de la « BSP team », **Wafa** et **Renata**, nos échanges ont été bien au-delà du laboratoire.

Une mention spéciale pour mes colocys de bureau ! Tout d'abord avec la sanguine **Carole**, je pense qu'on s'est très vite comprises (ce qui pourrait se résumer à « je t'aimerais bien si tu ne me gonfle pas ») et adoptées ! Tes pétages de câbles, nos discussions et tes éclats de rires me manquent. Vivement nos prochaines retrouvailles (aussi bruyantes qu'à Lisbonne tu crois ?!). Imaginez le changement avec sa remplaçante, **Fiona**, qui a un caractère totalement opposé mais avec qui de nouveaux liens se sont tissés. Nous avons rapidement étendu notre relation extra-labo au travers de diverses activités.

Je remercie mes collègues qui ont quitté le labo au cours de l'aventure mais qui sont aujourd'hui des amis, **Emilien**, **Cédric**, **Anthony** et **Myriam**.

Merci également à mes collègues et amis de la faculté de médecine (GIMAP, BIIGC).

J'ai une pensée pour mes stagiaires, notamment **Aline** et **Antoine** avec qui j'ai passé de bons moments. Un grand merci à **Magali** pour son travail sur les modélisations et sa patience pour répondre à mes questions sur la mécanique !

J'ai une grosse pensée pour tous les gens qui m'entourent en dehors du laboratoire et qui participent ainsi à mon équilibre.

Je pense tout d'abord à mes amis proches, notamment **Yann**, rencontré à la fac de médecine lors d'une formation PCR. Nos grains de folie se sont bien accordés et de là est née une amitié fraternelle. Réel soutien au labo et dans la vie, je ne te remercierai jamais assez.

Je pense également à ma p'tite **Clo** (et **Gregounet**), rencontré à la fac de Dijon cette fois-ci. Elle restera toujours ma super binôme, en TP et dans la vie !

Je remercie également ma quenelle lyonnaise alias **Magali** (DUOPiens forever), **Janus**, **Corentin**, **Sandrine** et **Antonin**, toujours présents pour le meilleur et pour le pire.

Merci à mon **Doudou**, tu m'as rencontré à une période critique de ma thèse mais cela ne t'a pas effrayé ! Tu m'as accueilli dans ton havre de paix, loin du labo, et tu as rendu cette dernière année de thèse bien plus agréable qu'elle n'aurait dû/pu l'être.

Enfin, je pense à mes racines familiales, soutien inconditionnel depuis toujours. Je pense tout d'abord à **mes cousins**, source de rigolades et de bons souvenirs assurés. Ensuite mes pensées vont à **mes grands-parents** et à **mes oncles & tantes**. Notamment je remercie **Annie** et **Véro** pour leur présence quelque soit la distance.

Je terminerais avec mon noyau dur, en remerciant **mes sœurs** (et beau-frères), soutien incontournable et ingrédient indispensable à la vie d'un docteur. Une pensée pour le petit dernier venu de la famille, mon neveu **Noé**. 2013 aura été riche en promotion : Docteur et Tata ! J'espère que je serai à la hauteur dans ce nouveau rôle.

Enfin, merci à **mes parents** grâce à qui je peux écrire ces mots : merci pour tout.

*A Dino...*

## Sommaire

<b>Remerciements.....</b>	<b>2</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>12</b>
<b>1er Chapitre Revue bibliographique .....</b>	<b>13</b>
A.    Qu'est-ce que le tissu osseux ? .....	14
A.1.    Fonctions du squelette .....	14
A.2.    Structure du tissu osseux.....	15
A.2.1.    L'os cortical .....	16
A.2.2.    L'os trabéculaire .....	16
A.3.    Cellules présentes dans le tissu osseux .....	17
A.3.1.    La lignée ostéoclastique.....	18
A.3.2.    Lignée ostéoblastique .....	20
A.3.2.1.    Les membres de la lignée ostéoblastique .....	20
A.3.2.2.    La différenciation ostéoblastique et sa régulation .....	22
A.4.    La matrice extracellulaire .....	26
A.4.1.    Composition.....	27
A.4.2.    Formation de la MEC .....	28
A.4.3.    Remodelage .....	30
B.    Les SIBLING : une famille de régulateur de la formation osseuse et de la réponse à la contrainte mécanique .....	32
B.1.    SIBLING et biologie osseuse.....	37
B.2.    SIBLING et minéralisation .....	40
B.2.1.    MEPE et DMP1 : deux produits des ostéocytes aux rôles antagonistes .....	40
MEPE .....	40
DMP1.....	41
B.2.2.    L'OPN, puissant inhibiteur de la minéralisation.....	42
B.2.3.    Le peptide ASARM dans la physiologie et la pathologie osseuse .....	43
B.2.4.    La BSP, nucléateur de la minéralisation.....	45
B.3.    SIBLING et contraintes mécaniques .....	46
B.4.    BSP, ostéoblastes et ostéogenèse .....	49
B.4.1.    La BSP dans le modelage et le remodelage osseux .....	49
B.4.2.    BSP et ostéoclastes .....	49
B.4.3.    La BSP dans différenciation ostéoblastique.....	50
C.    Vers l'os <i>in vitro</i> .....	53
C.1.    Context .....	54
C.1.1.    Tissue Engineering: concepts.....	54
C.1.2.    Organ repair versus <i>in vitro</i> model: a comparison .....	54
C.1.3.    The missing link: from cell culture to tissue culture .....	55
C.2.    Bioreactors .....	57
C.2.1.    Definition .....	57
C.2.2.    Why perfuse bioreactors? .....	59
C.2.2.1.    Controlling the chemical environment .....	59
C.2.2.2.    Controlling mechanical stimulation .....	60
C.3.    Scaffold .....	64

C.3.1.	Objective of using scaffolds .....	64
C.3.2.	Ideal scaffold properties .....	64
C.3.3.	Architecture : a key role .....	65
C.3.4.	Scaffold composition .....	67
C.3.5.	Future challenges.....	68
C.4.	Cell culture.....	68
C.4.1.	Cell seeding.....	68
C.4.2.	Culture conditions .....	69
C.4.3.	Cell types and sources .....	69
C.4.4.	Complex 3D models : multiple cell types.....	71
C.5.	Flow and mechanical modelisation: a tool for prediction .....	73
C.6.	Major limiting factors: perspectives in 3D imaging .....	74
C.7.	CONCLUSIONS .....	75
C.8.	References.....	76
<b>2e Chapitre</b>	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>90</b>
<b>3e Chapitre</b>	<b>Travaux expérimentaux .....</b>	<b>92</b>
A.	Ostéogenèse <i>in vitro</i> en culture de cellules primaires de calvaria de souris - Effets de l'extinction génique de la sialoprotéine osseuse (BSP) .....	93
A.1.	Article 1 .....	93
A.2.	Résultats complémentaires .....	114
L'addition de BSP exogène ne restore pas le phénotype des cultures BSP-/- .....	114	
A.3.	Conclusion et perspectives .....	114
B.	Développement et validation d'un modèle de culture en trois dimensions (3D) pour l'ostéogenèse <i>in vitro</i> .....	116
B.1.	Article 2.....	117
B.2.	Discussion et perspectives à court terme.....	148
C.	Ostéogenèse en 3D sous contrainte mécanique – Données préliminaires .....	150
C.1.	Ostéogenèse par les cellules KO BSP cultivées en 3D .....	150
C.1.1.	Contexte .....	150
C.1.2.	Résultats et discussion.....	150
C.2.	Effet des contraintes mécaniques sur des cellules de calvaria cultivées en 3D .....	151
C.2.1.	Contexte .....	151
C.2.2.	Matériel et méthode.....	154
C.2.2.1.	Dispositif de compression mécanique : le Zetos™ .....	154
C.2.2.2.	Signal mécanique appliqué .....	154
C.2.3.	Résultats et discussion.....	156
C.2.4.	Conclusion .....	158
<b>4e Chapitre</b>	<b>Conclusions et perspectives générales .....</b>	<b>159</b>
<b>Références.....</b>	<b>.....</b>	<b>165</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>.....</b>	<b>185</b>
Annexe 1 :	Publications et Communications .....	185
Annexe 2 :	Curriculum vitae.....	187

## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

ADHR : Autosomal-Dominant Hypophosphatemic Rickets  
AKT : protéine kinase B  
AMPc : Adenosine MonoPhosphate cyclique  
ANK : Ankylosis protein  
AP-1 : Activating Protein 1  
APC : Adenomatous Polyposis Coli  
ARHR : Automosomal-Recessive Hypophosphatemic Rickets  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
ASARM : Acidic Serine-Aspartate Rich MEPE associated

### B

BAHF : Basse Amplitude Haute Fréquence  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
BMU : Bone Multicellular Unit  
BSU : Bone Structural Unit  
BSP : Bone SialoProtein

### C

Ca : calcium  
CD44 : Cluster of Differentiation 44  
CFU-F : Colony Forming Unit - Fibroblasts  
CK1 : Caseine Kinase 1  
CollI : Collagène de type I  
Ctsk : cathepsine D

### D

DMP1: Dentin Matrix Protein  
DMP1-PG : DMP1 - ProteoGlycan fragment  
Dsh (ou Dvl) : dishevelled  
DSPP : Dentin SialoPhosphoProtein

### E

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

### F

FAK : Focal Adhesion Kinase  
FGF : Fibroblast Growth Factor

### G

GAG : GlycosAminoGlycane  
GSK3 : Glucogen Synthase Kinase 3

### H

HA : HydroxyAPatite  
HYP : Primary defects in X-linked hypophosphatemic rickets  
HSC : hematopoietic stem cell

### I

IGF : Insulin-like Growth Factor

### K

KO : Knock-Out

### L

LPR5: Lipoprotein Receptor Related Protein

### M

MAR : Mineral Apposition Rate  
MCC : Mouse Calvaria Cells  
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor  
MEC : Matrice Extra-Cellulaire  
MEPE: Matrix Extracellular phosphoglucoprotein  
MMP : Métalloprotéinase Matricielle  
MSC : Mesenchymal Stem Cell  
Msx2 : msh homeobox homolog-2

### N

NPP1 : Phytophthora protein 1  
NPT2a : type II sodium-dependent phosphate co-transporters



**O**

Ob : ostéoblastes

Oc : Ostéoclastes

OCN (ou OC) : OstéoCalciNe

OPG : OstéoProtégérine

OPN (ou OP) : OstéoPontiNe

Osx : Ostérix

**P**

P : Phosphate

PAL : Phosphatase Alcaline

PHEX :Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on X-chromosome

PNC : Protéine Non Collagénique

PPi : pyrophosphate inorganique

Pro-rich : domaine riche en Proline

PTH : Parathormone

PTH-rP : PTH – receptor

**R**

RANKL : Receptor Activating NF Kappa B Ligand

RGD : Arginine-glycine-Aspartique

Runx2 : Runt-related transcription factor-2

**S**

SCPP : Secretory Calcium binding

PhosphoProteins

SIBLING : Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins

SiRNA : Small Interfering RiboNucleic Acid

SPARC : Secreted Protein Acidic Rich Cysteine

SPP1 : SialoPhosphoProtein (=OPN)

**T**

TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor

TGF : Transforming Growth Factor

**V**

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

**W**

Wnt : Wint

**X**

XLH : X-Linked Hypophosphatemia

2D : Deux dimensions

3D : Tri-dimensionnel

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure macroscopique de l'os .....	15
Figure 2. Schéma de l'os cortical et spongieux, Système de Havers .....	17
Figure 3. Différents types de cellules osseuses : caractéristiques et fonctions.....	18
Figure 4. Différenciation des ostéoclastes et mécanisme de la résorption osseuse. ....	19
Figure 5. Mécanisme de résorption par les ostéoclastes. ....	20
Figure 6. Croissance et différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique.....	23
Figure 7. Voie de signalisation canonique des facteurs Wnt .....	25
Figure 8. Remodelage du tissu osseux .....	31
Figure 9. Facteurs influant sur le remodelage osseux .....	31
Figure 10. Représentation schématique de la localisation des gènes des SIBLING dans le "Bone Gene cluster" humain et de la structure de leurs transcrits. ....	33
Figure 11. Structure schématique de la BSP .....	34
Figure 12. La BSP, une protéine multifonctionnelle. ....	35
Figure 13. Structure de l'ostéopontine secondaire de l'ostéopontine .....	35
Figure 14. L'OPN, une protéine multifonctions. ....	36
Figure 15. Schéma décrivant l'expression et la fonction des différentes SIBLING dans l'os. ...	39
Figure 16. Schéma du modèle ASARM.....	44
Figure 17. Régulation d'ASARM et du phosphate via le FGF23 et le calcitriol.....	45
Figure 18. Schéma représentant le rôle de la sclérostine dans la régulation de la minéralisation osseuse.....	48
Figure 19. Analyse <i>in vitro</i> de la différenciation et de l'activité des ostéoblastes en cultures de cellules BSP+/+ et BSP-/-.....	51
Figure 20. Morphologie générale des nouveau-nés BSP+/+ et BSP-/-.....	51
Figure 21 : Cellules de calvaria BSP+/+ et BSP-/- cultivées 7 jours en 3D dans le bioréacteur perfusé.....	150

Figure 22 : Niveau d'expression génique de cellules BSP+/+ et -/- cultivées pendant 2 semaines en 3D sous perfusion. Chaque valeur correspond à 1 biocéramique analysée.....	151
Figure 23. Schéma de l'appareil du ZetOs™.....	155
Figure 24 : Signal mécanique utilisé.....	155
Figure 25 : Effet des contraintes mécanique (régime combiné pendant 15min) sur l'expression génique de cellules de calvaria, 20 min, 1h, 14h ou 2 jours après 15 min de stimulation mécanique à 5 jours de culture en 3D sous perfusion. ....	157
Figure 26. Système Bose ElectroForce 5270. ....	163
Figure 27. Perfusion des biocéramiques de forme cylindrique au sein du dispositif ElectroForce de Bose.....	164

## INTRODUCTION GENERALE

*In vivo*, les cellules résident dans un microenvironnement tri-dimensionnel (3D) complexe, composé de plusieurs types cellulaires produisant une matrice extracellulaire et des molécules de signalisation. Ce microenvironnement est soumis, dans la plupart des tissus dont l'os, à des contraintes mécaniques qui déterminent des aspects importants de la physiologie osseuse. Paradoxalement, la majeure partie de nos connaissances de la physiologie des cellules *in vitro* a été obtenue à partir de cellules cultivées en deux dimensions (2D) sur des substrats en matière « plastique ». Les modèles animaux, quant à eux, sont fidèles biologiquement (au moins pour une espèce donnée) mais n'offrent qu'un contrôle limité de l'environnement local et un aperçu limité de l'information biologique en temps réel. Ainsi, l'ajout d'une nouvelle dimension *in vitro* est indispensable afin de se rapprocher de l'environnement *in vivo* des cellules. Ces modèles de culture en 3D, de moindre complexité, doivent permettre de mieux comprendre les différents aspects du fonctionnement cellulaire et du remodelage osseux, et en particulier d'étudier le rôle de protéines secrétées par les cellules de l'os, comme la sialoprotéine osseuse (BSP). La BSP appartient à la famille des "small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins" (SIBLING), impliquées dans le développement, le remodelage et la minéralisation de l'os et de la dentine, et qui répondent rapidement à la contrainte mécanique. Nous avons tout d'abord caractérisé les cellules osseuses de souris présentant une extinction génique de la BSP (BSP<sup>-/-</sup>), dans un modèle de culture simple en 2D. Ceci afin d'étudier l'influence de cette protéine, et plus particulièrement de son absence, sur la biologie des cellules osseuses. Ces travaux ont en particulier permis de montrer que l'absence de BSP modifie le comportement des cellules, et ce en lien avec leur densité, témoignant ainsi de la dépendance du phénotype vis à vis de l'environnement cellulaire. Afin de poursuivre ces travaux dans des conditions *in vitro* plus réalistes, nous avons ensuite développé un modèle de culture en 3D, susceptible d'être soumis à des contraintes mécaniques via le système ZetOs<sup>TM</sup> précédemment validé au laboratoire. Avant d'aborder ces travaux expérimentaux, l'organisation du tissu osseux et le rôle des protéines matricielles non collagéniques (les SIBLING), en mettant l'accent sur la BSP, seront développés. L'ingénierie tissulaire osseuse à but expérimental sera également détaillée

Nous présenterons ensuite nos résultats dans 3 parties :

- L'étude de l'absence de BSP sur l'ostéogenèse *in vitro* par des cellules de calvaria murines dans un modèle « traditionnel » (2D)
- Le développement et la validation d'un modèle de culture en 3D pour l'ostéogenèse *in vitro*
- Un début d'analyse de l'effet des contraintes mécaniques sur des cellules de calvaria cultivées en 3D

*1er Chapitre* **Revue bibliographique**

---

## A. Qu'est-ce que le tissu osseux ?

### A.1. Fonctions du squelette

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé de cellules enclavées dans une matrice extracellulaire (MEC) très abondante et minéralisée. C'est cette minéralisation qui confère à la matrice une rigidité permettant au squelette d'assurer sa fonction biomécanique en soutenant le corps et en protégeant les organes. Mais cette fonction purement mécanique n'est pas sa seule charge ; l'os possède également une fonction métabolique car il est le principal réservoir de l'organisme en calcium (99 %), phosphore (75 %), sodium (90 %) et magnésium (50 %) dont il régule l'homéostasie (Glimcher 1987). La cavité médullaire de la plupart des os longs et des os plats est le siège de l'hématopoïèse, qui assure la formation des cellules sanguines. Un autre rôle majeur du tissu osseux, récemment mis en évidence, est celui qu'il joue dans l'homéostasie énergétique. En effet, le tissu osseux qui ne dépense en lui-même que très peu d'énergie (Wang *et al.* 2010) semblerait réguler le métabolisme énergétique et en particulier la production d'insuline (Lee *et al.* 2007). Le tissu osseux assure la croissance du corps et des organes. Il a l'incroyable capacité de consolider spontanément après fracture, avec une restitution totale de sa structure, ce qui n'est le cas pour aucun tissu conjonctif mou. Le tissu osseux est bien sûr caractérisé par d'excellentes propriétés mécaniques, alliant une bonne rigidité (Module d'Young\* = 20 GPa), et des résistances à la rupture et à la fatigue importantes (Résistance à la rupture = 100-200 MPa, Fatigue >10<sup>7</sup> cycles) (Dufour *et al.* 2007).

Le tissu osseux est un système dynamique, qui est le siège d'un perpétuel **remodelage** : une fois la matrice osseuse mise en place, elle est constamment remaniée pour permettre la réparation des micro-fractures (usure mécanique) et l'adaptation du squelette aux variations des contraintes mécaniques extérieures. Cette fonction, assurée par un couplage étroit entre les **ostéoblastes**, qui sont les cellules formant l'os, et les **ostéoclastes**, les cellules qui le résorbent, est induite et régulée par un grand nombre de facteurs mécaniques et biochimiques.

La multiplicité des rôles joués par le squelette s'explique en partie par la richesse des tissus qui le composent.

---

\* Module d'Young : aussi appelé module d'élasticité, il s'agit de la constante reliant la contrainte de traction ou de compression et la déformation d'un matériau élastique. Par exemple, lorsqu'un matériau à un module d'Young très élevé, il est dit rigide.

## A.2. Structure du tissu osseux

On distingue dans le schéma macroscopique classique des os longs trois segments différents (*Figure 1*. Structure macroscopique de l'os). L'extrémité articulaire, appelée épiphyse est suivie d'un court segment nommé métaphyse qui contient un os spongieux dit « trabéculaire », dont les lacunes sont remplies par la moelle. Chez l'enfant, on trouve entre la métaphyse et l'épiphyse une zone de jonction cartilagineuse qui est le siège de la croissance osseuse en longueur. Cette zone, appelée "cartilage de croissance" ou "physe" disparaît chez l'homme à l'âge adulte. Après la métaphyse, on trouve enfin la diaphyse, qui ne renferme que de la moelle osseuse (*Figure 1*).

Dans le sens transversal, du diamètre au centre de l'os, on trouve tout d'abord le périoste, qui est une zone vascularisée recouvrant toute la surface de l'os à l'exception du cartilage, et qui renferme des cellules souches et des préostéoblastes. Il assure la croissance en épaisseur des os. Sous le périoste, on trouve une zone périphérique compacte d'os « cortical » qui constitue l'enveloppe de l'os. L'interface entre os et moelle constitue l'endoste, qui est recouvert d'une couche cellulaire osseuse très active (*Figure 1 et Figure 2*).

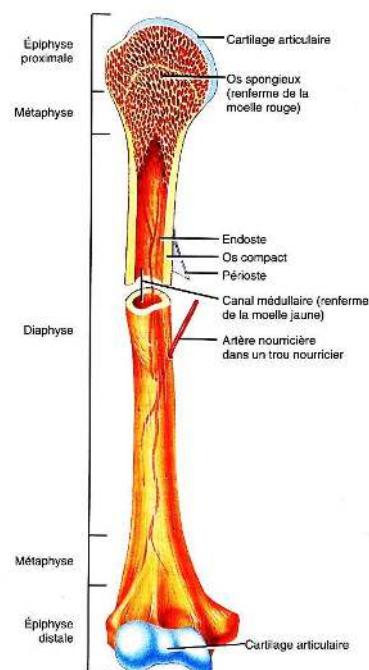


Figure 1. Structure macroscopique de l'os (Tortora 1994)

L'os se présente donc sous deux aspects selon sa porosité et sa microarchitecture.

### A.2.1. L'os cortical

L'os cortical (ou compact) représente 80% de la masse osseuse totale chez l'adulte. Il constitue la diaphyse des os longs, où il délimite un canal central occupé par la moelle, et l'enveloppe des os plats et courts (les os du crâne par exemple). Il apparaît comme une masse solide avec une porosité de 5 à 10%. Il se distingue par une succession de motifs cylindrique de 200 à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre, appelés ostéons, qui sont alignés parallèlement à la diaphyse et présentent en leur centre des vaisseaux sanguins et lymphatiques (*Figure 2*). Les ostéons sont constitués de lamelles concentriques de matrice minéralisée, renfermant des lacunes qui contiennent les ostéocytes (présentés dans la [partie A.3.2.1.](#)). Les canaux centraux des ostéons sont appelés canaux de Havers, et sont reliés entre eux par des canaux transverses, appelés canaux de Volkmann. Ce réseau permet une communication entre les prolongements cellulaires et ainsi la formation d'un maillage cellulaire continu au sein de l'os (*Figure 2*). Métaboliquement, l'os cortical est peu actif puisqu'il représente seulement 20% des surfaces accessibles aux échanges. Cependant, sa forte densité en fait une des réserves principales de calcium de l'organisme.

### A.2.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire (ou spongieux) remplit les épiphyses et les métaphyses des os longs et l'intérieur des os plats et des os courts. Il a une porosité de 50 à 95% et consiste en un assemblage tridimensionnel de travées osseuses, qui sont orientées par le champ de contraintes subies par le sujet. Cette structure lacunaire particulière confère à l'os une certaine élasticité. Cette organisation permet également de maximiser la surface de contact avec la moelle osseuse qui remplit l'espace entre les travées, ce qui fait de l'os trabéculaire une cible privilégiée de nombreuses hormones.

Ces deux types d'os présentent la même constitution à savoir la présence de deux grandes fractions : les cellules et la matrice extracellulaire. Comme nous allons le voir, la fraction cellulaire est composée de plusieurs types de cellules : les ostéocytes, les cellules bordantes, les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, et enfin les ostéoclastes, responsables de la dégradation de la matrice osseuse. Cette matrice osseuse, quant à elle, peut être subdivisée en deux phases : une phase organique et une phase minérale.



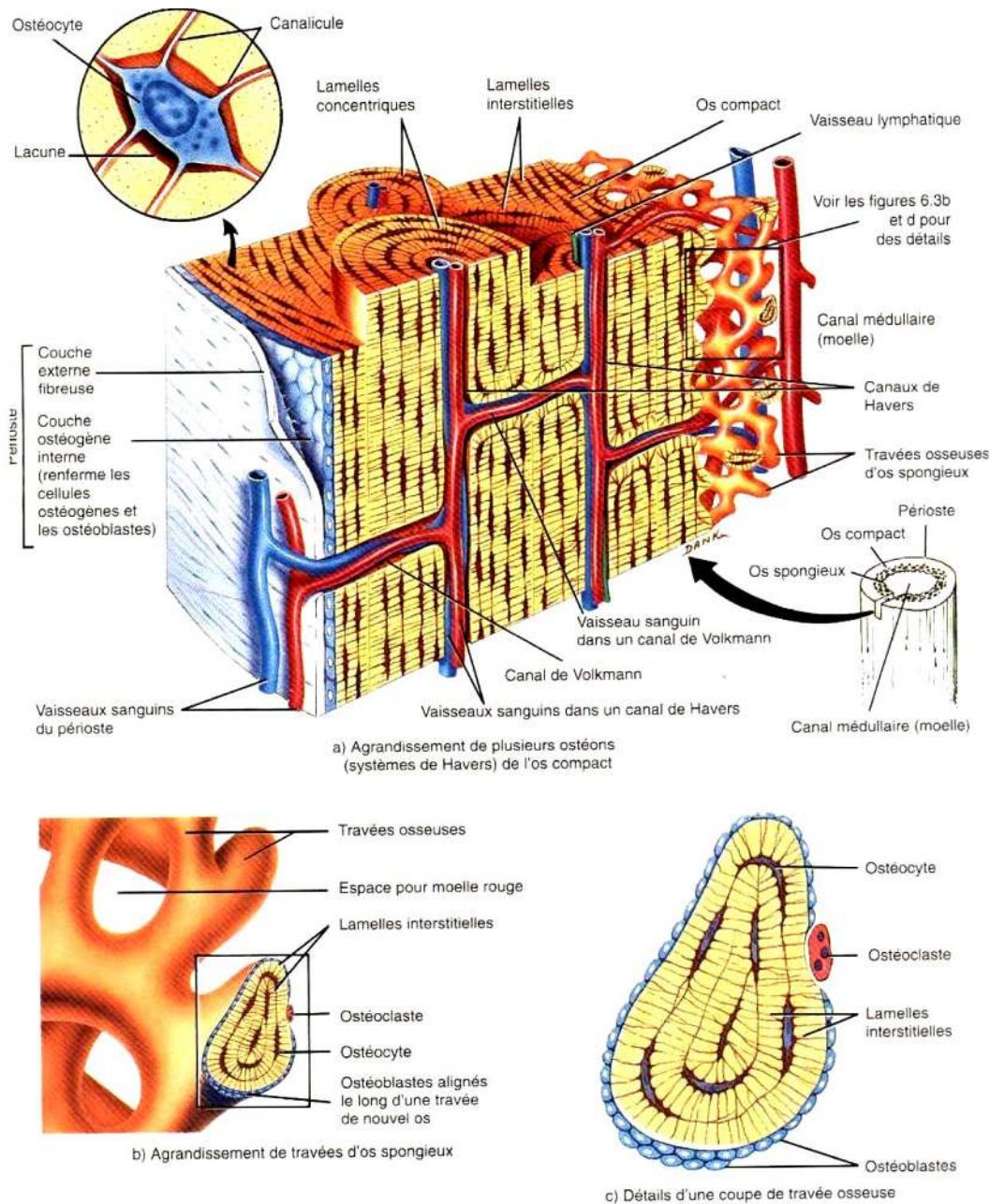


Figure 2. Schéma de l'os cortical et spongieux, Système de Havers (Tortora 1994).

Remarque : Par soucis de clarté, un seul ostéon est représenté par travée.

### A.3. Cellules présentes dans le tissu osseux

Deux types cellulaires participant à la formation et au remodelage osseux cohabitent au sein de l'os: les ostéoclastes et les ostéoblastes, qui proviennent de deux lignées n'ayant aucun précurseur commun chez l'adulte. Les ostéoclastes sont issus des progéniteurs de la lignée hématopoïétique (HSC), qui formeront aussi les cellules sanguines et immunitaires

(érythrocytes, lymphocytes, granulocytes, macrophages, monocytes, mégacaryocytes). Les ostéoblastes sont issus des progéniteurs de la lignée mésenchymateuse (MSC), qui formeront la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondroblastes) et d'autres lignées progénitrices (fibroblastes, cellules réticulaires, adipocytes et cellules endothéliales) (Figure 3).

Type cellulaire	Origine	Morphologie	Fonctions
<b>Ostéoblaste</b>	Cellules souches osseuses	Forme cuboïde, polarisée et situés, avec leurs précurseurs, à la surface de l'os, où ils forment une couche continue de cellules. Riches en organites et récepteurs.	Synthèse et régulation de la matrice osseuse et de sa minéralisation. Régulation de la résorption. Homéostasie minérale.
<b>Ostéocyte</b>	Ostéoblastes	Forme étoilée, peu d'organites.	Régulation de la minéralisation. Homéostasie minérale. Mécano-senseur.
<b>Cellule bordante</b>	Ostéoblastes	Forme aplatie.	Ostéoblaste quiescent. Réserve d'ostéoblastes ?
<b>Ostéoclaste</b>	Cellules souches hématopoïétiques	Cellules géantes polarisées.	Résorption de la matrice osseuse

Figure 3. Différents types de cellules osseuses : caractéristiques et fonctions

### A.3.1. La lignée ostéoclastique

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées d'origine hématopoïétique de la lignée myéloïde (Figure 4). Leur cytoplasme contient beaucoup de vacuoles, vésicules, et lysosomes, emplis d'enzymes capables de détruire la matrice minéralisée. Les monocytes se différencient en précurseurs ostéoclastiques sous l'effet du RANKL (receptor activating NF kappa b ligand) et du M-CSF (macrophage colony stimulating factor) dans la moelle osseuse (Udagawa *et al.* 1990, Lacey *et al.* 1998). Une augmentation de la mobilité de ces cellules permet alors leur migration vers la surface osseuse où les précurseurs ostéoclastiques vont fusionner et former des cellules multinucléées géantes (environ 100µm), les ostéoclastes matures. Une fois en contact avec la matrice osseuse notamment grâce aux intégrines (McHugh *et al.* 2000), les ostéoclastes entament un processus de résorption alternant des phases de repositionnement sur la surface résorbée et des phases de résorption *per se*. Au cours de cette dernière, l'ostéoclaste va créer une zone de scellement résultant en un compartiment isolé de l'extérieur au sein duquel il va sécréter des protons (H<sup>+</sup>) qui vont dissoudre la partie minérale de l'os ainsi que des enzymes lysosomiales (en particulier la cathepsine K) et des métalloprotéases (MMP) qui vont dégrader la trame collagénique et les autres protéines de la matrice extracellulaire (Figure 4 Figure 5) (Teitelbaum 2000, Saltel *et al.* 2008). Les

ostéoclastes creusent ainsi un cylindre de résorption au sein de l'os, puis meurent par apoptose.

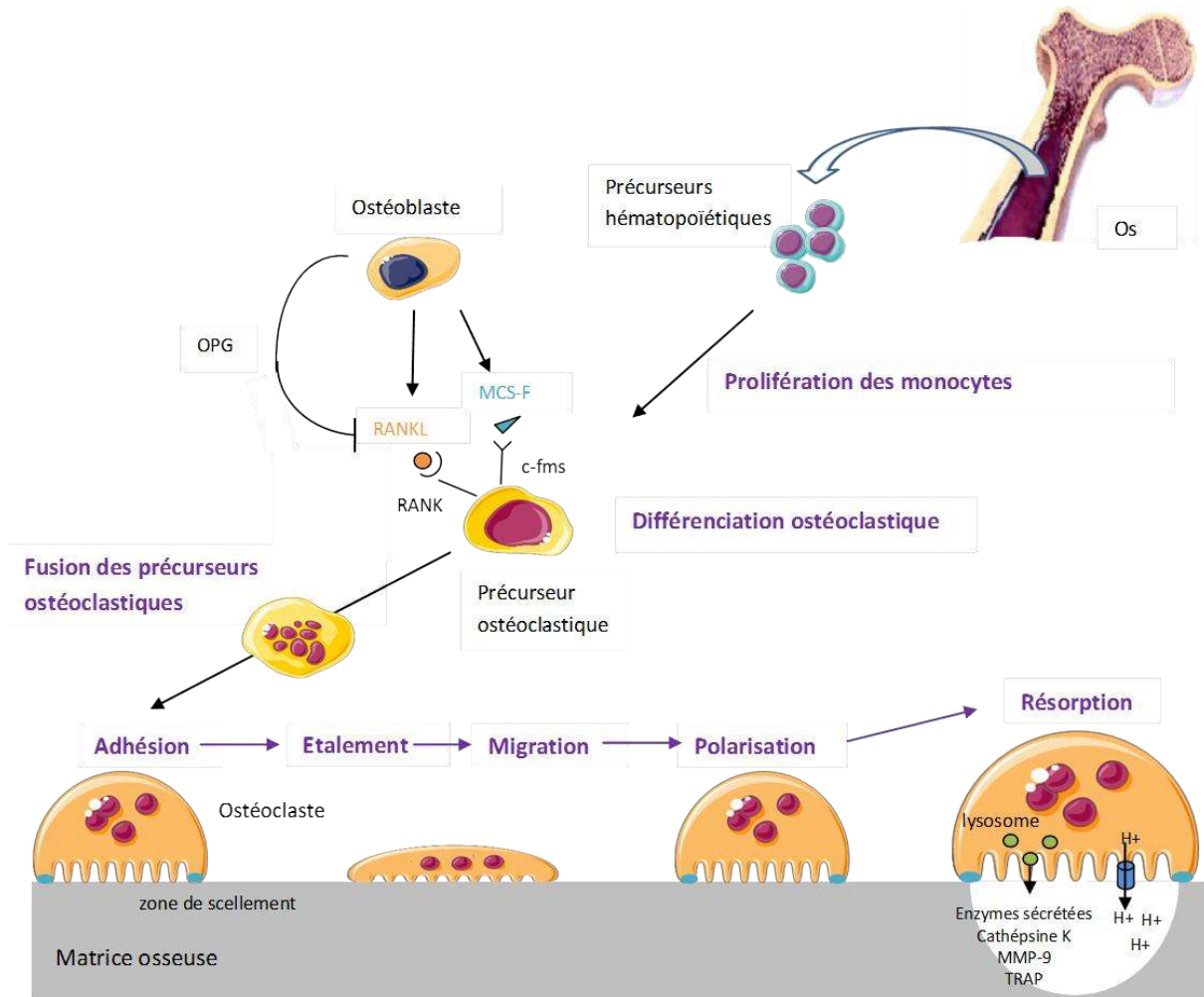


Figure 4. Différenciation des ostéoclastes et mécanisme de la résorption osseuse.

Les ostéoclastes sont d'origine hématopoïétique. Les monocytes se différencient en ostéoclastes multinucléés sous le contrôle de trois facteurs, le M-CSF, le RANKL et l'OPG (Ostéoprotégérine). Une fois qu'il a adhéré à la matrice osseuse, l'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique : il s'étale, migre, se polarise, et résorbe l'os en sécrétant des enzymes et des MMPs puis il recommence ce cycle.

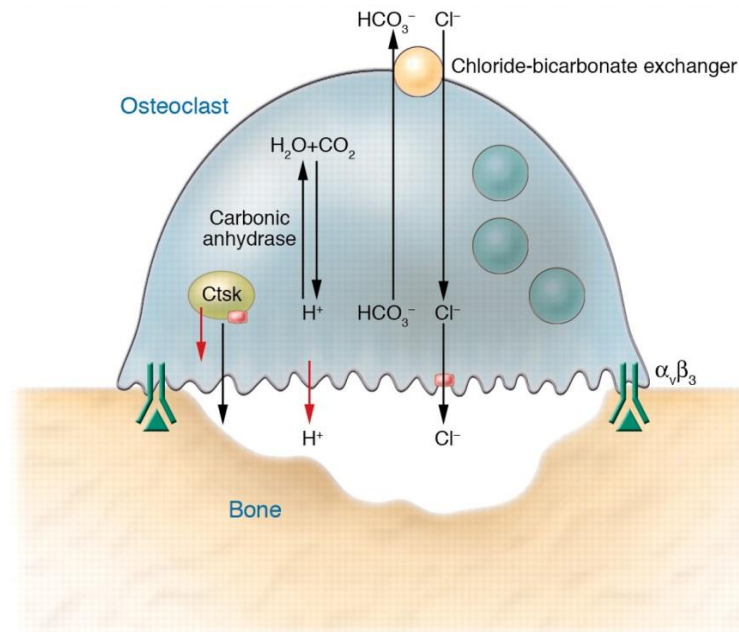


Figure 5. Mécanisme de résorption par les ostéoclastes.

L'ostéoclaste adhère à l'os en se liant ses intégrines  $\alpha_v\beta_3$  aux motifs RGD contenu dans les protéines matricielles (triangle vert), formant un compartiment quasi étanche. La cellule génère une bordure plissée qui est le siège d'une sécrétion spécifique de protons, d'ions chlore qui acidifient le compartiment et des protéases acides comme la cathepsine K (Ctsk). L'acide est généré par l'action combinée d'une ATPase  $H^+$  vacuolaire (flèche rouge) couplé à un canal  $Cl^-$  (oval rose). Le pôle basolatéral de l'ostéoclaste comprend un excréteur d'acide (l'échangeur  $Na^+/H^+$ , non représenté sur ce schéma) et un excréteur de base (l'échangeur  $HCO_3^-/Cl^-$ ) qui contribue à acidifier le cytoplasme. L'anhydrase carbonique convertit le  $CO_2$  et l' $H_2O$  en  $H^+$  et  $HCO_3^-$ . (Ross 2006)

### A.3.2. Lignée ostéoblastique

#### A.3.2.1. Les membres de la lignée ostéoblastique

##### **Ostéoblastes**

Les ostéoblastes sont des cellules polarisées cubiques ou polygonales de petite taille (20 à 50  $\mu m$ ), disposées sur l'ostéoïde (matrice non encore minéralisée) qu'elles sécrètent, à la surface interne et externe du tissu osseux en développement (endoste). Au niveau de la zone de contact avec l'os, les ostéoblastes vont déployer un nombre important de prolongements cytoplasmiques pouvant s'ancrer profondément entre les fibres de collagène. Ces prolongements assurent aussi le contact avec d'autres ostéoblastes ou des ostéocytes proche de la surface, via des jonctions de type communicantes (ou « gap ») pour la diffusion de signaux et de nutriments (Matsuo 2009).

Le rôle des ostéoblastes est de synthétiser et de mettre en place la trame de collagène de type I ainsi qu'un grand nombre de protéines non collagéniques, constituant ainsi l'échafaudage organique de la matrice osseuse (ostéoïde) puis d'assurer sa minéralisation

dans un second temps. Ces cellules sont riches en organites ce qui indique l'importante activité de synthèse protéique. De plus, elles contiennent une concentration élevée d'enzymes, dont la phosphatase alcaline qui intervient dans le déclenchement et l'entretien de la minéralisation de la substance pré-osseuse. Les ostéoblastes jouent également un rôle dans l'activation de la résorption via l'induction de la différenciation de précurseurs hématopoïétiques en ostéoclastes.

Une fois le dépôt de matrice réalisé, la plupart des ostéoblastes meurent par apoptose. Ceux qui ne meurent pas vont soit être incorporés dans le tissu ostéoïde où ils se différencieront en ostéocytes, soit rester à la surface osseuse et se transformer en cellules bordantes.

### **Ostéocytes**

Les ostéocytes sont des cellules provenant de la différenciation terminale d'ostéoblastes qui se sont laissés « emmurer » au sein de la matrice extracellulaire osseuse minéralisée (Franz-Odenaal *et al.* 2006). Le passage de l'ostéoblaste vers l'ostéocyte est en particulier dépendant de l'activité de la « **matrix metalloproteinase** » de type 2 (MMP2) (Inoue *et al.* 2006). Situées dans de petites cavités appelées « ostéoplastes », les ostéocytes émettent des prolongements cytoplasmiques dans toutes les directions. Ces prolongements permettent aux ostéocytes de communiquer entre eux, mais aussi avec les ostéoblastes et les cellules bordantes via des jonctions communicantes (« gap junction »). Ils sont logés dans de fins canalicules de la matrice osseuse. Le fluide extracellulaire qui circule dans ce réseau permet la nutrition et la synchronisation du métabolisme cellulaire. Les ostéocytes sont néanmoins moins actifs que les ostéoblastes et perdent une grande partie de leurs organites, mais restent capable de synthétiser du collagène de type I. Les ostéocytes se caractérisent par la diminution de certains marqueurs tels que le collagène de type I (**ColIII**), la phosphatase alcaline (**PAL**) non tissu-spécifique, et l'augmentation d'autres marqueurs comme la « Dentin Matrix Protein » (**DMP1**) et la « Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein » (**MEPE**), des régulateurs de la minéralisation (voir [partie B2](#)), ainsi que la sclérostine, un inhibiteur de la formation osseuse. Le fait que la plupart de ces molécules aient un rôle direct dans la minéralisation et qu'elles soient fortement exprimées chez les ostéocytes signifie que ces cellules peuvent réguler la minéralisation (Toyosawa *et al.* 2001, van Bezooijen *et al.* 2004, Noble 2008). Plusieurs molécules sécrétés par les ostéocytes interviennent dans la régulation du métabolisme du phosphate et notamment le facteur phosphaturique FGF23 (fibroblast growth factor 23) (Dallas and Bonewald 2010). Cette hormone, qui est également produite par les ostéoblastes, a permis la définition de l'os comme un organe endocrinien, car la fonction majeure de ce facteur osseux s'exerce dans le rein où il inhibe la réabsorption du phosphate. Enfin, les ostéocytes assureraient la réponse du tissu osseux aux signaux mécaniques provenant de l'environnement, par l'intermédiaire du fluide interstitiel des canalicules dont les mouvements en réponses aux contraintes subies par le tissu seraient la base de la mécano-sensibilité osseuse (el Haj *et al.* 1990, Mullender and Huiskes 1995, Ehrlich *et al.* 2002).

Ainsi, les ostéocytes jouent un rôle de chef d'orchestre en raison de leur implication à la fois dans le remodelage osseux, la régulation de l'homéostasie minérale ainsi que dans la réponse à la contrainte mécanique.

### **Les cellules bordantes**

S'ils ne s'orientent pas vers la voie ostéocytaire, les ostéoblastes, une fois leur travail de synthèse effectuée, peuvent s'aplatir petit à petit, et recouvrir l'interface osseuse inactive (où ne se déroule ni formation ni résorption), en ne gardant qu'une activité métabolique très réduite (Nakamura 2007). Ainsi chez l'adulte, seul 15% de l'os trabéculaire est recouvert d'ostéoblastes actifs, le reste étant recouvert de cellules bordantes. Ces cellules filtrent et régulent les nutriments destinés aux ostéocytes avec qui elles communiquent, via des jonctions gap, dans le cadre de la régulation du métabolisme osseux (Burger *et al.* 2003). Elles jouent un rôle déterminant dans la modulation de l'activité ostéoclastique en libérant des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs monocytaires. L'arrivée des ostéoclastes au contact de l'os serait facilitée par les rétractions cytoplasmiques des cellules bordantes et par la sécrétion de collagénases qui, en détruisant la fine couche non minéralisée recouvrant l'os (membrane endostéale de Parfitt), permettraient de résorber la matrice minéralisée (Hauge *et al.* 2001). Les cellules bordantes seraient également une source d'ostéoblastes de réserve, car elles semblent capables, sous l'influence de stimuli, de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs (Dobnig and Turner 1995).

#### A.3.2.2. La différenciation ostéoblastique et sa régulation

Les différentes étapes de la différenciation ostéoblastique sont contrôlées par l'expression progressive et séquentielle de multiples facteurs de transcription. Ces facteurs répondent aux sollicitations multiples du microenvironnement et des facteurs systémiques qui contrôlent la différenciation. Cette dernière est caractérisée par l'induction de gènes associés à l'activité proliférative et au cycle cellulaire d'abord, puis de gènes associés aux activités spécifiques des ostéoblastes, telles que la production de matrice extracellulaire. Ce sont soit des marqueurs précoces de type facteur de transcription comme **Runx2** (Runt-related transcription factor-2), soit des marqueurs phénotypiques fonctionnels comme la PAL, Coll1 et les protéines de structure non collagéniques (précocement l'ostéopontine (**OPN**) et plus tardivement la sialoprotéine osseuse (**BSP**) (Aubin *et al.* 1995, Fromigue *et al.* 1997). La séquence d'acquisition de ces marqueurs est donnée sur la *Figure 6* (Stein *et al.* 2004).

Le programme de croissance et de différenciation des ostéoblastes peut être divisé en phases distinctes basées sur les différents marqueurs exprimés à chaque étape. Lors de la première phase, la prolifération des ostéoblastes est marquée par l'induction de différents marqueurs du cycle cellulaire (histone H4) et de la croissance cellulaire (c-myc, c-fos et c-jun).

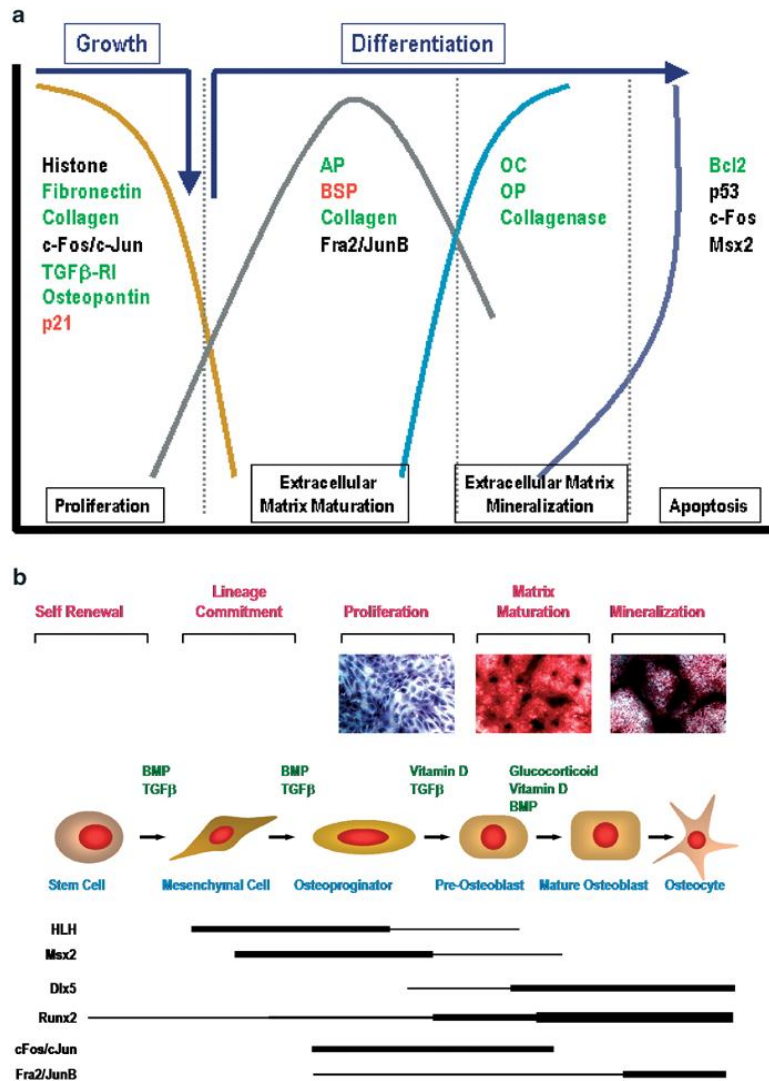


Figure 6. Croissance et différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique.

a) La plupart des gènes marqueurs sont soit régulés positivement (en vert) soit inhibés (en rouge) sous le contrôle de Runx2. Les autres gènes intervenants sont montrés en noir.

b) Chacun des stades ostéoblastiques (cellules en doré au milieu de la figure) a plusieurs traits communs mais présente des fonctions/propriétés uniques et exprime des gènes phénotypiques à des degrés divers. Typiquement, un pré-osteoblaste va passer par 2 étapes distinctes morphologiquement et phénotypiquement pour devenir un ostéoblaste mature. Cette évolution est mise en évidence sur les images d'immunohistochimie avec une coloration au bleu trypan pour l'étape de prolifération, une coloration PAL pour la maturation de la matrice et une coloration Von Kossa pour le contenu en calcium (minéralisation). En plus des signaux extracellulaires, plusieurs facteurs de transcription, comme Runx2, qui influence la différenciation des ostéoblastes sont montrés en bas. L'épaisseur de la ligne représente les niveaux cellulaires relatifs de protéines aux différentes étapes (Stein et al. 2004).

Après cette phase de prolifération et lorsque la différenciation est entamée, des facteurs de transcription plus spécifiques des ostéoblastes apparaissent (la BSP ou la phosphatase alcaline par exemple). Certains gènes, associés à la formation de la matrice extracellulaire,

sont également exprimés activement pendant la phase de prolifération, puis leur expression diminue graduellement pendant les premiers stades de différenciation ostéoblastique (Colli et TGF- $\beta$ ). Colli fait partie des marqueurs précoces spécifiques de la lignée ostéoblastique (Blair *et al.* 2002, Kartsogiannis and Ng 2004).

Runx2 est le facteur de transcription maître de l'engagement ostéoblastique et du maintien de la fonction ostéoblastique au cours de la croissance post natale. Il régule de multiples gènes caractéristiques des ostéoblastes (Ducy *et al.* 1997, Komori and Kishimoto 1998). Pendant la différenciation ostéoblastique, Runx2 augmente l'expression des gènes de protéines de la matrice osseuse dont la fibronectine, le Colli, l'OPN, la BSP et l'OCN. La délétion homozygote de Runx2 chez la souris conduit à une absence totale d'ossification (Komori *et al.* 1997, Huang *et al.* 2004). Pendant le développement osseux, Runx2 augmente le nombre d'ostéoblastes immatures et induit la différenciation ostéoblastique ce qui permet la formation de l'os primaire. Son niveau d'expression doit ensuite être diminué pour permettre l'acquisition par les ostéoblastes du phénotype nécessaire à la formation d'os mature (Komori 2010). En résumé, Runx2 stimule l'expression des gènes majeurs de la matrice osseuse pendant les stades précoces de la différenciation ostéoblastique, il n'est pas essentiel ensuite au maintien de l'expression de ces gènes dans les ostéoblastes matures (Komori 2010).

Runx2 est régulé au niveau post-translationnel puisqu'il est activé par sa phosphorylation (Xiao *et al.* 2000). Les ostéoblastes expriment plusieurs intégrines comme  $\alpha 2\beta 1$  qui est un récepteur majeur du collagène. Une équipe a montré que l'interaction de cette intégrine avec le collagène est nécessaire pour stabiliser la protéine Runx2 (blocage de sa destruction par le protéasome) et induire l'expression de gènes spécifiques de l'ostéoblaste (Xiao *et al.* 1998). L'activité transcriptionnelle de Runx2 peut être régulée positivement par divers facteurs tels que la  $\beta$ -Caténine. La voie de signalisation **Wnt** (« Wint »)/ $\beta$ -Caténine (*Figure 7*) est fortement impliquée dans le contrôle de la formation osseuse. Lorsque les protéines Wnt ne sont pas exprimées ou que leur liaison à leur récepteur (Frizzled LRP5/6) est inhibée, la  $\beta$ -Caténine est recrutée par un complexe multiprotéique regroupant les kinases GSK3 (Glucogen synthase kinase 3) et CK1 (caseine kinase 1), le supresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli) et l'axine. Après phosphorylation par GSK3, la  $\beta$ -Caténine est alors dégradée par le protéasome. Quand Wnt se lie à son récepteur, il en résulte l'activation de la protéine Dsh (dishevelled) qui provoque la dislocation du complexe axine-APC-GSK3, empêchant ainsi la phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine. La  $\beta$ -Caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau permet son interaction avec le facteur de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid enhancer Factor) favorisant l'activation de ses gènes cibles (*Figure 7*). Des mutations génétiques de LRP5 chez l'humain ont pu montrer l'importance de cette voie dans l'acquisition de la masse osseuse. En effet, les mutations récessives de perte de fonction de LRP5 induisent une ostéoporose, alors qu'au contraire, les mutations dominantes faux-sens de LRP5 sont associées à une forte masse osseuse (Gong *et al.* 2001, Boyden *et al.* 2002). La signalisation Wnt/  $\beta$ -Caténine stimule le renouvellement



des MSC, l'induction de l'ostéoblastogenèse ainsi que l'inhibition de l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes (Krishnan *et al.* 2006). La voie Wnt est régulée par un puissant inhibiteur, la sclérostine, que nous aborderons dans la [partie B2](#).

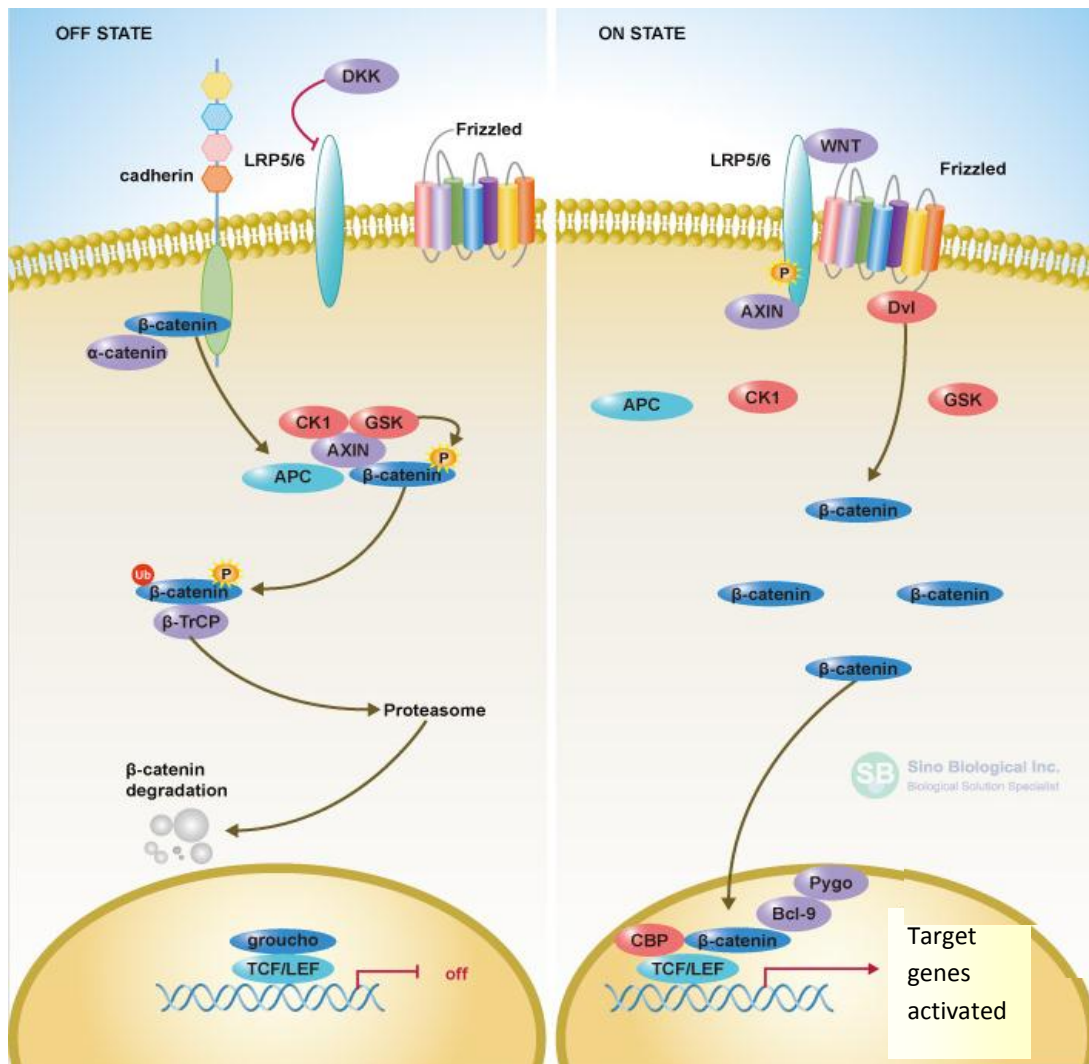


Figure 7. Voie de signalisation canonique des facteurs Wnt

En l'absence de signal Wnt, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée puis dégradée au protéasome alors que lorsque Wnt se lie à son récepteur, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis migre dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF permettant l'expression de ses gènes cibles. (Sino Biological Inc.)

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la séquence de différenciation ostéoblastique en agissant en amont, en aval ou en synergie avec Runx2. Msx2 (msh homeobox homolog-2) favorise la différenciation ostéoblastique des cellules souches (Ichida *et al.* 2004).

Ostérix (**Osx**) est un facteur de transcription dont l'expression est dépendante de celle de Runx2 et il agit en aval de celui-ci dans les préostéoblastes. Il a été montré *in vitro* qu'Osx induit l'expression de ColIII et de l'OCN. Il est spécifiquement exprimé dans le tissu osseux en développement et est indispensable à la formation osseuse. En effet, l'inactivation d'Osx

chez la souris empêche la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse (Nakashima *et al.* 2002). Ces souris ont ainsi un squelette uniquement composé de cartilage, malgré l'expression normale de Runx2. Ostérix est donc l'effecteur majeur de Runx2 sur les précurseurs ostéochondroblastiques, dont il détermine l'orientation ostéoblastique pure (Nakashima *et al.* 2002).

Immédiatement après la limitation de la prolifération, des protéines associées au phénotype ostéoblastique vont être exprimées, tel que la phosphatase alcaline. La PAL est une enzyme impliquée dans la formation d'hydroxyapatite comme nous le verrons dans la [partie A.4.2](#). Plus les cellules osseuses progressent vers la phase de minéralisation, plus elles expriment la phosphatase alcaline (Kartsogiannis and Ng 2004).

L'OCN est exprimée spécifiquement en phase post-proliférative, par les ostéoblastes matures dont elle est un marqueur. Elle pourrait d'ailleurs jouer un rôle possible dans le couplage de la résorption et de la formation osseuse (Kartsogiannis and Ng 2004). De plus, c'est une hormone qui augmente la production et la sensibilité à l'insuline, favorisant l'utilisation du glucose et la dépense d'énergie. Cette découverte a mis en évidence les liens existant entre le tissu osseux et le métabolisme énergétique en général, ce qui a été confirmé avec d'autres hormones non spécifiques de l'os, mais ayant un effet sur la masse osseuse, comme la leptine par exemple (Fukumoto and Martin 2009).

Tous ces marqueurs sont utilisés expérimentalement pour caractériser le stade de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique (*Figure 6*).

Outre l'expression de composants de la matrice, le processus de différenciation osseuse est également déterminé par l'expression temporelle de certaines hormones qui modulent l'expression et l'activation des facteurs de transcription. Par exemple, l'hormone parathyroïdienne (PTH) active les protéines G associées à son récepteur PTH-rP, exprimé par les ostéoblastes, ce qui favorise la phosphorylation de Runx2 (Qiu *et al.* 2003). Un traitement intermittent par la PTH stimule aussi l'ostéoblastogenèse en augmentant l'expression d'Osx (Rickard *et al.* 2006, Wang *et al.* 2006). D'autres signaux physiologiques comme la 1,25 dihydroxy-vitamine D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), (van Driel *et al.* 2004), les hormones sexuelles (Kousteni *et al.* 2007), TGF-β (Marie 2001), BMP (protéines morphogénétiques osseuses) (Kemoun *et al.* 2007) ou les glucocorticoïdes (Canalis 2005) régulent aussi l'ostéoblastogenèse. Cette séquence de différenciation est également contrôlée par le microenvironnement osseux via les interactions intercellulaires, impliquant entre autres les cadhérines (Mbalaviele *et al.* 2006), et les interactions cellules-matrice impliquant les intégrines (Xiao *et al.* 2000).

#### A.4. La matrice extracellulaire

Le tissu osseux est un matériau composite constitué d'une matrice extracellulaire qui ne contient presque pas d'élément qui lui soit propre. La combinaison de 3 caractéristiques lui donne sa spécificité : les particularités de sa composition, son organisation ordonnée (du

moins dans l'os lamellaire) et le fait qu'elle est minéralisée. Cette matrice comprend deux phases : une organique et une minérale (Malaval *et al.* 2008).

#### A.4.1. Composition

##### **La phase organique**

La matrice osseuse organique est composée à environ 90% de CollI et à environ 10% de protéines non collagéniques (PNC). Ces dernières sont, malgré leur faible proportion, des éléments fondamentaux et caractéristiques du tissu osseux en raison des multiples rôles qu'elles jouent dans la minéralisation et la biologie de l'os. Mécaniquement, la phase organique (et notamment les fibres de collagène) confère à l'os son élasticité, sa flexibilité et sa capacité à résister aux contraintes (pression, torsion, étirement, etc.) imposées notamment par la pesanteur et les déplacements. Les PNC interviennent dans ces propriétés mécaniques (Hansma *et al.* 2005) : lorsque la matrice osseuse est soumise à des contraintes, ces protéines sont étirées et dépliées, absorbant une grande partie de l'énergie et augmentant donc grandement la résistance du composite matriciel.

La phase organique de la matrice osseuse, également nommée tissu ostéoïde ou substance préosseuse, est déposée par les ostéoblastes et sera minéralisée dans un second temps sous leur contrôle.

Un quart des PNC provient de la circulation sanguine et est piégé dans l'os c'est par exemple le cas de l'albumine et de la fétuine. Les autres PNC sont d'origine ostéoblastique. L'ostéonectine, produite en abondance par les ostéoblastes, montre une grande affinité pour le collagène de type I et le calcium, elle modulerait l'adhésion cellulaire (Murphy-Ullrich 2001). L'OCN, quant à elle, est la seule protéine spécifique de l'os. La famille des SIBLING (Small, Integrin Binding Liguand N-linked Glycoproteins), qui comprend notamment l'OPN et la BSP, sera abordée en détail dans la [partie B](#) de cette revue bibliographique.

La matrice organique présente également de nombreux facteurs de croissance dont le plus abondant est le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ). Les ostéoblastes sécrètent également de nombreux facteurs tels que des FGF (Fibroblast Growth Factor), les IGF (Insulin-like Growth Factor) I et II ou le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor C). Ce sont d'importants régulateurs du recrutement, de la différenciation et de la fonction ostéoblastique (Marie 2008).

##### **La phase minérale**

La matrice minérale est composée principalement de phosphate et de calcium polysubstitués (CaPs), agrégés sous forme de cristaux de structure apatitique, de formule générale  $Me_{10}(XU_4)_6Y_2$ , faiblement cristallisée et non-stœchiométrique. La composition du minéral osseux varie en fonction des facteurs génétiques et environnementaux, de l'âge, de

l'alimentation, etc. Les ions carbonates sont les ions de substitutions principaux des cristaux d'hydroxyapatite (HA)  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  qui constituent le minéral osseux. Les travaux de Legros (Legros *et al.* 1987) ont par exemple établi la composition chimique suivante pour des os longs de bovin :  $Ca_{8-35}(PO_4)_{4.35}(HPO_4)_{0.59}(CO_3)_{1.06}(OH)_{0.35}$ . Les cristaux de CaPs décorent les fibres de collagènes et se retrouvent également à l'intérieur de celles-ci sous la forme de petites aiguilles hexagonales. Cette minéralisation survient en temps normal et chez l'homme une dizaine de jours après l'apposition de l'ostéoïde et se réalise à partir de sites de nucléation où vont se former les premiers cristaux.

La phase minérale joue, de plus, un grand rôle dans l'homéostasie phosphocalcique de par sa composition riche en calcium et phosphate. Elle échange ainsi rapidement ces ions avec le liquide interstitiel et donc avec le sang, sous l'influence de facteurs exogènes et endogènes.

C'est cette phase minérale qui confère à l'os son incroyable résistance aux contraintes (Glimcher 1987). Les valeurs moyennes de module d'Young obtenues pour de l'os cortical sont de 17 GPa, et de 1 à 14 GPa pour de l'os trabéculaire (Rho *et al.* 1997). La résistance en compression et en tension des os est respectivement de 195 MPa et 135MPa (Autefage 2000). Les lamelles constituant les ostéons ont quant à elles une résistance de 22 GPa (Rho *et al.* 1998). Outre la phase minérale, c'est avant tout l'organisation spatiale de l'os qui lui permet d'être une structure légère et extrêmement résistante.

#### A.4.2. Formation de la MEC

La séquence du dépôt de l'ostéoïde commence par l'organisation d'un réseau de fibronectine qui sert de patron à la mise en place ultérieure des fibres de collagène (Sottile and Hocking 2002). L'organisation des fibres de collagène donne son caractère tissé ou lamellaire au tissu osseux. Si ces fibres de collagène sont sans orientation privilégiée, l'os est dit « tissé ». C'est la forme de l'os « primaire », immature et peu résistant, résultant d'une formation de novo de tissu osseux, présent chez l'enfant, et lors de la réparation des fractures. Mais l'os tissé s'observe aussi lors de pathologies comme la maladie de Paget. Si, au contraire, les fibres sont organisées en couche d'orientation identique ou du moins préférentielle, l'os est dit « lamellaire ». Il s'agit de la forme mature (issue du remodelage) et il est plus résistant.

Le processus de minéralisation correspond au dépôt de CaPs dans la matrice extracellulaire composée de fibres et de substance environnante. Les mécanismes de la minéralisation ainsi que leur régulation ne sont pas totalement connus. Cependant, elle est sous le contrôle des ostéoblastes en différenciation terminale, des ostéocytes et les chondrocytes hypertrophiques. La minéralisation a lieu après la synthèse de la phase organique, à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé, c'est-à-dire au niveau du front de calcification. L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est

assurée par les protéines non collagéniques dont la composition favorise l'amorce du processus de nucléation.

Le mécanisme le plus probable proposé pour expliquer la minéralisation osseuse est basé sur le concept de la nucléation hétérogène (Glimcher 2006). Ce mécanisme repose sur la présence de grains précurseurs, organiques ou inorganiques, dirigeant la formation d'apatite à partir d'ions organiques solubles. La communauté scientifique n'est pas unanime quant à la localisation de cette nucléation et la nature moléculaire exacte du nucléateur. Un groupe de chercheurs proposent que les vésicules matricielles soient le site de nucléation initial ou primaire, comme une condition préalable à la minéralisation secondaire ultérieure de la MEC (Wuthier 1989, Boyan *et al.* 1990, Boskey 1992, Anderson 2003). Au cours de la formation de l'ostéoïde, ces vésicules bourgeonnent à partir des ostéoblastes au sein de la matrice et forment des nids pour la précipitation initiale de CaPs. Après précipitation des premiers cristaux d'HA (phase de nucléation), leur taille augmente rapidement par accrétion jusqu'à rejoindre d'autres foyers en croissance issus d'autres vésicules et combler l'espace disponible (croissance cristalline). De cette façon, une vague de minéralisation parcourt l'ostéoïde (Glimcher 2006).

La minéralisation est un processus étroitement régulé permettant d'une part que les concentrations en calcium et en phosphate permettent une minéralisation effective. D'autre part, cette régulation permet que les niveaux des inhibiteurs de la minéralisation, tel que le pyrophosphate inorganique (PPi), soient équilibrés. Le PPi extracellulaire est un inhibiteur bien connu et puissant de la minéralisation. Il est dégradé par la PAL (Meyer and Fleisch 1984). Dans l'os, la PAL est une ectoenzyme située sur la surface externe de la membrane cellulaire des ostéoblastes et des chondrocytes ainsi que sur la membrane de leurs vésicules matricielles (Anderson 1995). Classiquement, on pensait que la PAL générerait le Pi (Phosphate inorganique) nécessaire à la formation de l'HA. Cependant, il a été montré depuis qu'il hydrolysait également le PPi, réalisant ainsi un ratio de Pi/PPi permissif pour la formation et la croissance de cristaux d'HA (Moss and Greenberg 1967, Majeska and Wuthier 1975, Hesse *et al.* 2002, Anderson 2003). PPi inhibe l'activité enzymatique de la PAL, offrant ainsi un rétro contrôle par lequel la minéralisation est régulée (Addison *et al.* 2007).

D'autres régulateurs de la minéralisation incluent NPP1 (Phytophthora protein 1) et ANK (Ankylosis protein) qui travaillent en synergie pour augmenter les niveaux de PPi extracellulaire. Alors que NPP1 génère du PPi à partir de nucléosides triphosphate, ANK facilite son transport de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Hakim *et al.* 1984, Terkeltaub *et al.* 1994, Ho *et al.* 2000). De façon surprenante, les souris PAL<sup>-/-</sup> ont des niveaux normaux de minéralisation osseuse à la naissance. Ces résultats ont conduit à chercher d'autres phosphatases pouvant également contribuer à la minéralisation osseuse, et notamment Phospho1 (Houston *et al.* 2002). Phospho1 jouerait un rôle crucial dans l'accumulation du Pi dans les vésicules matricielles et dans la minéralisation osseuse (Houston *et al.* 2002, Stewart *et al.* 2006, Roberts *et al.* 2007, Roberts *et al.* 2008, Macrae *et al.* 2010, Huesa *et al.*

2011). Phospho1 a un rôle fonctionnel non-redondant au cours de la minéralisation osseuse. L'inhibition de phospho1 et PAL provoque l'absence totale de minéralisation osseuse du squelette entier (Yadav *et al.* 2011).

Nous verrons dans la [partie B](#) de ce chapitre que les SIBLING jouent également un rôle dans la stimulation ou l'inhibition de la minéralisation *in vivo* et *in vitro*.

#### A.4.3. Remodelage

Le remodelage est un processus physiologique cyclique ("turnover") dû aux activités coordonnées des cellules ostéoformatrices et des cellules ostéolytiques. Il se poursuit tout au long de la vie et est responsable du remplacement annuel de 10% du squelette humain adulte (Frost 1990). Ce processus permet notamment l'adaptation géométrique de l'os trabéculaire au champ de contraintes environnant puisque l'os est formé quand il est sollicité et est résorbé dans le cas inverse. Le remodelage permet ainsi de supporter les contraintes physiologiques tout au long de la vie. Il permet également au tissu osseux de libérer ou stocker des sels minéraux (Rho *et al.* 1998) indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Les mécanismes du remodelage sont au centre de nombreuses recherches, car il est impliqué dans de multiples pathologies telles que l'ostéoporose, l'ostéonécrose, l'ostéomyélite ou encore les ostéosarcomes et autres tumeurs osseuses.

Le remodelage commence par une activation des cellules bordantes qui, tout en se rétractant, dégradent légèrement la MEC et libèrent divers facteurs chimiotactiques, qui vont attirer les pré-ostéoclastes (phase d'activation). La fusion des pré-ostéoclastes donne alors naissance aux ostéoclastes qui adhèrent à la MEC et la résorbent en formant des lacunes *in vitro* et des *in vivo* trous cylindriques (dans l'os cortical) ou des rigoles (à la surface de l'os trabéculaire). Derrière les ostéoclastes, des cellules mésenchymateuses (qui pourraient être des progéniteurs ostéoblastiques, (Andersen *et al.* 2013) colonisent les surfaces résorbées, phagocytant les résidus pour nettoyer et lisser la surface (phase de réversion). Cette phase prépare le dépôt d'ostéoïde par les ostéoblastes. La minéralisation de la nouvelle matrice osseuse, réalisée dans un second temps, progresse comme un front dans l'épaisseur de l'ostéoïde (*Figure 8*).

Cette succession de phases au cours de la progression du remodelage, dans laquelle interviennent successivement différentes populations cellulaires osseuses sur un site donné, fut nommée Basic Multicellular Unit (BMU) par Frost en 1973. La nouvelle unité structurale osseuse issue du remodelage est nommée Basic Structural Unit (BSU). Le remodelage est donc un enchaînement temporel de différentes phases qui doivent se produire préférentiellement en certains endroits si l'os doit réparer des micro fractures ou s'accommoder de nouvelles contraintes mécaniques. Il se produit de façon stochastique si un déséquilibre de l'homéostasie phosphocalcique est détecté.

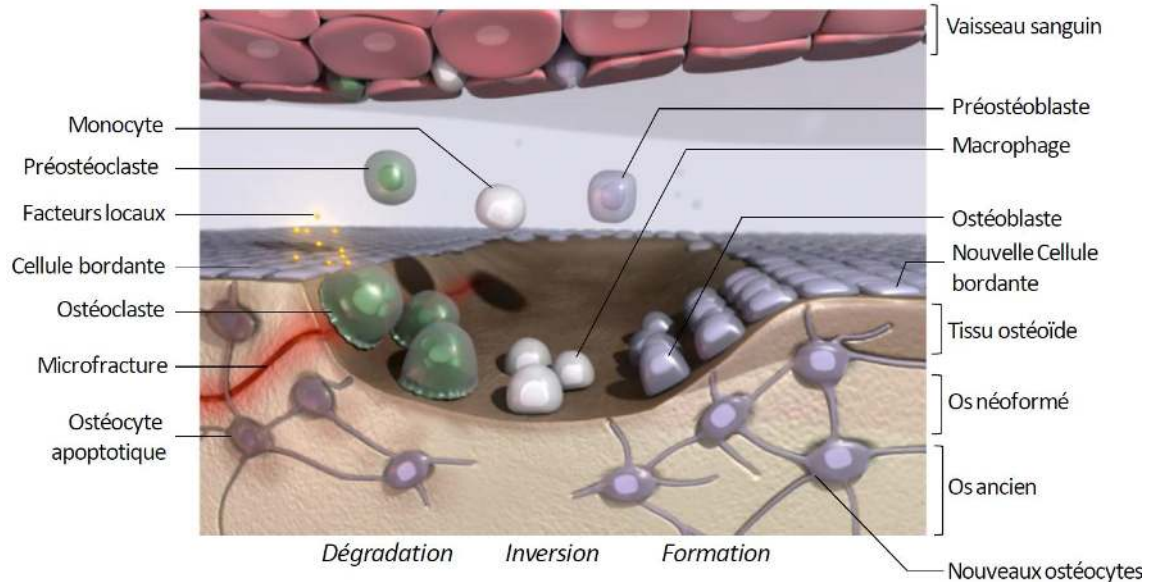
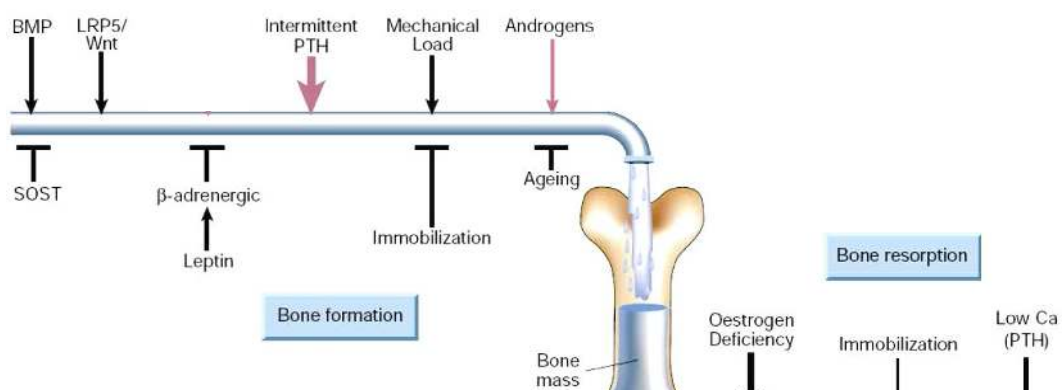


Figure 8. Remodelage du tissu osseux, adaptée de (Canalis et al. 2007)

Ce mécanisme cellulaire coordonné, de renouvellement osseux spatio-temporel, est contrôlé et influencé par divers paramètres exogènes et endogènes. Cette régulation stricte maintient en temps normal un équilibre entre perte et gain osseux (Manolagas 2000) (

Figure 9). La contrainte mécanique est l'un des facteurs de régulation du remodelage osseux le plus important. Cette question est développée dans la [partie C.2.2.2.](#)



*Figure 9. Facteurs influant le remodelage osseux*

*En noir sont représentés les facteurs physiologiques et en rouge les acteurs pharmacologiques influant sur les activités de formation (à gauche) ou de résorption osseuse (à droite.) L'influence de chacun des acteurs est représenté par l'épaisseur de la flèche. (Harada et al. 1995).*



## B. Les SIBLING : une famille de régulateur de la formation osseuse et de la réponse à la contrainte mécanique

Les **SIBLING** (« Small Integrin Binding Liguand N-linked Glycoproteins ») constituent une famille de protéines composée de l'ostéopontine (OPN, *Spp1*), la sialoprotéine osseuse (« Bone Sialoprotein », BSP, *Ibsp*), la protéine de la dentine matricielle 1 (« Dentin Matrix Protein 1 », DMP1, *DMP1*), MEPE (« Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein », *MEPE*) et la sialophosphoprotéine dentinaire (« Dentin SialoPhosphoProtein », DSPP, *DSPP*).

Des travaux d'évolution moléculaire indiquent que les SIBLING possèdent un ancêtre commun avec les protéines du lait (caséines), les protéines salivaires (stathérine) et les énamélines constituant alors la famille des « Secretory calcium binding phosphoproteins » (SCPP). Des études *in silico* indiquent que les SCPP ont évolué à partir de la partie N-terminale de la SPARCL1 (SPARC-like protein 1), une cousine de la SPARC/ostéonectine (Kawasaki *et al.* 2004, Sire *et al.* 2005, Kawasaki and Weiss 2006, Kawasaki *et al.* 2007). Les SIBLING sont toutes codées par des gènes situés sur une région du chromosome 4q chez l'homme et 5q chez la souris où sont regroupés d'autres gènes intervenant dans la physiologie osseuse d'où son nom, *bone gene cluster* (Rowe *et al.* 2000, MacDougall *et al.* 2002) (Figure 10). Elles possèdent peu d'homologie de séquences mais partagent plusieurs caractéristiques communes, dont une structure dite désordonnée et, pour la plupart, la présence d'un grand nombre d'acides aminés acide dans leur séquence favorisant les interactions avec les structures cristallines (Huq *et al.* 2005). Seule MEPE se démarque des autres SIBLING par son caractère non acide (Rowe *et al.* 2000).

Les SIBLING présentent toutes des structures exoniques similaires et un **motif RGD** (arginine-glycine-acide aspartique), qui facilite l'attachement des cellules et la signalisation cellulaire en se liant aux intégrines à la surface des cellules (Fisher *et al.* 2001). Leurs **similitudes de structure de gène et de protéine** ont été bien décrites par de multiples travaux (Rowe *et al.* 2000, Fisher *et al.* 2001, Fisher and Fedarko 2003, Qin *et al.* 2004, Rowe 2004, Huq *et al.* 2005, Bellahcene *et al.* 2008, Rowe 2012). Les SIBLING sont très fortement **exprimées dans l'os** et la dentine et sont sécrétées dans la MEC au cours de la formation de l'ostéoïde et de la minéralisation qui s'en suit. Toutes les SIBLING peuvent se lier à l'hydroxyapatite. Elles sont également **détectées dans un nombre croissant d'autres tissus**, en particulier sécréteurs, tel que le rein (Ogbureke and Fisher 2005). Ce ne sont donc pas des marqueurs spécifiques de l'os.

Toutes les SIBLING subissent de **fortes modifications post-traductionnelles** par phosphorylation, glycosylation, sulfatation, clivage par des protéases (BMP1, thrombine, les MMPs, etc) qui vont leur conférer des fonctions spécifiques (Boskey *et al.* 2012).

Les travaux de Rowe et al (Rowe et al. 2000, Rowe 2004), principalement axés sur **MEPE**, ont identifié un nouveau domaine fonctionnel appelé le **peptide ASARM** (« acidic serine aspartate-rich MEPE-associated motif »). Ce peptide est présent chez la plupart des espèces et dans toutes les SIBLING (MEPE: 414 DSSESSDSGSSSES 427, DMP1: 408 SSRRRDDSSSESSDSGSSSES DGSSES DSG 429 ; OPN : 101 DDSHQSDSHHSDESD 116). Son identification dans la BSP est toute récente et pas encore publiée (Barros et McKee, communication personnelle). ASARM se révèle crucial dans l'activité fonctionnelle des SIBLING. Peter Rowe (Rowe 2004, David and Quarles 2010) a développé une hypothèse impliquant le peptide ASARM, la protéase PHEX (« Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on X-chromosome ») et le FGF23 dans l'homéostasie du phosphate (au niveau de l'os et du rein) et la minéralisation. Cette hypothèse pourrait expliquer de nombreux troubles de la minéralisation incluant l'ostéomalacie induite par les tumeurs, ou encore les maladies héréditaires, l'ADHR (« Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets ») et la XLH (« X-linked hypophosphatemia »). Nous en parlerons dans la [partie B.4](#).

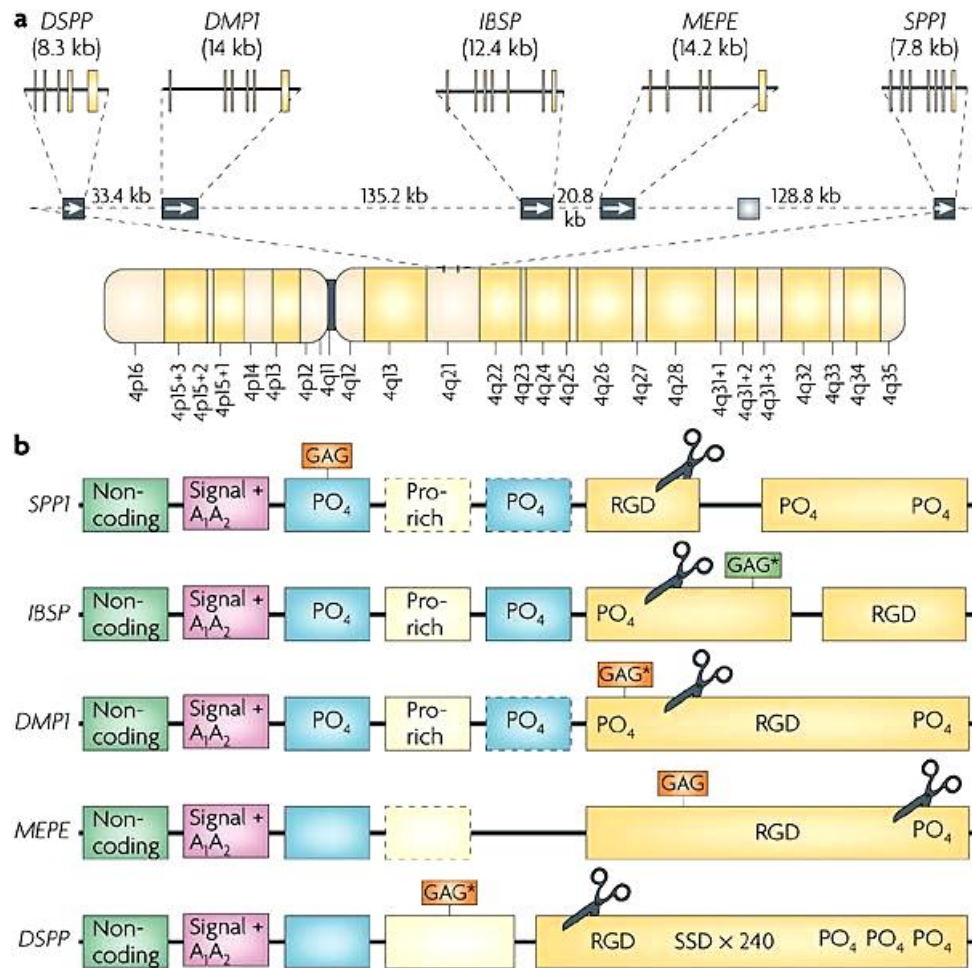


Figure 10. Représentation schématique (a) de la localisation des gènes des SIBLING dans le "Bone Gene cluster" humain et (b) de la structure de leurs transcrits (Bellahcene et al. 2008).  
 PO<sub>4</sub>: phosphate, GAG : glycosaminoglycane, Pro-rich : région riche en proline, RGD : motif Arginine-glycine-Aspartique, Ciseaux : site de clivage

La **BSP** est une glycophosphoprotéine, initialement isolée dans l'os cortical bovin par Herring puis caractérisée par Fisher (Herring 1972, Fisher *et al.* 1983, Fisher *et al.* 1987). La structure de la protéine et du gène ont été minutieusement décrites (revue dans (Ganss *et al.* 1999)). La BSP a une structure ouverte et flexible (Fisher *et al.* 2001, Wuttke *et al.* 2001, Tye *et al.* 2003), relativement proche de celle de l'OPN, lui permettant d'interagir avec de multiples partenaires de liaison comme le collagène (Fujisawa and Kuboki 1992, Fujisawa *et al.* 1995, Tye *et al.* 2005), l'HA (Goldberg *et al.* 2001), la MMP2 (Karadag *et al.* 2004) et le facteur H (Fedarko *et al.* 2000). La BSP possède des domaines riches en acide glutamique (tandis que l'OPN a une séquence polyaspartique) qui permettent la liaison à l'hydroxyapatite et, comme les autres SIBLING, un peptide RGD assurant l'attachement cellulaire (Oldberg *et al.* 1986, Hunter *et al.* 1994, Goldberg *et al.* 2001) (Figure 11). Aujourd'hui, nous savons que la BSP se lie à deux récepteurs : les intégrines  $\alpha\beta 3$  et  $\alpha\beta 5$ . La BSP n'échappe pas aux modifications post-traductionnelles. 50% de sa masse moléculaire est constituée de carbohydrate dont 12 d'acide sialique, ce qui explique son nom. Elle subit également des phosphorylations et des sulfatations (Hunter *et al.* 1988, Oldberg *et al.* 1988). Ces modifications sont généralement intracellulaires. Toutefois, après sa sécrétion, la BSP subit des phosphorylations supplémentaires par des ectokinases présentes à la surface des ostéoblastes. De ce fait, la protéine BSP fonctionnelle isolée des tissus a une masse d'environ 66 kDa (Fisher *et al.* 1987).

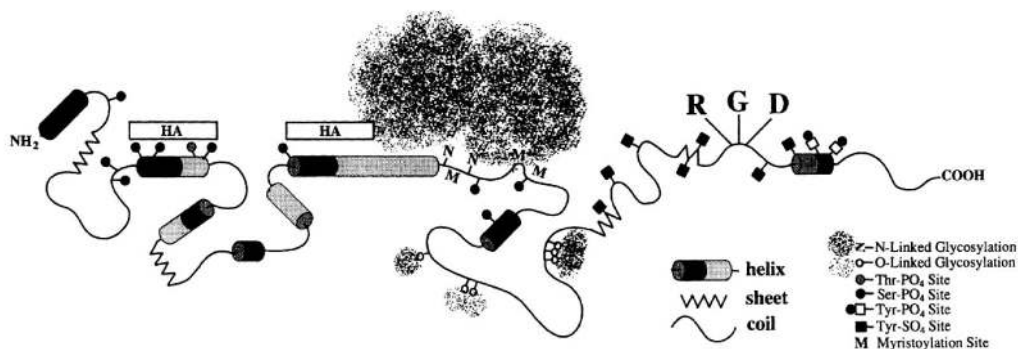


Figure 11. Structure schématique de la BSP (Ganss *et al.* 1999)

La BSP a tout d'abord été décrite dans les tissus minéralisés tels que l'os, la dentine, le cartilage minéralisé et le ciment (Oldberg *et al.* 1988, Fisher *et al.* 1990, Bianco *et al.* 1991, Chen *et al.* 1993). Elle a ensuite été également découverte dans les cellules trophoblastiques de la membrane placentaire, les glandes salivaires et le rein (Bianco *et al.* 1991, Ogbureke and Fisher 2004, Ogbureke and Fisher 2005). La BSP est également exprimée dans les cancers du sein, du poumon, de la thyroïde et de la prostate qui donnent des métastases dans le tissu osseux (Bellahcene *et al.* 1994, Bellahcene *et al.* 1997, Bellahcene *et al.* 1998, Waltregny *et al.* 1998).

De manière générale, la BSP est impliquée dans de nombreux processus, que nous sommes loin de tous connaître, allant de l'attachement cellulaire à l'angiogenèse, la régulation de la

minéralisation, le développement de métastases ou encore la formation osseuse (Hunter (Hunter and Goldberg 1993, Bellahcene *et al.* 1997, Ganss *et al.* 1999, Bellahcene *et al.* 2000, Tye *et al.* 2003, Fedarko *et al.* 2004, Karadag and Fisher 2006, Gordon *et al.* 2007, Malaval *et al.* 2008, Gordon *et al.* 2009, Hwang *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009) (Figure 12).

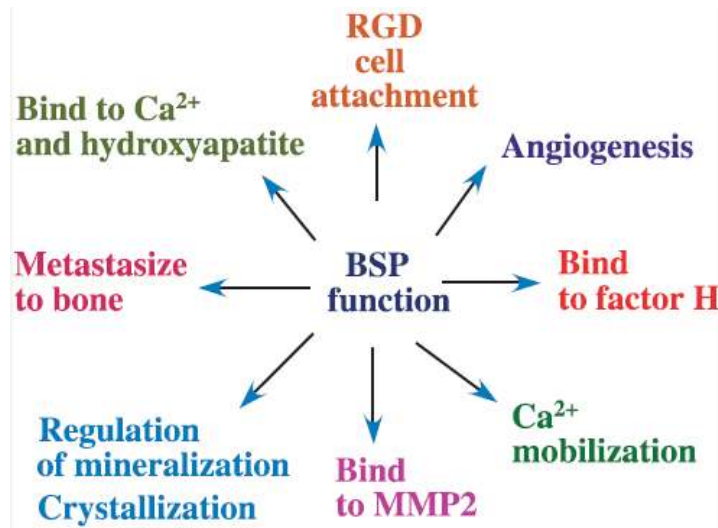


Figure 12. La BSP, une protéine multifonctionnelle (Ogata 2008).

**L’ostéopontine**, identifiée initialement dans les ostéoblastes, tire son nom de sa capacité à faire le lien entre les cellules osseuses et l’hydroxyapatite du minéral osseux grâce à son motif RGD et aux séquences riche en acide aspartique (Oldberg *et al.* 1986). L’OPN se lie à des récepteurs de surface tels que les intégrines (Liaw *et al.* 1995, Furger *et al.* 2003) ou le CD44 (« cluster of differentiation 44») (Weber *et al.* 1996, Teramoto *et al.* 2005). Ainsi, l’OPN joue un rôle dans l’adhésion et la migration des cellules.

La structure de la protéine et du gène ainsi que la localisation de l’OPN sont bien décrites dans plusieurs revues (Denhardt and Guo 1993, Sodek *et al.* 2000, Fisher *et al.* 2001) (Figure 13).

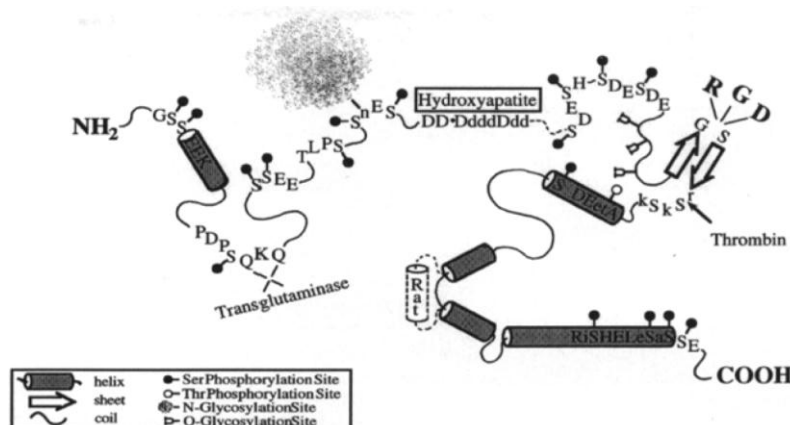


Figure 13. Structure de l’ostéopontine secondaire de l’ostéopontine (Sodek *et al.* 2000).

Cette protéine présente différents isoformes fonctionnelles résultant, d'une part, d'épissages alternatifs différents donnant l'OPNa, l'OPNb et l'OPNc (différant par leur taille). Cette dernière isoforme va par exemple contribuer à la progression du cancer ovarien chez la femme (Tilli *et al.* 2011). D'autre part, l'OPN subit des **modifications post-traductionnelles**, phosphorylations, glycosylations ou sulfations qui sont, comme pour les autres SIBLING, déterminantes pour ses fonctions (Figure 13). Le processing post-traductionnel explique les variations de taille observées pour l'OPN selon les tissus et/ou les modèles *in vitro*.

L'OPN est impliquée dans l'inflammation, la lactation, la réponse aux infections, au stress (mécanique, biochimique, lésion tissulaire), la minéralisation osseuse (voir partie B.2.) ou encore les processus métastatiques (Figure 14). Elle possède également la capacité de réguler différentes MMPs (MMP3, MMP9 et MMP13) permettant la progression des cellules au sein des tissus (Fedarko *et al.* 2004, Castellano *et al.* 2008, Chen *et al.* 2009, Matsui *et al.* 2009). Ainsi, sa **distribution** est vaste, allant des tissus minéralisés (os, dentine) aux tissus mous et aux liquides corporels (lait, urine, etc). Dans l'os, elle est sécrétée par les ostéoblastes (Zohar *et al.* 1997), les ostéocytes (McKee and Nanci 1995, Sodek *et al.* 1995) et les ostéoclastes (Dodds *et al.* 1995) au cours du modelage et du remodelage du squelette. Elle a également été localisée dans le cartilage hypertrophique de la plaque de croissance (Landis *et al.* 2003). Les sites de dépôt de l'OPN dans l'os incluent les foci de minéralisation dans l'ostéoïde (McKee *et al.* 1993, Dodds *et al.* 1995). L'OPN s'accumule dans la matrice osseuse minéralisée au cours de l'ossification endochondrale et intramembranaire (Reinholt *et al.* 1990, Hultenby *et al.* 1991, McKee *et al.* 1993).

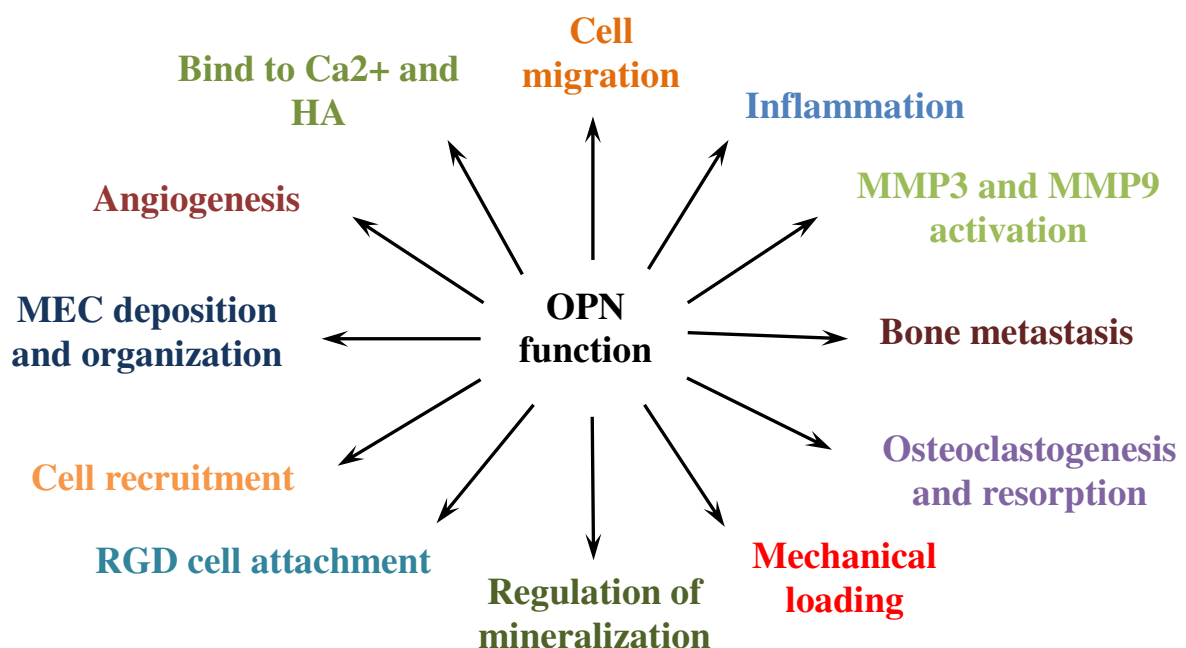


Figure 14. L'OPN, une protéine multifonctions.

**MEPE** a été initialement cloné à partir de tissus tumoraux de patients atteints d'Ostéomalacie Hypophosphatémique Oncogénique (Rowe *et al.* 2000). Son gène a ensuite été cloné chez le rat et la souris (Argiro *et al.* 2001). MEPE est exprimée dans les tissus minéralisés par les ostéocytes, les ostéoblastes et les odontoblastes (Nampei *et al.* 2004).

La **DMP1** a d'abord été identifié dans la dentine, puis par la suite dans l'os et le ciment ainsi que dans d'autres tissus non minéralisés (George *et al.* 1993, MacDougall *et al.* 1998, Sun *et al.* 2011). Dans l'os, la DMP1 est principalement exprimée par les ostéocytes mais aussi par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes (Toyosawa *et al.* 2001, Fen *et al.* 2002, Feng *et al.* 2003). Concernant ce dernier type cellulaire, DMP1 a été décrite comme une protéine d'abord nucléaire, qui régulerait l'expression des gènes ostéoblastiques dans les ostéoblastes indifférenciés. Puis au cours de la maturation ostéoblastique, elle deviendrait phosphorylée et est exportée à la MEC où elle orchestre la formation de la matrice minéralisée (Narayanan *et al.* 2003). Outre son intervention dans le tissu osseux que nous allons étudier dans le paragraphe suivant, la DMP1 serait également un inhibiteur de l'angiogenèse induite par le VEGF (Pirotte *et al.* 2011), processus étroitement couplé au remodelage et nécessaire à celui-ci.

Nous allons maintenant nous focaliser sur les rôles des protéines de cette famille dans la minéralisation de la matrice et le remodelage osseux, notamment en réponse à la contrainte mécanique, et sur les interactions fonctionnelles pouvant exister entre elles. Enfin, nous nous focaliserons sur le cas de la BSP.

### B.1. SIBLING et biologie osseuse

Des modèles d'extinction génique (« knockout »=**KO**) ont été réalisés pour tous les membres de la famille des SIBLING et les phénotypes des mutants décrits ont permis de préciser certaines fonctions de ces protéines. Il a ainsi été bien montré en particulier que les SIBLING jouaient un rôle dans la minéralisation de la matrice osseuse ou dentaire, en particulier en régulant directement la nucléation et la croissance des cristaux de phosphates de calcium.

Les souris KO pour **DMP1** n'ont pas de phénotype apparent à la naissance (Feng *et al.* 2003) mais développent un défaut de la plaque de croissance ainsi qu'un phénotype ostéomalacique c'est-à-dire une diminution de la minéralisation osseuse et une augmentation de la cristallinité minérale (Ling *et al.* 2005). D'autre part, elles présentent un profond défaut de la dentinogenèse (Ye *et al.* 2004) et de la chondrogenèse. Ce dernier est notamment caractérisé par une augmentation de la prolifération des chondrocytes, un défaut au niveau de leur mort cellulaire programmée et une faible calcification de la matrice cartilagineuse (Ye *et al.* 2005). Cependant le phénotype le plus frappant est le

dysfonctionnement de la minéralisation et des ostéocytes (Ling *et al.* 2005), que nous détaillerons dans la [partie B.2.](#)

Les souris **MEPE** *-/-* ont une augmentation marquée de masse osseuse dépendante de l'âge et une vitesse de minéralisation (« Mineral Apposition Rate » = MAR, mesurée par histomorphométrie) plus élevée (Gowen *et al.* 2003). Les cultures de cellules osseuses MEPE *-/-* présentent d'ailleurs une accélération marquée de la minéralisation.

Les souris déficientes en **OPN** ont un développement normal et ont une vie adulte normale. Cependant, leurs os sont globalement plus résistants et plus minéralisés que les souris sauvages. Cela serait dû à un retard de résorption osseuse, malgré un nombre d'ostéoclastes élevé (Boskey *et al.* 2002), mais aussi, et surtout, dû à la levée d'inhibition de la minéralisation. L'OPN joue également un rôle dans la fonction et l'activité des ostéoclastes. En effet, les souris OPN *-/-* ont un nombre d'ostéoclastes plus important que les souris sauvages, mais qui sont peu efficaces à résorber la matrice. Cette particularité se traduit par une masse osseuse trabéculaire accrue chez les mutants et une absence de réponse à des défis physiologiques accroissant la perte osseuse tels que l'ovariectomie (Yoshitake *et al.* 1999) ou l'immobilisation (Ishijima *et al.* 2001). Ce défaut de résorption est dû à un défaut de ligand pour l'intégrine  $\alpha\beta3$ , mais aussi à l'inhibition du CD44 dans les ostéoclastes mutants (Chellaiah *et al.* 2003). Ces résultats soulignent l'implication de l'OPN dans l'adhésion cellulaire et la régulation du remodelage osseux par action directe sur les ostéoclastes.

Enfin les souris KO pour la **BSP**, décrites dans notre laboratoire, ont un développement normal mais sont plus petites et plus légères que les souris sauvages. Elles ont une masse osseuse trabéculaire plus élevée ainsi qu'un remodelage osseux plus faible. La matrice osseuse des foetus et des jeunes adultes hypominéralisée par rapport aux sauvages, une différence qui disparaît progressivement avec l'âge (Malaval *et al.* 2008). D'autre part, Valverde *et coll.* ont décrit le phénotype de souris transgéniques surexprimant constitutivement la BSP. De façon intéressante, ces souris présentent un volume osseux trabéculaire diminué et un nombre d'ostéoclastes plus élevé que les sauvages (Valverde *et al.* 2008). *In vitro*, l'ostéoclastogenèse, de même que l'activité des ostéoclastes, sont augmentées chez ces souris transgéniques. Les marqueurs circulants de formation osseuse sont au contraire diminués et les cultures de cellules de calvaria indiquent une maturation accélérée des ostéoblastes avec une forte inhibition de leur prolifération. Le phénotype induit par la surexpression de BSP apparaît donc en quelque sorte complémentaire de celui des souris BSP *-/-*, encore qu'il ne résulte pas en un gain osseux (les calvaria et corticales sont plus fines et la densité minérale plus basse) et sauf en ce qui concerne la taille des animaux, qui est également diminuée chez ces mutants.

Ainsi, en biologie osseuse, les SIBLING peuvent être partagées en 3 groupes. Le premier comprend **MEPE** et **DMP1** qui sont particulièrement exprimées dans les ostéocytes et plutôt impliquées dans la minéralisation. Le deuxième comprend **l'OPN** et **la BSP** qui sont surtout exprimées dans les ostéoblastes et les ostéoclastes et qui jouent plutôt un rôle dans le remodelage. Cependant, toutes ces SIBLING semblent intervenir dans la minéralisation (Figure 15). Enfin, dans le 3<sup>ème</sup> groupe se trouve la **DSPP** que nous excluons de cette revue bibliographique car cette SIBLING est peu exprimée par les ostéoblastes et joue essentiellement un rôle dans la dent. Il a d'ailleurs été montré que chez les oiseaux, la disparition des dents est liée à la transformation en pseudogènes (gène inactif) de protéines de l'émail et de la dentine, incluant la DSPP. Cette observation indique clairement que la DSPP n'est en rien nécessaire au développement et aux fonctions osseuses (Sire *et al.* 2009).

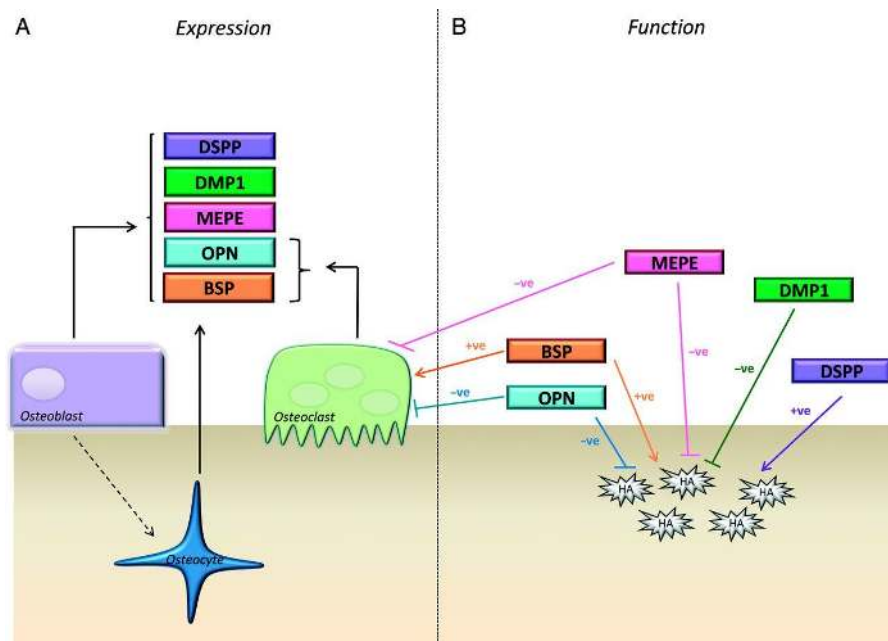


Figure 15. Schéma décrivant (a) l'expression et (b) la fonction des différentes SIBLING dans l'os. Mepe est exprimé par les ostéoblastes et les ostéocytes (indiqué par la flèche en pointillés). Mepe inhibe directement la formation d'HA dans l'os via son motif ASARM qui subit une phosphorylation post-traductionnelle. Mepe inhibe aussi le nombre et l'activité des ostéoclastes. L'OPN a les mêmes effets fonctionnels que Mepe sur la minéralisation osseuse. Cependant, tout comme la BSP, l'OPN est également exprimé par les ostéoclastes. Il est bien établi que la BSP est un nucléateur de l'HA et se révèle crucial dans les maladies de formation osseuse accrue car elle augmente l'ostéoclastogénèse. DMP1 (et DSPP) est exprimé dans l'os et est « processed into » plusieurs fragments. DMP1 inhibe la biominéralisation dans les os. (Staines *et al.* 2012)

Dans l'os, la **BSP** est exprimée par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les chondrocytes hypertrophiques (Bianco *et al.* 1991). Au cours du développement osseux du rat, l'ARNm (acide ribonucléique messager) de la BSP est exprimée dans les ostéoblastes de



la calvaria des nouveaux nés ainsi que de la spongieuse primaire des os longs (Chen *et al.* 1991, Chen *et al.* 1992). Plus tard (environ 14 jours après la naissance), elle est retrouvée dans les centres d'ossification secondaire et le cartilage articulaire (Chen *et al.* 1992). Chez l'humain et le porc, la protéine est présente chez l'adulte dans l'os cortical et trabéculaire, (Chen *et al.* 1991, Ingram *et al.* 1993), ainsi que dans les lignes cémentantes et le tissu ostéoïde (Roach 1994). Le gène de la BSP est activé et induit au moment de la différenciation ostéoblastique. Toutefois, une expression transitoire à un stade beaucoup plus précoc du lignage a également été décrite (Malaval *et al.* 1999, Liu *et al.* 2003). L'induction du gène de la BSP coïncide avec la formation initiale de la matrice minéralisée dans l'os membranaire et endochondral. Le niveau maximal est atteint pendant la formation de l'os embryonnaire. L'expression de la BSP est donc liée spatio-temporellement à la différenciation des ostéoprogéniteurs en ostéoblastes, mais aussi à la formation initiale de cristaux d'hydroxyapatite *in vitro* (Ibaraki *et al.* 1992, Kasugai *et al.* 1992, Yao *et al.* 1994, Midura *et al.* 2004) et *in vivo* (Chen *et al.* 1992, Chen *et al.* 1994), donc lors de la formation de l'os tissé.

## **B.2. SIBLING et minéralisation**

### *B.2.1. MEPE et DMP1 : deux produits des ostéocytes aux rôles antagonistes*

#### **MEPE**

La première preuve d'un rôle direct de MEPE dans la minéralisation osseuse est apparue avec l'augmentation des niveaux d'expression de son ARNm au cours de la minéralisation de la matrice par les ostéoblastes (Petersen *et al.* 2000, Argiro *et al.* 2001) L'analyse de souris KO pour cette protéine a renforcé le rôle proposé de MEPE dans la minéralisation. Dans ce modèle murin, on observe une augmentation de la masse osseuse avec l'âge, associée à une augmentation du nombre et de l'épaisseur des travées et à une vitesse de minéralisation plus élevée. On observe également une augmentation considérable du taux de minéralisation par les ostéoblastes KO pour MEPE en culture *in vitro*. Le nombre et l'activité des ostéoclastes ne semblent pas affectés, suggérant un **effet inhibiteur de MEPE sur la formation osseuse** (Gowen *et al.* 2003). De fait, la surexpression de MEPE chez des souris, sous le contrôle du promoteur de Coll1, conduit à un défaut de croissance et de minéralisation associé à une diminution du remodelage osseux (David *et al.* 2009).

Comme pour les autres SIBLING, l'activité de MEPE est modulée par son état de clivage et de phosphorylation. Comme cité précédemment, des travaux récents ont identifié le peptide ASARM de MEPE de 2,2 kDa comme un élément fonctionnel de MEPE, clivé par la cathepsine B. Ce peptide ASARM est situé immédiatement en aval du site de clivage (Rowe *et al.* 2000). L'administration *in vitro* et *in vivo* du peptide ASARM de MEPE peut inhiber l'absorption du phosphate inorganique (Pi). Ceci probablement grâce à une diminution de l'expression du co-transporteur de Pi dépendant du sodium de type II (NPT2a) ou à l'augmentation de l'expression de FGF23, un puissant inhibiteur de la réabsorption de Pi (Liu *et al.* 2007, Dobbie

*et al.* 2008, Marks *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008, David and Quarles 2010, Shirley *et al.* 2010). Il a été toutefois suggéré que MEPE peut avoir un **rôle direct dans la minéralisation de la matrice** en dehors de la régulation du Pi. Le peptide ASARM de MEPE inhibe la minéralisation par les ostéoblastes en se liant directement aux cristaux d'HA (Addison *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008). La phosphorylation post-traductionnelle d'ASARM (sur 3 résidus serine) est nécessaire à cet effet inhibiteur. Récemment, on a montré qu'une forme tronquée de MEPE, qui n'a plus de peptide ASARM, peut stimuler la minéralisation osseuse en culture et chez des souris (Sprowson *et al.* 2008).

Pris dans leur ensemble, ces résultats soulignent **l'importance des modifications post-traductionnelles dans la détermination du rôle fonctionnel de MEPE.**

De plus, le défaut d'**ostéoclastogenèse** observé *in vitro* par Liu *et al.* (Liu *et al.* 2005) pourrait être dû au peptide ASARM qui, ajouté à une culture de moelle osseuse, entraîne une augmentation de l'expression d'OPG, un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse (David *et al.* 2008).

**Tous ces résultats suggèrent donc que MEPE est très impliqué à la fois dans la minéralisation osseuse et l'homéostasie du Pi.**

Le motif ASARM de MEPE et le peptide ASARM libre sont des substrats de l'endopeptidase PHEX. Des études *in vitro* ont montré que PHEX se lie au motif ASARM de MEPE de façon non protéolytique, mais protège ainsi MEPE du clivage protéolytique par la cathepsine B, prévenant alors l'inhibition de la minéralisation par la libération d'ASARM (Guo *et al.* 2002, Rowe *et al.* 2005). De plus, PHEX peut se lier aux peptides ASARM libres, neutraliser leur activité par séquestration et hydrolyse et ainsi détruire leur effet inhibiteur sur la minéralisation (Liu *et al.* 2007, Addison *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008). PHEX interagit aussi avec d'autres SIBLING contenant des motifs ASARM, DMP1 et OPN (voir plus loin).

## DMP1

Comme pour les autres SIBLING, la **maturation protéolytique de DMP1** apparaît essentielle à sa fonction et sa localisation. Dans l'os et la dentine, on trouve 3 formes de DMP1 : un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de 37 kDa lui-même présent sous deux formes (une contenant un glycosaminoglycane sulfaté appelé DMP1-PG (*dentin matrix protein-1 proteoglycan fragment*) et l'autre pas appelé « fragment de 37 kDa »), et un fragment COOH-terminal de 57 kDa, contenant le motif ASARM (Qin *et al.* 2003, Qin *et al.* 2004, Qin *et al.* 2006, Martin *et al.* 2008). Une petite quantité de la molécule entière de 105kDa est retrouvée dans les tissus minéralisés (Huang *et al.* 2008) mais elle est rapidement clivée *in situ* (Maciejewska *et al.* 2009), certainement par BMP1 qui libère et active les fragments N et C-terminal (Steiglitiz *et al.* 2004). Dans la plaque de croissance, le fragment N-terminal est retrouvé dans les chondrocytes proliférant et hypertrophiques alors que le fragment C-terminal est trouvé au

niveau des sites de minéralisation (Maciejewska *et al.* 2009) suggérant l'existence de différences tissu-spécifiques d'activité des fragments.

Les premières études sur le rôle de la DMP1 dans la **biominéralisation** ont montré que les cellules MC3T3 qui la surexpriment avaient une différenciation accélérée, une minéralisation précoce et formaient des nodules minéralisés (= colonies d'ostéoblastes déposant une matrice d'os primaire) de taille supérieure au contrôle (Narayanan *et al.* 2001). L'analyse des souris KO pour DMP1 a confirmé son **rôle majeur dans la minéralisation** osseuse. Les souris DMP1 KO présentent un os très ostéomalacique (Ling *et al.* 2005), accompagné d'anomalies majeures de leurs ostéocytes. En effet, on observe notamment un bourgeonnement anormal de la surface membranaire des dendrites et une absence de front de minéralisation (Feng *et al.* 2006). Les souris DMP1 KO montrent aussi un défaut sévère de la chondrogenèse comme celui observé chez les patients atteints de rachitisme hypophosphatémique autosomique récessif (« autosomal recessive hypophosphatemic rickets » ou ARHR) qui est causé par une mutation de DMP1 (le remplacement des 18 derniers acides aminés par 33 nouveaux) chez l'humain (Feng *et al.* 2006, Farrow *et al.* 2009). D'autre part, la suppression de DMP1 conduit à augmentation spectaculaire de l'expression de FGF23 dans les ostéocytes (Feng *et al.* 2006, Qin *et al.* 2007). Cette voie de régulation suggère que DMP1 peut contrôler les niveaux de Pi, ce qui est en accord avec l'hypophosphatémie observée chez les souris KO DMP1 et dans l'ARHR (Ye *et al.* 2005, Feng *et al.* 2006). Cette observation souligne le **rôle central de DMP1 dans la biominéralisation et l'homéostasie du Pi**. La correction de cette hypophosphatémie par un régime riche en Pi restaure le défaut de la plaque de croissance (rachitisme) des souris DMP1 KO mais n'a qu'un effet limité sur le défaut osseux (Feng *et al.* 2006). D'autre part, la surexpression de DMP1 (la protéine entière ou le fragment C-terminal) chez les souris KO restaure à la fois leur phénotype, les anomalies du squelette et l'hypophosphatémie (Lu *et al.* 2011).

Ces études *in vivo* et *in vitro* indiquent que DMP1 joue un rôle majeur dans la **régulation de la biominéralisation**. Ce rôle est très dépendant de son **clivage et ses modifications post-traductionnelles**. Ainsi, les fragments de 37 et 57kDa, structurellement désordonnés, se lient à l'hydroxyapatite et facilitent la croissance et la multiplication des cristaux d'HA, augmentant ainsi la minéralisation. La protéine entière, qui est sensiblement plus structurée, bloquerait l'accès aux cristaux d'HA empêchant ainsi leur multiplication et leur croissance. Quant à DMP1-PG, il prévient le dépôt initial de minéral dans la pré-dentine, voire dans l'ostéoïde (He *et al.* 2003, Tartaix *et al.* 2004, Gericke *et al.* 2010).

### *B.2.2. L'OPN, puissant inhibiteur de la minéralisation*

Plusieurs études ont montré le **rôle inhibiteur de l'OPN dans la formation et la croissance d'HA** (Boskey *et al.* 1993, Hunter *et al.* 1994) ainsi que dans la minéralisation de culture cellulaire *in vitro* (Speer *et al.* 2005). Ce rôle a été confirmé par l'hyperminéralisation des souris déficientes pour l'OPN (Boskey *et al.* 2002). Plus précisément, il a été montré

récemment *in vitro* que le peptide ASARM de l'OPN inhibe la minéralisation de la MEC en se liant aux cristaux d'HA (Addison *et al.* 2010, Boskey *et al.* 2012). Boskey et al ont montré que les fragments C-terminal et N-terminal de l'OPN favorisent la formation *de novo* d'HA tandis que le fragment central l'inhibe (Boskey *et al.* 2012). Ceci met en évidence l'importance de la **fragmentation post-traductionnelle** de l'OPN dans la détermination de sa fonction. L'étude d'Addison et al (Addison *et al.* 2010) montre également que, comme pour MEPE, la capacité de l'ASARM de l'OPN à inhiber la minéralisation est dépendante de sa phosphorylation. Ainsi, plusieurs études ont montré que la PAL déphosphoryle l'OPN, limitant ainsi son activité inhibitrice sur la formation et la croissance d'HA (Boskey *et al.* 1993, Hunter *et al.* 1994, Jono *et al.* 2000). En outre, le PPI, qui est lui-même un inhibiteur de la minéralisation, up-régule directement l'expression de l'OPN dans les ostéoblastes. L'hydrolyse du PPI par la PAL aurait aussi un effet significatif inhibiteur sur les niveaux d'expression de l'OPN (Addison *et al.* 2007). Le croisement des souris OPN<sup>-/-</sup> avec les souris PAL<sup>-/-</sup> compense en partie l'ostéomalacie induite par la perte de l'activité phosphatasique, ce qui confirme que **l'OPN est un inhibiteur physiologique de la minéralisation de la matrice osseuse** (Harmey *et al.* 2006).

### B.2.3. Le peptide ASARM dans la physiologie et la pathologie osseuse

Comme nous avons pu le voir, le motif **ASARM** présent sur les SIBLING et les peptides ASARM libérés ont des fonctions régulatrices dans la minéralisation, la régulation du phosphate, l'ostéoclastogenèse ou encore la mécanotransduction. Nous avons aussi vu que le motif ASARM de **MEPE** et le peptide ASARM libre sont des substrats de **PHEX**. Le motif ASARM de l'**OPN** partage 60% d'homologie avec celui de MEPE, et sa forme phosphorylée est également clivée par PHEX. L'ajout d'ASARM d'OPN phosphorylé à des cultures d'ostéoblastes inhibe effectivement la minéralisation *in vitro* (Addison *et al.* 2010). Très récemment, Barros et al. ont montré que l'OPN entière était un substrat de PHEX qui la dégrade totalement en commençant par la région ASARM. Ce clivage protéolytique de l'OPN peut contribuer au contrôle local de la minéralisation osseuse (Barros *et al.* 2012).

Des mutations ou la délétion d'une partie du gène PHEX causent l'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH). Dans cette maladie, l'hypophosphatémie est accompagnée de défauts de minéralisation, de rachitisme et de lésions ostéomalaciques (

Figure 16). Les mutations de DMP1 causent des défauts rénaux et osseux identiques à ceux qui résultent d'une perte de fonction de PHEX. Dans le cas de DMP1, ceux-ci causent le rachitisme hypophosphatémique autosomal récessif (ARHR). Dans les deux pathologies (XLH et ARHR), la surexpression de **FGF23** joue un rôle majeur dans la pathogenèse (Feng *et al.*

2006, Liu *et al.* 2006, Lorenz-Depiereux *et al.* 2006). Ceci semble indiquer l'existence d'une voie autocrine/paracrine qui coordonne la minéralisation osseuse avec la production de FGF23.

Des travaux récents suggèrent un déplacement par compétition de l'interaction PHEX-DMP1 par des peptides ASARM qui mène à une augmentation de l'expression de FGF23, comme observé chez les souris HYP (« primary defects in X-linked hypophosphatemic rickets »), un modèle murin de la maladie humaine XLH, et les patients XLH (David and Quarles 2010, Martin *et al.* 2011, Rowe 2012). FGF23 se lie au récepteur FGFR1 et forme un complexe avec Klotho pour réguler négativement l'absorption du phosphate par l'intestin et positivement son excrétion par le rein ce qui a pour effet de diminuer le taux de phosphate sérique (Razzaque 2009).

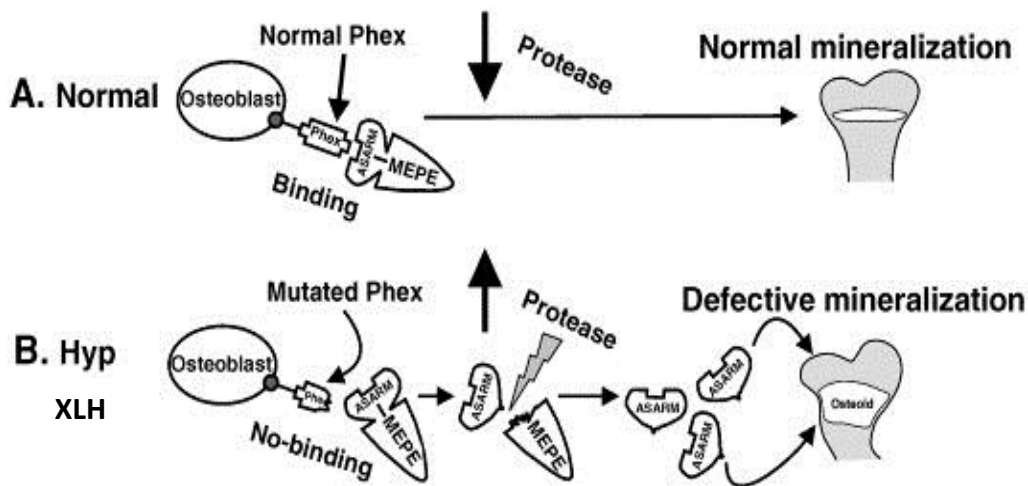


Figure 16. Schéma du modèle ASARM.

*PHEX se lie à Mepe via le motif ASARM. In vitro, cette association protège Mepe du clivage par la cathepsine B. La mutation de PHEX chez les patients XLH ou les souris HYP résulte à la perte de liaison entre PHEX et Mepe ce qui a pour conséquence d'augmenter l'exposition de Mepe aux protéases ostéoblastiques. Ainsi, l'expression/l'activité de Mepe et de ces protéases (incluant la cathepsine D) est plus élevée chez les souris HYP ce qui entraîne une augmentation de la dégradation de Mepe et donc de la libération du peptide ASARM. La dégradation d'autres SIBLING nécessaires pour la minéralisation, comme DMP1, contribue aussi à l'augmentation du pool de peptides ASARM. Le peptide ASARM étant un puissant inhibiteur de la minéralisation, il joue un rôle clé dans le rachitisme et l'ostéomalacie. (d'après (Rowe et al. 2006))*

Ces nouvelles découvertes révèlent une voie de régulation os-rein originale comprenant PHEX, DMP1, MEPE, le peptide ASARM et FGF23. Cette voie impacte la formation osseuse, la minéralisation du squelette et l'homéostasie rénale et intestinale du phosphate (

Figure 17).

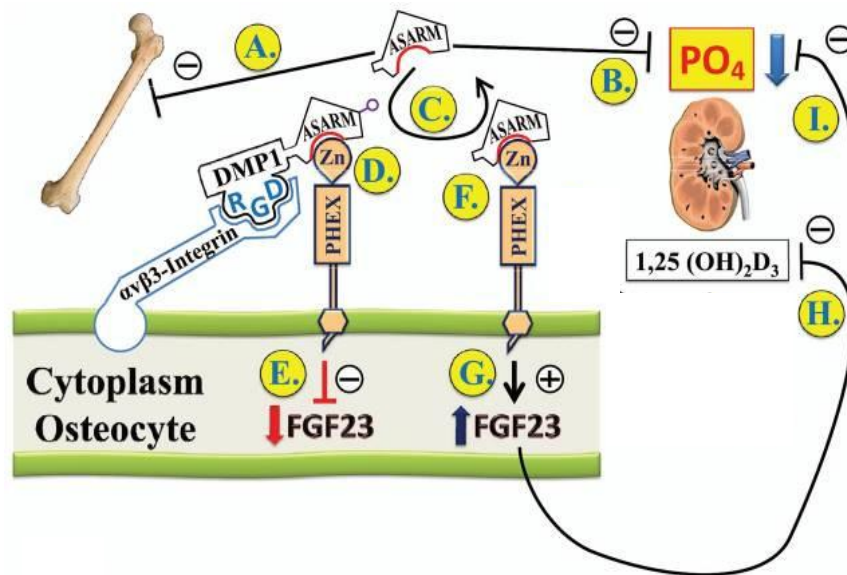


Figure 17. Régulation d'ASARM et du phosphate via le FGF23 et le calcitriol

La boucle physiologique décrite dans ce schéma impacte la régulation de la minéralisation de l'os et du phosphate rénal. (A) L'accumulation de peptides ASARM inhibe la minéralisation et (B) inhibe l'absorption de phosphate dans le rein. (C, D, E) Les peptides ASARM libres (provenant de la protéolyse des SIBLING) déplacent de manière compétitive le complexe DMP1, PHEX et intégrine, régulant ainsi l'expression de FGF23. Le complexe PHEX, DMP1 et l'intégrine  $\alpha\beta_3$  pourrait co-activer une voie de signalisation conduisant à supprimer l'expression de FGF23 ou diminuer sa stabilité. (F, G, H, I) Dans le cas contraire, nous observons une régulation positive de l'expression de FGF23, une régulation négative du calcitriol (forme hormonale active de la vitamine D) et une inhibition de l'absorption rénale du phosphate (ou hypophosphatémie). (d'après (Rowe 2012))

#### B.2.4. La BSP, nucléateur de la minéralisation

Pendant l'embryogenèse, la BSP est exprimée au début de la formation osseuse (Chen *et al.* 1992). De nombreuses études ont suggéré que cette protéine, qui est localisée dans sites de formation des cristaux minéral (Bianco *et al.* 1993), était impliquée dans la formation initiale des cristaux d'HA (Harris *et al.* 2000, Fisher *et al.* 2001, Tye *et al.* 2003, Wang *et al.* 2006, Nahar *et al.* 2008). Rappelons ici que la densité minérale des embryons est plus basse chez les KO BSP. Ce défaut se corrige progressivement avec l'âge ce qui suggère que c'est essentiellement la minéralisation primaire de la matrice (processus actif) qui est concernée. La minéralisation secondaire (progressive et passive) apparaît normale (Malaval *et al.* 2008).

Une étude *in vitro* a montré que lors de la formation de la matrice minéralisée, la BSP peut se présenter sous différents isoformes suite à diverses **modifications post-traductionnelles** (Zhu *et al.* 2001). Ces isoformes sont répartis de façons différentes au cours du processus de minéralisation. Les molécules de BSP très riches en sulfates se présentent dans les sites de nucléation des cristaux d'HA, alors que les variants plus faiblement sulfatés et plus fortement phosphorylés apparaissent au moment de la croissance du minéral (Zhu *et al.* 2001). Enfin, les formes de BSP hautement phosphorylées se situent dans la matrice non encore minéralisée. Ces différentes isoformes, interviendraient dans la **nucléation des cristaux d'hydroxyapatite, leur croissance ainsi que la régulation de cette croissance**. Il apparaît donc que, comme pour les autres SIBLING, la fonction de la BSP soit fortement dépendante de ses modifications post-traductionnelles (Stubbs *et al.* 1997).

La surexpression de BSP dans les ostéoblastes résulte de fait en une augmentation de la **minéralisation** (Hunter *et al.* 1996, Gordon *et al.* 2007). A l'inverse, les cultures d'ostéoblastes cultivés en présence d'un anticorps anti-BSP montre une diminution de la minéralisation (Cooper *et al.* 1998, Mizuno *et al.* 2000) et, comme nous l'avons dit précédemment, l'os des souris KO BSP est hypominéralisé.

Huffman et al ont montré *in vivo* que la BSP était fortement enrichie dans les foyers de minéralisation, ce qui l'associe à la nucléation du minéral (Huffman *et al.* 2007). La formation des cristaux d'HA se faisant à l'intérieur des fibrilles de collagène, la liaison de la BSP au collagène semble aussi importante pour l'initiation de la minéralisation osseuse (Xu *et al.* 2007). Une équipe a montré que l'interaction BSP-collagène était essentiellement hydrophobique mais probablement stabilisée via des liaisons électrostatiques (Baht *et al.* 2008). Cette liaison augmente en particulier le potentiel nucléateur de la BSP (Baht *et al.* 2008).

Le rôle de la BSP comme nucléateur de l'HA semble aussi impliquer l'enzyme membranaire la PAL. Des cultures ostéoblastiques sur-exprimant la BSP présentent une activité PAL plus importante (Valverde *et al.* 2008).

### **B.3. SIBLING et contraintes mécaniques**

Le chargement mécanique du squelette dans ses fonctions quotidiennes entraîne un modelage et un remodelage continu (Frost 1990). Ce **chargement régule positivement, *in vivo* l'expression d'OPN dans l'os**. En effet, l'application d'une force de pression ou de contrainte selon le modèle expérimental de mastication (Waldo and Rothblatt 1954) chez le rat, augmente l'expression de l'OPN dans les ostéocytes de l'os alvéolaire, plus particulièrement dans les zones qui reçoivent la force de pression (Terai *et al.* 1999). L'OPN est également surexprimée dans les sutures sagittales de calvaria de souris soumises à une contrainte de tension. Ainsi, la présence ou l'induction d'OPN en réponse à la contrainte

mécanique seraient nécessaire pour la formation osseuse complète en réponse à une force de tension (Morinobu *et al.* 2003). Plus récemment, il a été montré que le chargement cyclique des articulations d'un lapin induit une augmentation de l'expression d'OPN cellulaire par le cartilage (King *et al.* 2005). Cette régulation positive en réponse à une contrainte mécanique a également été montrée dans des cultures *in vitro* (Klein-Nulend *et al.* 1997, Owan *et al.* 1997, You *et al.* 2001). Enfin, les souris KO pour l'OPN n'ont ni stimulation de résorption osseuse ni suppression de formation osseuse lorsqu'elles sont soumises à des expériences de suspension par la queue (Ishijima *et al.* 2001, Ishijima *et al.* 2002). Au contraire, les souris KO pour la BSP perdent de l'os dans ces conditions, tout comme les souris sauvages (Malaval *et al.* 2008).

La **BSP** est aussi un gène de réponse rapide aux contraintes mécaniques (Carvalho *et al.* 2002). Une étude *in vivo* a montré que l'expression de l'ARNm de la BSP augmente dans les zones de tension lors des mouvements de dents de rongeurs (Domon *et al.* 2001). Des résultats similaires ont été montrés plus récemment *in vitro* après application d'une force de compression (Mitsui *et al.* 2005).

L'expression de **DMP1** augmente en réponse à la charge mécanique dans les ostéocytes de l'os alvéolaire (modèle de mouvement de dents) (Gluhak-Heinrich *et al.* 2003) ainsi que dans l'ulna de souris (Harris *et al.* 2007). L'étude simultanée de **MEPE** et DMP1, lors de charges mécaniques précoce et tardive de l'os alvéolaire, a mis en évidence une différence de régulation entre ces deux protéines. En effet, après une diminution initiale de l'expression de MEPE, les niveaux d'ARN et de protéines augmentent dans les ostéocytes enchâssés dans l'os. Après quoi, ces niveaux diminuent alors que l'expression de DMP1 reste élevée (Gluhak-Heinrich *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que les produits des gènes MEPE et DMP1 peuvent avoir des rôles coordonnés mais distincts dans la réponse des ostéocytes aux contraintes, peut être pour moduler la minéralisation de la lacune ostéocytaire et de l'os environnant.

Une étude récente suggère que MEPE pourrait être un des facteurs produits en réponse à la contrainte mécanique par les ostéocytes et modulant l'ostéoclastogenèse et l'activité des ostéoclastes. Aussi, la contrainte mécanique induit une régulation positive de l'expression de MEPE supérieur à celle de PHEX. Si, comme attendu, ce changement se reflète au niveau protéique, MEPE doit être plus disponible pour être clivé par la cathepsine B. Ainsi, plus de peptides ASARM seront produits provoquant alors une régulation positive d'OPG (Kulkarni *et al.* 2010). Cette hypothèse pose problème car l'augmentation de la production de peptides ASARM devrait inhiber la minéralisation, ce qui n'est pas observé sous contrainte mécanique ! D'autres boucles de régulation doivent être mises en jeu et ne sont pas discutées dans cet article.



La sclérostine, un puissant inhibiteur de la voie Wnt, a été clairement identifié comme un élément essentiel de la mécanotransduction. Parmi les cellules osseuses, elle est exprimée presque exclusivement dans les ostéocytes qui, comme nous l'avons expliqué précédemment sont des mécano-senseurs initiant la signalisation mécanique. Les travaux de Robling et al. suggèrent que les ostéocytes coordonnent la réponse ostéogénique aux contraintes mécaniques en régulant négativement la sclérostine et déclenchant ainsi la voie de signalisation Wnt (Robling and Turner 2002, Robling *et al.* 2008). Des travaux récents montrent que la **sclérostine** peut agir par l'axe MEPE-PHEX (Atkins *et al.* 2011), (*Figure 18*) et ainsi affecter directement la **biominéralisation**. Dans ce modèle, les stimuli anti-anaboliques, comme la décharge mécanique mais aussi des cytokines proinflammatoires, induisent l'expression de la sclérostine par les ostéocytes. Celle-ci agit ensuite sur les ostéoblastes/préostéocytes en stimulant l'expression de MEPE qui est clivé par la cathepsine B et libère ainsi le peptide ASARM phosphorylé. L'endopeptidase membranaire PHEX contrecarre cette action en inhibant le clivage de MEPE et en dégradant le peptide ASARM phosphorylé. La sclérostine réduit aussi l'expression de PHEX, bloquant ainsi son action. L'inhibition de la minéralisation par la sclérostine s'accompagne d'un blocage de la transition ostéoblaste/préostéocyte en ostéocyte mature (Atkins *et al.* 2011). Des études futures devraient mettre l'accent sur les interactions entre MEPE et la voie Wnt du fait de leurs implications connues dans la **mécanobiologie** de l'os et du cartilage.

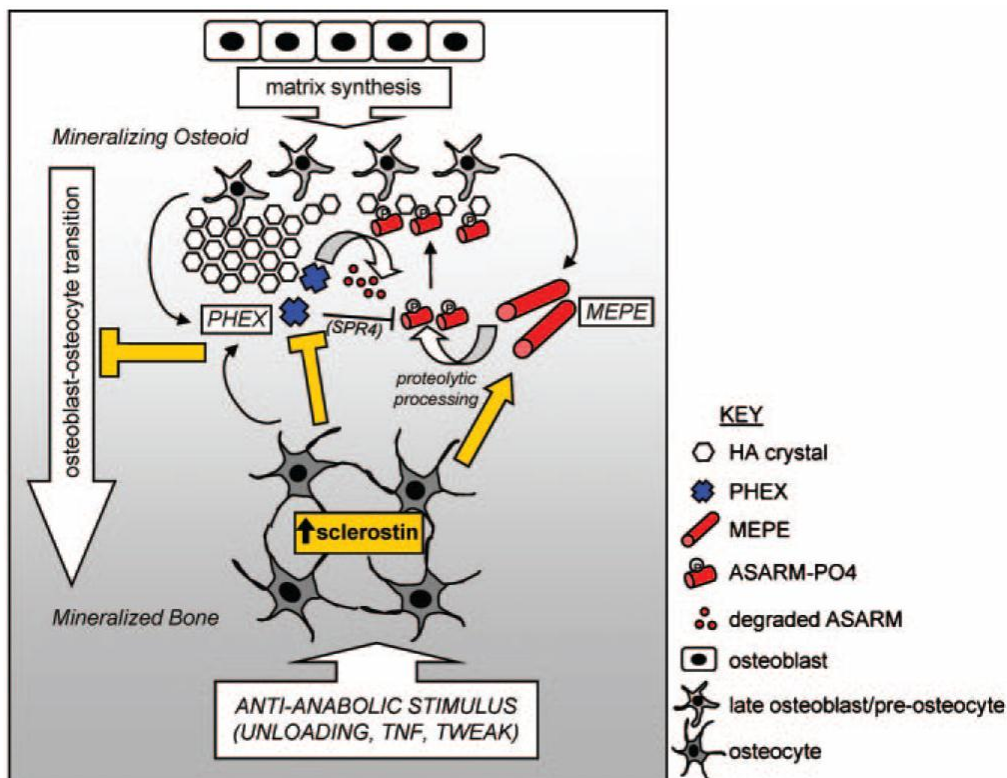


Figure 18. Schéma représentant le rôle de la sclérostine dans la régulation de la minéralisation osseuse.

Flèche jaune : stimulation de l'expression de MEPE ; barre jaune : inhibition de l'expression de PHEX et de la transition ostéoblaste/ostéocyte. (Atkins *et al.* 2011)

Toutes ces études soulignent le **rôle des SIBLING dans la réponse mécanotransductive des ostéocytes à la contrainte mécanique.**

#### B.4. BSP, ostéoblastes et ostéogénèse

##### *B.4.1. La BSP dans le modelage et le remodelage osseux*

Une étude de notre laboratoire (Wade-Gueye *et al.* 2012) a utilisé un modèle *in vivo* de modelage, dans lequel **l'ablation médullaire** du fémur de souris BSP-/- et +/- induit la formation transitoire d'un os primaire dans la cavité médullaire, puis sa résorption rapide (~15 jours pour l'ensemble du cycle). L'étude a montré que la formation osseuse était bien plus faible chez les souris BSP-/- comparées aux sauvages, et que ceci était corrélé à un défaut de différenciation terminale des ostéoblastes. Néanmoins, la masse trabéculaire osseuse fémorale est similaire chez les nouveaux nés BSP+/+ et -/-, et le développement endochondral apparaît normal et non retardé chez les mutants. Une hypothèse est que les conditions environnementales de l'ossification endochondrale fournissent un ou des facteurs « vicariants », qui compensent l'absence de la BSP et assurent une activité ostéoclastique, ce qui pourrait aussi expliquer que la faible activité basale de remodelage des souris BSP-/- puisse être stimulée dans la mise en décharge (Malaval *et al.* 2008) après ovariectomie ou sous traitement intermittent par la PTH (Boudiffa *et al.* 2010). Ces facteurs pourraient être une ou plusieurs autres SIBLING, l'OPN étant un candidat évident.

L'absence de **BSP affecte donc le modelage comme le remodelage osseux** L'impact de la mutation sur le modelage semblant plus intense, et moins susceptible de compensation, car un traitement des souris ablatées par la PTH intermittente, qui accroît et stabilise l'os médullaire des souris sauvages, n'a pas cet effet sur les mutants (Wade-Gueye *et al.* 2012).

##### *B.4.2. BSP et ostéoclastes*

Le nombre d'ostéoclastes différenciés en cultures de cellules spléniques ou de moelle osseuse est diminué chez les souris KO BSP par rapport aux sauvages, mais leur activité de résorption sur de la dentine (qui contient de la BSP) n'est pas affectée. Par contre, sur substrat minéralisé artificiel (sans BSP), la prolifération des précurseurs (cultures spléniques) et la différenciation, ainsi que la motilité et l'activité de résorption des ostéoclastes BSP-/- est diminuées. En outre, ces cellules ont un spectre d'expression phénotypique distinct de celui des ostéoclastes BSP+/+. Le déficit de résorption explique le phénotype à volume trabéculaire élevé observé chez les souris mutantes adultes (Boudiffa *et al.* 2010). Le faible nombre d'ostéoclastes généré en absence de BSP ainsi que leur faible activité peuvent aussi

expliquer l'hypocalcémie accompagnée d'une discrète hyperparathyroïdie secondaire observées chez les souris BSP<sup>-/-</sup> adultes (Malaval *et al.* 2008). De façon intéressante, l'étude de Valverde *et al.* (Valverde *et al.* 2008) est en adéquation avec ces résultats. En effet, ils ont montré que dans des souris qui surexpriment la BSP, les ostéoclastes sont plus nombreux avec une activité accrue par rapport aux sauvages. Ces souris présentent également une hypercalcémie et une hypoparathyroïdie secondaire. L'apport exogène d'**OPN** peut contrecarrer une partie des effets de la mutation sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes suggérant un certain degré de **redondance/complémentarité** entre la BSP et l'OPN (Boudiffa *et al.* 2010). Une telle complémentarité pourrait expliquer le fait que la mise en défis hormonaux (PTH, ovariectomie) ou gravitaires (suspension par la queue) des souris BSP<sup>-/-</sup> réactive la résorption et stimule le remodelage *in vivo* (Malaval *et al.* 2008, Wade-Gueye *et al.* 2010).

L'addition exogène de BSP recombinante ne permet cependant pas de compenser l'absence de BSP sur l'engagement des progéniteurs de la voie ostéoclastique. Outre l'hypothèse que la protéine BSP endogène soit requise pour cette étape, il est également possible que l'absence, dans la protéine recombinante utilisée, de modifications post-traductionnelles en soit la cause (Boudiffa *et al.* 2010).

#### *B.4.3. La BSP dans différenciation ostéoblastique*

La présence de la **BSP** dans la matrice collagénique semble être mitogénique pour les pré-ostéoblastes et favoriserait leur différenciation en ostéoblastes (Zhou *et al.* 1995, Xu *et al.* 2007). *In vitro*, le schéma d'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  coïncide spatialement et temporellement avec celui de la BSP, impliquant cette protéine dans la signalisation modulant l'adhésion itérative qui a lieu lors de la différenciation ostéoblastique (Schneider *et al.* 1999). D'autre part, la surexpression *in vitro* de la BSP dans des cultures ostéoblastiques primaires augmente l'expression de plusieurs marqueurs ostéoblastiques ainsi que la minéralisation de la matrice (Gordon *et al.* 2007). De plus, cette équipe a montré que cet effet de la BSP sur la différenciation ostéoblastique et la minéralisation passe par une voie de signalisation médiée par l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Gordon *et al.* 2009). L'étude des souris surexprimant la BSP confirment également ces résultats (Valverde *et al.* 2008).

Dans des cultures *in vitro* de moelle osseuse de souris BSP<sup>-/-</sup>, le nombre de colonies fibroblastiques (« Colony Forming Units-Fibroblasts » : CFU-F) préostéoblastiques (« Colony Forming Units – Alkaline Phosphatase » : CFU-ALP) comptées n'est pas affecté par la mutation, mais le nombre de colonies minéralisées (ostéoblastiques : CFU-OB) qui est formé est plus petit (*Figure 19*). Ces données suggèrent que la mutation affecte spécifiquement la différenciation terminale des ostéoblastes, et pas le recrutement des progéniteurs mésenchymateux (CFU-F), ni leur engagement dans la voie ostéoblastique (CFU-ALP).

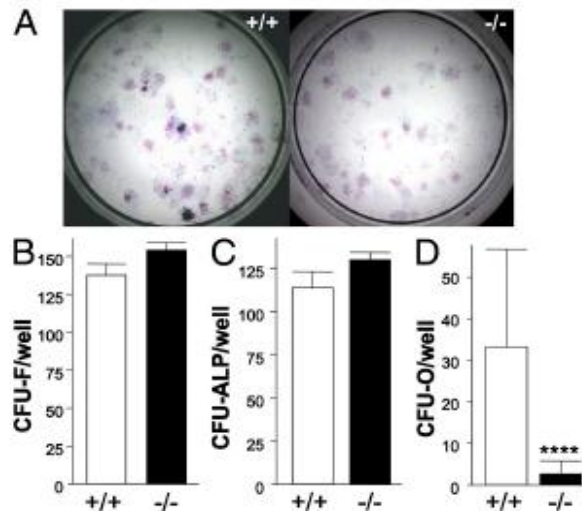


Figure 19. Analyse *in vitro* de la différenciation et de l'activité des ostéoblastes en cultures de cellules  $BSP^{+/+}$  et  $BSP^{-/-}$ .

Visualisation (A) et quantification des colonies fibroblastiques (CFU-F; B), exprimant la PAL (CFU-ALP; C) et minéralisées = ostéoblastiques (CFU-O; D) obtenues à partir de culture de moelle de souris  $BSP^{+/+}$  et  $BSP^{-/-}$ . (Malaval et al. 2008)

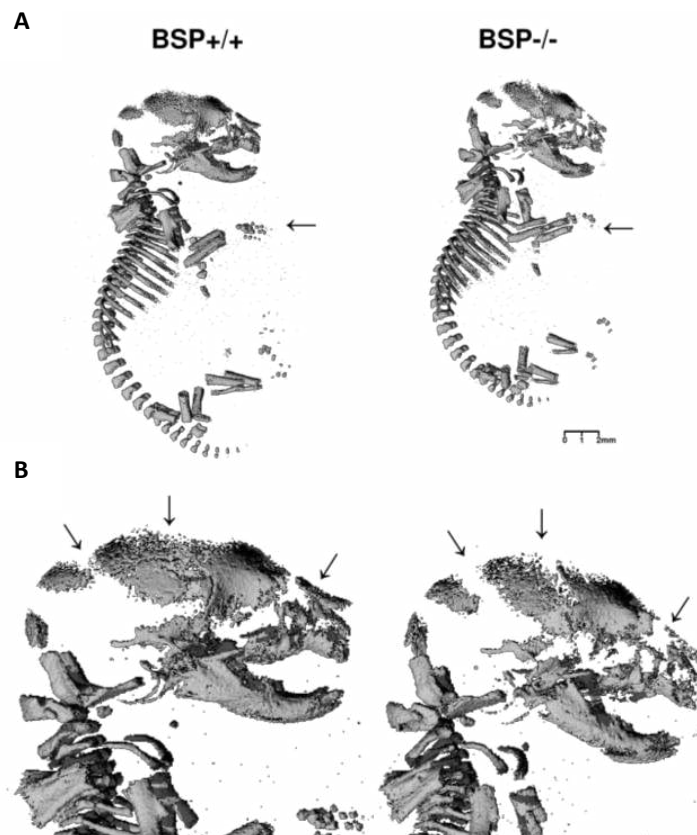


Figure 20. Morphologie générale des nouveau-nés  $BSP^{+/+}$  et  $BSP^{-/-}$ .

(A) Reconstruction 3D au  $\mu$ CT des nouveau-nés +/+ et -/- entier, montrant des phalanges hypominéralisées (flèches) et (B) for grossissement des têtes montrant les sutures crâniennes élargies (flèches). (Bouleftour, Boudiffa et al. en préparation)

La corticale des os longs des nouveaux nés BSP-/- est plus fine que celle des sauvages, et leurs phalanges ne sont pas visibles, tandis que les sutures crâniennes sont bien plus larges (

Figure 20). Ceci indique un retard d'ossification et/ou de minéralisation lors de développement des mutants. La finesse des calvaria et la plus grande largeur des sutures crâniennes indiquent que la BSP joue donc également un rôle important dans la formation osseuse membranaire. Parce que les cultures de cellules de calvaria offrent un modèle plus simple d'étude des cellules osseuses que les cultures de moelle, surtout *in vitro* (rendement plus élevé de la collecte de cellules, population moins riche en types cellulaires donc modèle moins complexe), nous avons analysé la capacité des cellules de calvaria de souris BSP-/- à réaliser une ostéogénèse *in vitro*. Les résultats de ce travail seront présentés dans la [partie A du 3<sup>ème</sup> chapitre](#) de ce manuscrit.

**Ces travaux *in vitro*, comme ceux décrits dans les articles cités, ont été réalisées dans des boîtes de culture et donc en 2D, un modèle que l'on peut difficilement rapprocher des expériences et du contexte *in vivo*. Afin de palier les limitations de cette approche et de se rapprocher au maximum de l'environnement cellulaire *in vivo*, les modèles de culture en 3D sont d'un grand intérêt, comme nous allons le voir dans la partie suivante.**

## **C. Vers l'os in vitro**

Cette section reprend le texte d'une revue intitulée :

### ***Tissue engineering strategies for experimental approaches: in vitro bone tissue***

Guénaëlle Bouët<sup>1</sup>, David Marchat<sup>2</sup>, Luc Malaval<sup>1</sup>, Laurence Vico<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1059, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143-IFRESIS, 15 rue Ambroise Paré, F-42023 St-Etienne Cedex 2, France

<sup>2</sup> Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, CNR:FRE3312, F-42023 158 cours Fauriel Saint-Etienne cedex 2, France

qui a été soumise au journal ***Tissue Engineering***.

## C.1. Context

### C.1.1. Tissue Engineering: concepts

Tissue engineering is the application of the principles of biology and engineering to the development of functional substitutes for damaged tissues [1]. It utilises specific combinations of cells, matrices (or “scaffolds”) as well as cellular, chemical and mechanical signals. Generally speaking, current applications of tissue engineering can be divided into two categories.

The first category consists of developing elaborating artificial living tissues as manufactured products. This therapeutic approach aims to replace human tissues with an artificial tissue substitute. This field is quickly expanding due to coordinated and converging technological developments in the creation and/or manipulation of biomolecules, biological materials, cells and tissues, with the goal of ultimately generating pseudo-tissues and organs for transplant. Such therapy will be drastically different from classical prosthesis implants, avoiding integration, interface and wearing-out problems, thus allowing for a longer lived tissue/organ substitution.

The second category of applications of tissue engineering extends beyond therapeutic implants, towards the creation of *in vitro* physiological models of human tissues. Within organs, cells reside in a complex three dimensional (3D) micro-environment, encompassing multiple cell types among extracellular matrix (ECM) and producing/exchanging many signals. Paradoxically, the majority of our knowledge of cell physiology comes from *in vitro* experiments with mono-cultures adherent to a plastic substrate. Adding a new spatial dimension is essential in order to understand the fundamental aspects of cells working *in vivo*. New 3D controlled systems based on tissue engineering principles strive to reproduce the actual environment of the cells in a living organism, as well as facilitate the study cellular organisation, behaviour and responses in real time.

### C.1.2. Organ repair versus *in vitro* model: a comparison

The specifications of an artificial construct developed either for clinical implantation or as a model for *in vitro* experimentation are distinct. In the first case, requirements include ease of use, adapted biological and mechanical properties of the scaffold, appropriate cell seeding (*e.g.* with autologous cell populations), an *ex vivo* culture time as short as possible, all this respecting the safety conditions imposed by the legislation. Indeed, artificial constructs are regarded as medical devices and, therefore, must follow stringent “good manufacturing practice” (GMP) and be approved by regulatory organisations, such as the FDA and European Medical Agency. GMP encompasses all aspects of production, from product quality to the tests required for product homologation (ISO standards, etc.). Development of 3D *in vitro* models is not subjected to such constrains. However, they require a redefinition of the standard cell culture methods applied in 2D on plastic substrates. Thus, the hardware

requirements for organ repair or 3D *in vitro* models will be distinct with shared element related in particular to 3D culture and perfusion problems

When used as experimental tools, *in vitro* 3D models can be progressively complicated (*i.e.* integrating several interacting cell types). Such complex models can be used to study paracrine regulation, test the effects of physicochemical substances or characterise stimuli acting locally on cell metabolism. Also, the use by the cosmetic industry of human skin cell cultures to test the effectiveness and toxicity of products reduces the need for animal experiments [2]. The development of such alternative methods follows the 76/768/CEE directive of the European Community (July 27th, 1976), which was recently replaced in 2013 by European Union (EU) regulation n° 1223/2009 that prohibits the use of animals for assessing the safety of cosmetics and ingredients. Another example of the use of *in vitro* 3D cultures is the reconstitution of bronchial tissue to study the response of bronchi to damaging compounds or disease situations, such as asthma [3] or cystic fibrosis. The knowledge gained from such experiments will advance our understanding of pathophysiology as well as the prevention, diagnosis and treatment of diseases.

As mentioned previously, scientists are able to create artificial skin, which can be used for treatment of severe burns. Such artificial skin is still a simple model comprised of a fibroblastic dermis and an epidermis primarily composed of keratinocytes. Unfortunately, no research group has yet to successfully integrate sudoriferous pores, mechanoreceptors or pain receptors into these cutaneous models [4]. Nonetheless, cutaneous equivalents have made it possible to carry out a large number of physiological, pathological and pharmacological studies on the *in vitro* behaviour of skin cells, including biological exchanges between the dermis and epidermis, cutaneous immunology, skin diseases, the cicatrisation process, and the effects of various medications or cosmetics [5].

Another major challenge of tissue engineering relates to mineralised tissues. Bone substitutes have been developed for implantation into mandibular [6] or hand bones [7]. However, in highly loaded sites, such as the proximal femur, it is necessary to use plates (osteosynthesis) and/or prostheses in order to maintain the supporting functions of the bone. A cellularized bone substitute that could be gradually replaced by new living tissue would be ideal. Therapeutic bone tissue engineering studies have begun to generate promising results (for review [8]), but many issues remain. Implant vascularisation is still a challenge, particularly during regeneration after large bone defects. Efficacy of artificial bone construction is dependent on oxygen and nutrient exchange kinetics, as well as waste disposal through blood vessels. Moreover, the ideal implant within which bone formation would compensate for scaffold resorption still remains to be developed.

### *C.1.3. The missing link: from cell culture to tissue culture*

Within tissues, the extracellular environment determines important aspects of cell physiology. Indeed, the ECM provides a substrate for cell attachment and signaling molecules. These biochemical cues provide “instructions” that regulate tissue formation. In



the same manner, mechanical cues provide signals that dictate cell behavior. Mechanical stimuli are particularly important for musculoskeletal tissues. The process of bone remodeling is controlled through mechanotransduction, which is defined as a set of cellular mechanisms that convert mechanical stimuli into biochemical signals [9]. Tissue development and remodeling in living organisms are orchestrated by cascades of regulatory factors interacting at multiple levels, in both time and space.

Animal models provide the full complexity of biological systems (at least within a given species), but they offer limited control of the local environment and scanty real time information. In contrast, traditional cell culture in 2 dimensions (2D) allows significant control of the cellular environment and a direct access to cellular processes. Indeed, most of our knowledge of cell physiology is derived from experiments carried out *in vitro* in 2D cell cultures on polystyrene substrates. However, these present with the opposite problem to studies carried out in animals: the models are drastically simplified and hardly reproduce the typical environment in the organ/organism, in which cells develop as a 3D structure. In a handful of 2D models, cells recreate a very limited 3D tissue environment. For instance, in osteoblastic colonies grown in rat or mouse calvaria cell cultures, osteoblasts lay down a mineral-bearing matrix, embedding osteocytes [10, 11].

It is well established that signal transduction and many other cellular functions differ between 2D and 3D culture conditions [12-14]. These differences are expected since on 2D substrates the cells have to adapt to an artificial flat and rigid surface [15]. In comparison, 3D systems are more representative of *in vivo* conditions, in which several cellular types interact in a complex and dynamic fashion with the extracellular matrix [16, 17].

Thus, the goal is to reproduce complex *in vivo* biological phenomena through *in vitro* 3D models of lower complexity. Ultimately, 3D systems may facilitate understanding of structure-function relationships under normal and pathological conditions. Moreover, they will also provide tools for assessing drugs in development in toxicology or pharmacology studies.

The development and follow-up of such controlled and constrained systems requires a multidisciplinary knowledge, relying on close collaboration between researchers specialising in biology (molecular and cellular), engineering, physicochemistry and mechanics (of solid and fluid matter). Another important issue is the development of mathematical models and biostatistical tools capable of predicting the outcome of cell bioprocesses. Here, we provide an overview of the main know-how on 3D “bone-like” cultures involving one or more cell types seeded on macroporous biomaterials and grown in bioreactors. In particular, the many technological issues relating to bone tissue that have yet to be resolved are discussed.

## C.2. Bioreactors

### C.2.1. *Definition*

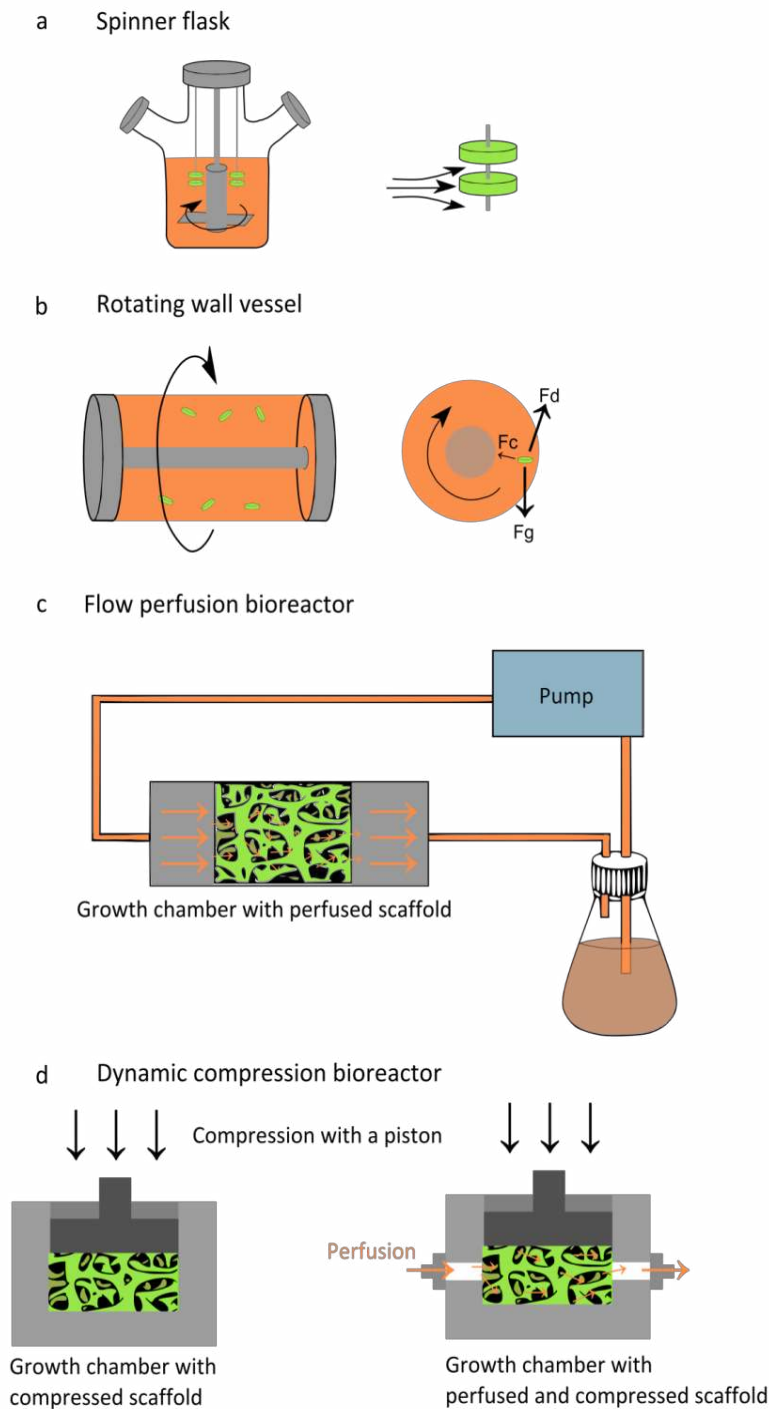
A bioreactor is a device used for the culture of biological samples in 3D scaffolds of variable geometry under controlled conditions (culture medium, atmosphere, etc). Typically, one or more cell types are seeded in 3D substrates of various compositions, suspended in stirred culture medium and then connected to a circulation system (*Figure 1*). Such systems ensure a more or less rapid medium replacement within the samples. Bioreactors must provide control of many culture parameters, such as pH, temperature, pressure, nutrient supply and waste elimination, throughout the course of *in vitro* tissue growth.

Bioreactors have been shown to improve the efficiency of cell seeding within macroporous structures [18-20], as well as cellular proliferation [21-24] and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [25-28]. Besides stimulating cell proliferation and differentiation, bioreactors also minimise the risk of bacterial contamination due to automation of the culture process. “Spinner flasks”, “rotating wall vessels” and perfused systems are among the most common bioreactor configurations (*Figure 1*).

Spinner flasks, which are simple devices, are often used to generate biomass. The seeded scaffolds are fixed by a needle, and shear stress is generated by stirring [29].

A rotating wall vessel is recommended by NASA as a surrogate for microgravity because it maintains the cells in a gravitational lure, which could reproduce some effects of space flight while generating low fluid-induced shear stress [30].

While both devices are efficient to homogenise the culture medium outside of the culture scaffolds, they do not perfuse these properly. In attempts to address this problem, other bioreactors use a pump system that allows circulation of medium through the scaffolds. Based on such design, the culture medium can either flow in the same direction or in alternate directions, at various speeds.



**Figure 1.** Different types of bioreactors.

(a) *Spinner flask.* Consisting of a medium-sized flask with side caps to manipulate the scaffolds and a porous lid for gas exchange, seeded scaffolds are attached to holders and immersed in medium. A magnetic bar stirs the culture medium, ensuring mass transfer between the scaffolds and their environment. (b) *Rotating wall vessel.* Composed of two concentric cylinders, the inside cylinder is static, open to the atmosphere and limited by a porous membrane, which allows gas exchange. The external cylinder is waterproof and rotation is controlled around a horizontal axis. The space between the two cylinders is filled with culture medium and cell supports are kept in suspension. These are often cell-seeded beads that aggregate to become 3D structures. When the rotation speed

*compensates for sedimentation without generating centrifugal force, the aggregates will rotate along the same stable orbit. (c) Flow perfusion bioreactor. Basic designs include a medium tank, pumps and a tubing system that feeds the culture chamber. The culture medium is forced through the internal interconnected porous network of the seeded scaffold. This can override diffusion limitations and enhance nutrient delivery and waste removal from the cultured cells. (d) Dynamic compression bioreactor. The marketed system from Bose® [261], the Zetos™ system [84] or more artisanal ones [262] allow the application of controlled dynamic pressure to the scaffolds, thus mimicking the mechanical environment of the bone tissue [79].*

### C.2.2. Why perfuse bioreactors?

#### C.2.2.1. Controlling the chemical environment

As described in further detail in Section 4.2 below, culture conditions and especially chemical composition of the environment influence cell viability and behaviour. Among the basic nutrients present in culture medium, oxygen is often depleted the fastest due to its low solubility. Within bone, most cells are found no further than 73–115  $\mu\text{m}$  [31] from the nearest blood capillary, equivalent to 4 to 6 cell diameters according to Chow et al. [32], taking the average cell diameter as 18  $\mu\text{m}$  in a bone marrow almost devoid of adipocytes. This distance is consistent with a model of  $\text{pO}_2$  (oxygen partial pressure) distribution based on a cylindrical central vessel supplying a concentric area of tissue in the bone marrow [33]. Such spacing would provide sufficient diffusion of oxygen, nutrients, and waste products to support and maintain viable tissue.

Tissue constructs which are simply immersed in culture medium (*i.e.* in spinner flasks or rotating wall vessels) are subjected to different conditions on the outside (maximum cell-medium exchange occurs) compared to the inside, where diffusion is limited or even absent. Such culture conditions result in cell growth and matrix production confined within a  $\approx 100$   $\mu\text{m}$  thick outer layer [29], which can quickly form a tissue capsule, further limiting penetration of culture medium inside the construct [34, 35]. To solve this problem, the entire construct can be perfused continuously or dynamically with culture medium to supply oxygen and nutrients to the inner cells via both diffusion and convection, as in native tissues [36–38]. Furthermore, perfusion bioreactors prevent cellular overgrowth outside the scaffold and help maintain a homogenous cell distribution within the scaffold. The perfusion fluid path must be confined in order to ensure that the flow goes entirely through the scaffold and not around the edges. So, a flow perfusion bioreactor provides enhanced delivery of nutrients within the interconnected porous network of the seeded scaffold by mitigating both external and internal diffusion limitations. Moreover, this system can be used for seeding the scaffold as described in Section 4.1.

### C.2.2.2. Controlling mechanical stimulation

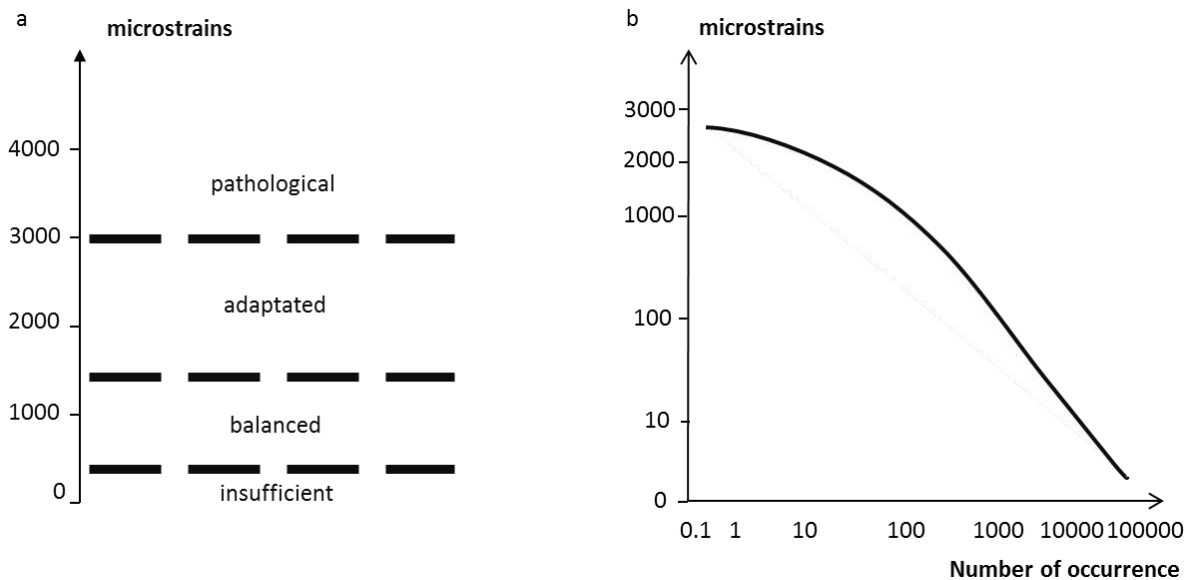
The architecture of bone tissue constantly undergoes alteration [39, 40]. Bone remodelling is induced and controlled by endogenous and exogenous factors. It is well known that variations in mechanical stress affect bone cell lineage commitment and activity, determining the microarchitecture and quality of the bone tissue and ultimately resistance to fracture. Thus, at the tissue level, sufficient physical activity will increase bone mass and/or improve the trabecular architecture and the cortical mass of solicited skeletal pieces. These modifications result from an increase in bone formation and/or a reduction in bone resorption. Conversely, lower mechanical constraints will induce bone loss, reflecting a reduction in bone formation and/or stimulation of bone resorption [41, 42]. It should be noted that bone gain is obtained only through dynamic (cyclic) mechanical signals or static signals (constant), eliciting no tissue response [43-45]. Dynamic mechanical constraints are osteogenic within a range of load intensities, beyond and below which tissue responses are different [46]. Bone will therefore adapt its mechanical properties based on mechanical use. Thus, “insufficient” loading is associated with bone loss during immobilisation, “balanced” loading with bone maintenance under normal use, “adapted” loading with gain in bone mass and strength, and “pathological” loading with risk of fracture when strain exceeds the maximum elastic deformation. This control mechanism was first referred to as “mechanostat” by Harold Frost [39]. The mechanostat theory describes several windows of adaptation, according to the levels of mechanical constraint on the bone tissue (*Figure 2a*). More recently, it has been shown that during normal activity, such as walking, which is known to be osteogenic, bone is naturally subjected to compression with high amplitude/low frequency strain and low-amplitude/high-frequency strain [47, 48]. *In vivo* experiments over the course of a day using strain gauges in different species, including humans, have shown that weight bearing bones experience large strains over 1000 microstrains ( $\mu\epsilon$ , deformation per unit of the original length) only a few times, while small strains of less than 10  $\mu\epsilon$  occur thousands of times (*Figure 2b*).

The adaptive mechanism that underlies the mechanostat is the mechanotransduction. The first aspect of mechanotransduction is the integration by the cells of extracellular stress parameters, that is their reception, the activation of signaling pathways and the transmission to the effectors. The second aspect is the translation of these mechanical clues in terms of survival, proliferation and/or activity of these cells ([49] for review).

When a scaffold is mechanically stressed, as in the skeleton, individual cells are not subjected to a single force. Rather, multiple physical signals are generated simultaneously. Consequently, there is no single parameter in the mechanical environment that reliably predicts bone remodeling *in vivo* or under experimental conditions [50].

*In vitro* 3D cell culture under prolonged mechanical stress will thus attempt to reproduce as best as possible the temporal, spatial and contextual experience of bone cells in the living skeleton. In 3D models, two types of mechanical stress can be generated and studied: compressive stress resulting from mechanical solicitation and shear stress imposed by

convective flow (*i.e.* mass-transport through perfusion and scaffold deformation, see Section 3.3 [51]).



**Figure 2.** Strain history of bone. (a) The Frost mechanostat hypothesis defines thresholds based on bone microstrains : “insufficient” bone strains (below 100–300  $\mu\epsilon$ ) results in bone loss, “balanced” strain (300–1500  $\mu\epsilon$ ) results in bone maintenance, “adaptated” strain (1500–3000  $\mu\epsilon$ ) results in lamellar bone gain, and “pathological” strain (above 3000  $\mu\epsilon$ ) results in woven bone, micro damage or fracture (adapted from [39, 263, 264]). (b) Log-log plots of bone strain magnitude versus occurrences rate during daily cyclic events (corresponding to the strain signal between 2 successive minima recorded in vivo from the tibia of sheep, turkey and dog), showing that greatest magnitude strains (approximately 1000  $\mu\epsilon$ ) occur relatively infrequently, while very small strains (few microstrain) occur many times a day (adapted from [47]).

#### C.2.2.2.1. Fluid flow effects : shear stress

Shear stress has been particularly well-studied in endothelial cells. A culture model of these cells under controlled pressure, flow, compression and shear in normal and pathological conditions was recently developed [52]. It is assumed that *in vivo* mechanical stimuli are mainly transmitted to bone cells via shear stress, that is to say forces whose vector is parallel to the cell surface [53]. Bone tissue includes a significant fraction of interstitial fluid surrounding all cells. Movements of this fluid are induced by two different processes: an “internal” one, which is the differential pressure within the circulatory system [54, 55], and an “external” one consisting in the mechanical loads applied to the skeleton [56]. Whenever a mechanical load is applied to bone, interstitial fluid is forced out of the areas of high compressive deformation, but flows back when the load is removed. Thus, the fluid flow generates an oscillating shear stress that one specific type of bone cell, the osteocyte, is sensitive. The canalicular network around the osteocytes allows communication between

osteoblasts and osteoprogenitor cells. Theoretical models predict that, in response to mechanical stress, bone cells are exposed to a shear stress induced by interstitial fluid flows in the order of 8 to 30 dyn/cm<sup>2</sup> (i.e. 0.8 to 3 Pa) *in vivo* [57]. Apart from osteocytes, osteoblasts, mesenchymal stem cells (MSCs) [58-61] and osteoclasts [62] may respond to shear stress. In addition, any fluid flow resulting from periodic loading of the bone tissue, such as during physical activity, displays a profile that is both dynamic and oscillating.

In addition to overcoming poor nutrient and waste exchange associated with static culture conditions [35, 63], thus improving construct homogeneity and viability [34, 58, 64], culture in a flow perfusion bioreactor provides a convenient way to mechanically stimulate cells seeded in the scaffold through fluid shear stress [53, 65]. Thus, flow perfusion bioreactors provide benefits beyond those offered by stirred bioreactor systems, such as the spinner flask. Indeed, fluid flow (shear stress) has been shown to enhance bone formation activity by osteoblasts in a scaffold for tissue engineering [58, 64, 66, 67] and stimulate expression of bone-specific genes [68]. Unidirectional steady flow, commonly used in clinical studies [25, 58, 64, 69, 70], has been shown to have many biological effects on bone marrow stromal osteoblasts seeded in 3D scaffolds, such as enhancement of osteogenic differentiation [71] and increased production of mineralised matrix [58, 72]. However, since bone cells are primarily stimulated *in vivo* via intermittent mechanical loading [73, 74], this parameter is likely to be crucial for stimulating bone formation and enhancing the quality of bone tissue laid by osteoblast [75]. Other studies revealed a favorable effect on bone tissue formation of intermittent unidirectional flow [76] and also an increase in bone formation by osteoblasts in a 3D scaffold with oscillatory fluid flow [67, 77]. A recent study [78] showed that sequential application of steady (for 2 weeks) and intermittent (for 3 weeks) fluid flow promotes bone formation by human adipose stem cells cultivated on porous 3D silk fibroin scaffolds. These results suggest a mechanism detecting and responding to the level and duration of shear stress induced by fluid flow.

The amount of shear stress experienced by cells cultured in a flow perfusion system varies based on the flow rates. Thus, the local shear stress felt by individual cells depends on the scaffold architecture (see Section 3), as well as the flow rate used throughout the perfusion-seeding [18, 19].

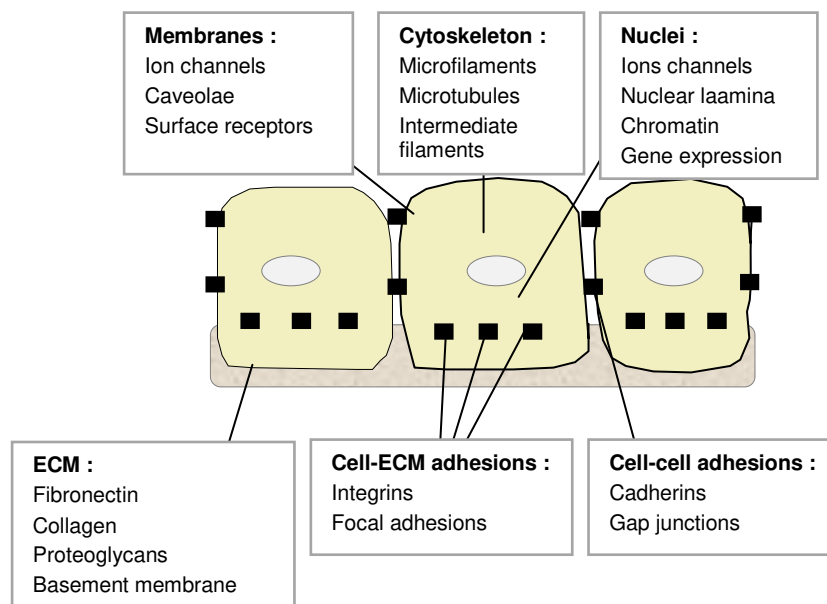
It remains unclear which flow profile is optimal for stimulating osteoblasts on a 3D scaffold, and a comprehensive evaluation of how flow profile regulates osteoblast activity and sensitivity in a 3D scaffold is lacking. Such evaluation is vital to the optimisation of bioreactor culture conditions, and can be done using predictive tools, such as mathematical modeling, rather than trial-and-error, as discussed in the Section 5.

#### C.2.2.2.2. *Effects of macroscopic mechanical loading*

As mentioned earlier, shear stress may be induced by high perfusion rate alone or external mechanical stress applied to specially designed culture chambers [79-83] (*Figure 1d*). In the latter case, it is possible to mimic the skeletal effects of physical activity in the 3D culture, which is not possible with other types of bioreactors. A perfused bioreactor, adapted to the

Zetos™ system [84], has been recently validated to apply compression stresses on HA/TCP scaffolds [83]. In addition to inducing fluid flow shear stress, mechanical loads generate substrate deformations, more or less extensive depending on the properties of the scaffold. These deformations are then experienced by the cells, through the ECM or directly through changes in cell shape or intercellular distances. Substrate elongation or compression can directly modify extracellular gradients, cell-cell communication or local concentrations of secreted ligands. Among the many types of mechanical stress applied to stimulate bone cells, it has been shown that compressive strain of approximately 10% (amounting to a stress of  $\approx 12$  kPa) are osteogenic [85].

At the cellular level, mechanical load (deformation) and shear stress act through multiple signaling pathways to stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts [61, 86-96]. Many molecules, cellular components and extracellular structures contribute to mechanotransduction (*Figure 3*). These components of the transduction chain include the ECM, ECM-cell and cell-cell adhesions, membrane transducers (including receptors or adhesion proteins) and intracellular transducer molecule (*e.g.* cyto- and nuclear-skeletal structural or linker proteins). Within cells, the mechanotransduction chain regulates the cytoskeleton, particularly through activation of Rho-GTPases by transmembrane molecules, such as integrins. Among membrane proteins, various receptors, including ion channels, are also involved in mechanotransduction [97, 98]. Integration of mechanical signals at the cellular level results in a chain of responses, starting with modifications of the pericellular environment and culminating in changes of whole tissue metabolism.



**Figure 3.** The interaction of different factors involved in mechanotransduction at the cellular, extracellular and matrix level.



### C.3. Scaffold

#### C.3.1. Objective of using scaffolds

As mentioned previously, *in vitro* bone development requires 3D organisation to simulate the structure, mechanical properties (*i.e.* stiffness and strength), composition as well as regulatory cues of the natural ECM [99-102]. 3D artificial models may provide robust spatial and temporal monitoring of biophysical, biochemical and mechanical microenvironmental cues; this monitoring is unavailable *in vivo* [102-104]. As such, they are crucial tools for identifying regulators and pathways of bone cell behaviour (*e.g.* adhesion, growth, differentiation, survival, morphogenesis) and fate.

#### C.3.2. Ideal scaffold properties

Scaffolds specifications for bone therapeutic applications are well-described in literature [104-111]. Ideally, a scaffold should exhibit:

- (i) biocompatibility without causing any inflammatory response or toxic reaction;
- (ii) three-dimensional and highly porous structure with an interconnected pore network for cell growth, flow transport of nutrients and metabolic waste, as well as active bone ingrowth (osteoconduction) and blood vessels invasion into the graft;
- (iii) controllable degradation and resorption rates to match cell/tissue growth without any inflammatory reactions *in vivo*;
- (iv) suitable surface chemistry for cell attachment, proliferation, and differentiation towards the desired phenotype;
- (v) strong binding to the host bone (osteointegration);
- (vi) mechanical properties matching those of the tissues at the site of implantation (*e.g.* stiffness and deformability).

Lastly, the ideal scaffold should also be able to induce cell differentiation and blood vessel formation/invasion through osteoinductive and angiogenic properties, respectively.

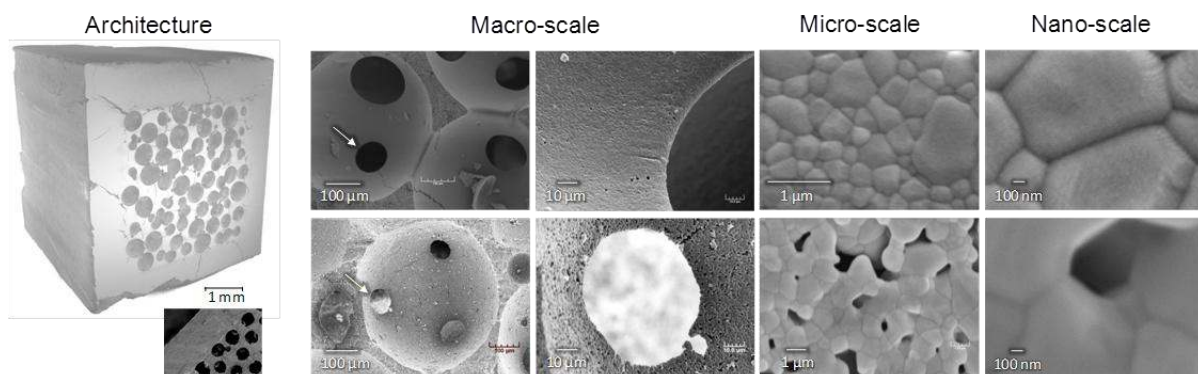
Unfortunately, despite the large amount of research that has been performed over the past decade in the area of 3D porous scaffolds for bone tissue engineering, there is an overall lack of success in bringing this technology to the clinic [109]. Understanding the signals that guide cell fate, by means of engineered *in vitro* 3D cell culture system, could help to determine the most relevant scaffold features for therapeutic applications.

While the success of an implanted scaffold *in vivo* will be based on its capacity to be invaded, degraded then replaced by host tissue, the purpose of a scaffold for experimental application is to provide a biomimetic 3D environment for bone cells. Thus, the scaffold needs to be at least biocompatible and osteoconductive to support cell attachment, growth and differentiation [111]. Although the final features depend on the specific purpose, several

general characteristics and requirements need to be considered for all designs. Besides stiffness [104, 105, 107, 110, 112], scaffolds must have adequate mechanical properties to support, if applicable, the perfusion and, particularly, mechanical stimuli (*e.g.* compressive strength). Scaffolds do not necessarily have to be degradable (*i.e.* soluble and/or resorbable). However, the phase and chemical composition, as well as surface chemistry, are key parameters that affect cellular responses [113-115]. Similarly, architecture influences the interactions between the cells, the media and the material, ultimately controlling the rate and quality of new tissue formation (*e.g.* extracellular matrix deposition) [104, 114, 116, 117]. Both are detailed in following subsections.

### C.3.3. Architecture : a key role

For a 3D scaffold-based culture strategy, the scaffold architecture has to allow controlled and homogeneous cell seeding [118-120], cell response [120], mass transport [51] and mechanical properties [121] throughout the experiment. Cell fate is influenced both directly (*e.g.* nutrient accessibility) and indirectly (*e.g.* adsorption of proteins, local shear stresses) by scaffold architecture. Macroscopic and microscopic architectural features are distinct (*Figure 4*). They are generally defined as pore sizes greater than 100  $\mu\text{m}$  and less than 20  $\mu\text{m}$ , respectively [106]. Numerous studies have investigated the influence of macro-architecture and micro-architecture on cell response and fate, and both were proved to be of great importance [104]. Macro-scale architecture can be split into macroscopic design (geometric structure) and internal pore structure/architecture, including the shape, size, distribution and interconnection of the macropores. Similarly, the micro-scale architecture consists of the shape (*i.e.* morphology), size (width and depth), orientation (according to the way of perfusion flow for instance) and distribution (ordered vs random) of the micropores.



**Figure 4.** Micro-computed tomography (mCT) and scanning electron microscopy (SEM) images showing the macro-, micro- and nano-scale architecture of CaP scaffolds manufactured through a standard replication of PMMA beads template.

According to the literature, the macro-scale architecture first influences internal mass-transport (e.g. supply of nutrients, removal of deleterious waste compounds), cell invasion/infiltration (e.g. seeding) [51, 104, 111, 119, 122-124] and tissue ingrowth (e.g. bone, blood-vessel) [120, 125, 126]. Second, macroscopic (e.g. scaffold deformation) [121, 127] and microscopic (e.g. stiffness) [128] mechanical properties of the scaffold are dependent on macro-scale architecture.

Besides the direct effects of the convective flow (*i.e.* mass-transport through perfusion and scaffold deformation [51]) on cell processes [104, 122, 123], it induces mechanical stimuli (shear stress), developed at the cell microscopic level, which modify cell behavior and fate [129, 130]. Likewise, the mechanical properties of the scaffold affect the intrinsic mechanical stimuli developed at the macroscopic [127, 128] and microscopic cell level [130] which, in turn, modify cellular response [51, 111, 131].

Despite that macropore size has been proven to influence bone cell response *in vitro* and *in vivo* [106, 132, 133], its effects is similar for macropores ranging from 100 to 1200  $\mu\text{m}$  [125, 134-136]. However, these results were obtained using scaffolds with random internal pore architecture/morphology, with generally size-limiting pore interconnections. Yet, this architectural feature seems to be the main macroscopic determinant of the biophysical properties of scaffolds [119, 120, 128, 130, 137], indicating that most studies do not exert sufficient control of macropore size to ensure homogeneity.

Since the 1990s, studies emphasise the crucial effects of the micro-scale architecture of the constructs on cell seeding and response [110, 113, 114, 120, 138-141]. Micro-architecture has been shown to improve scaffold osteoconductivity [142, 143] and induce intrinsic osteoinductive activity [142, 144-148]. These modification may be explained by (i) selective adsorption of proteins from biological fluids [113, 143, 149-153], (ii) increase in specific surface area, promoting the dynamic exchange at the biomaterial-matrix-cell interface [145, 147], or (iii) the responsiveness of cells to substrate discontinuities [113, 114, 140, 149, 154].

To date, advancements in engineering and materials has allowed for subtle tuning of scaffold features (e.g. macro-, micro-topography and surface chemistry). These improvements provide the opportunity to more accurately control the biophysical and biochemical microenvironmental cues in 3D biomaterial-based culture systems [103, 116]. Many engineering methods are used to design and produce 3D scaffolds for tissue engineering applications, including porogen leaching [155], phase separation [155], gas foaming [120, 156, 157], replication of polymer template [158, 159], and others [109, 110, 160, 161]. Although the internal scaffold architecture produced by these standard methods can be modified by changing the fabrication parameters, it is still random and limited in term of design. Thus, these methods prevent the standardisation of the structure, as well as the reproducibility of the experiments. The combination of computer-aided design (CAD) and additive manufacturing technologies (AM) [162] provides the highest level of control over the design of manufactured scaffolds, with customised external shapes and optimised and

reproducible internal morphologies (e.g. pore interconnectivity, shape, size and distribution) [119, 163]. They also can be used to develop cell-containing constructs, as well as vascularised organ substitutes [116].

#### C.3.4. Scaffold composition

Cells are greatly affected by the surface to which they adhere. The type and properties of a scaffold can alter the proliferation rate and extracellular matrix laid by the cells, and thus affect the final biomechanical and morphological properties of the engineered tissue. For bone therapeutic applications, the primary objective of using a scaffold is to provide short term mechanical stability and integrity to the construct, supplying a template for three-dimensional organisation of the developing tissue. The final goal is to obtain a *de novo* tissue with biomechanical properties comparable to native tissue [105, 118]. Many natural and synthetic materials have been reported to fulfill these requirements, including polymers, metals, bioglass, ceramics and composites [106, 111, 131, 155, 164-168]. Ceramics, such as hydroxyapatite, calcium phosphates, alumina, zirconia and composite materials, are widely used as scaffold material [111, 169-172]. As in native tissue, cells within a construct respond and adapt to the physical and biological stimuli to which they are exposed *in vivo* [105]. Consequently, scaffolds for bone often contain ceramic hydroxyapatite, which has a stiffness similar to bone, while polymers are suitable as scaffolds for cartilage, tendon or ligament [105, 118]. Indeed, porous polymeric scaffolds lack sufficient mechanical strength to withstand mechanical loading [109]. Apart from insufficient mechanical strength, other characteristics of biodegradable polymers appear to be detrimental for tissue formation (e.g. hydrophobic surfaces and low local pH [109]) or for cell matrix adhesion (e.g. low cell adhesion capacity [104]). In addition to considerable stiffness, calcium phosphate (CaP) ceramics show biocompatibility, osteoconductivity, tunable biodegradability [173, 174] and generally more bioactivity [110, 175].

The modulation of the properties of synthetic scaffolds (e.g. physicochemical, architectural or mechanical) is essential to develop *in vitro* models, which will help improve understanding of the fundamental aspects of cellular signaling *in vivo*. However, for the development of such experimental systems, it is critical to know the influence of scaffold features, such as their degradation kinetics and by-products, on cell behaviour. Thus, an ill-defined scaffold (*i.e.* not accurately characterised) does not permit to understand and control in reproducible manner the interaction between cells and substrate through adsorbed proteins [104]. Last, batch-to-batch reproducibility of matrices is also essential to ensure correlation between scaffold features and cell responses.

### C.3.5. Future challenges

Robust spatial and temporal control of biophysical, biomechanical and biochemical microenvironmental cues through 3D biomaterial-based culture systems is essential for studying cell regulatory pathways and drug development. In this context, experimental models will have to increase progressively their complexity from basic to physiologically relevant structural and functional features.

A core challenge of this strategy will be to uncover the relationship between chemical (*e.g.* degradation), physical (*e.g.* microporosity) and mechanical scaffold properties (*e.g.* stiffness) and cell signaling [141]. This implies the accurate control and characterisation of biomaterial features, at the nano-, micro- and macro- scales, from synthesis, through shaping, until the sterilisation steps. Unfortunately, the chemistry [175-179] as well as architectural features [153, 157, 160, 177] of scaffolds are still too often considered as non-significant parameters. Thus, defining the appropriate composition and the relevant architecture of these new 3D systems remains a significant challenge [141]. However, new design concepts and fabrication techniques currently available (*e.g.* additive manufacturing), even if they are still limited for bioceramic shaping in particular at the microscopic scale, provide alternatives for developing scaffolds to enhance our understanding of cell signaling.

## C.4. Cell culture

### C.4.1. Cell seeding

The cellular seeding of a porous scaffold is an important step in the set up of a 3D culture, permitting bone formation *in vitro*. To begin, initial seeding density impacts tissue formation. High cell densities are associated with stimulation of osteogenesis and increased bone mineralisation [180]. Classically, a 30 mm<sup>3</sup> macroporous biomaterial is inoculated with one million cells [77, 79, 181]. The seeding protocol also affects the viability and distribution of cells within the scaffold, impacting the subsequent distribution of the tissue formed [180, 182-185]. Uniform cell seeding is required to generate uniform 3D cultures.

3D cell seeding is generally performed under static conditions by placing a suspension of cells on top of the scaffold, which will penetrate within the material by capillary and gravity action. Although this standard method is widely used, it may result in low seeding efficiency and non-homogeneous distribution of cells in the scaffold [18-20, 186]. The seeding efficiency can be improved by placing the scaffolds in a stirred cell suspension. Spinner flask systems have been used for this purpose. However, the inefficient convection inside the scaffolds can also lead to low cell densities [183, 184] and non-homogeneous distribution of cells [20, 187] with a higher external surface density [188]. To further improve seeding efficiency, a flow of cells in suspension can be forced through the scaffold within a perfused bioreactor, in which seeding and cell growth will be successively performed without further

manipulation, greatly reducing the risk of contamination. This approach allows a more homogeneous distribution of cells within the scaffold compared to static seeding or a spinner flask [20]. Specific seeding density and seeding flow conditions for a given 3D system will vary depending on the type of bioreactor and scaffold (porosity and composition), as well as the cell type(s) involved.

#### C.4.2. Culture conditions

*In vivo*, the partial pressure of oxygen ( $\text{PaO}_2$ ) is 5% in peripheral tissues, 6–7% in bone marrow and 1% in the endosteal niche [189]. It should be noted that these values are low compared to the 21%  $\text{PaO}_2$  (usually) used in classical (2D) cell culture conditions. Measurements of oxygen concentration in cell culture and analysis of the effects of different concentrations of  $\text{O}_2$  on cell viability have been performed in several systems [190]. A stationary culture medium impairs oxygen diffusion within a 3D structure. Beyond basic respiration needs, the local concentration of oxygen will affect cell behaviour in several ways. High oxygen concentrations are toxic to many cells, and low levels of oxygen can promote the differentiation of stem cells *in vitro* and *in vivo* [189, 191-193]. While it is clear that the local oxygen pressure is a potent regulator of metabolism and viability of bone cells, the distribution profile of oxygen in bone is currently unknown. Nonetheless, mathematical models suggest that significant oxygen gradients exist within the cortical and cancellous bone and that the  $\text{PaO}_2$  can regulate the physical dimensions of trabeculae and osteons [194]. Apart from oxygen, a recent study showed that glucose concentration is an important factor in maintaining the viability and growth of mesenchymal stem cells [195]. Overall, controlling the composition of the medium, in terms of nutrient and oxygen availability as well as waste product accumulation (*e.g.* lactate), is crucial. These basic parameters can be monitored using invasive (embedded) or non-invasive (non-contact, [196] for review) sensing probes.

Standard conditions of cell culture on 2D substrates (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C, 21% oxygen) will have to be modified during the transition to a 3D structure. Cell location in the scaffold (periphery vs. center) will generate gradients that will intensify with cell growth and extracellular matrix deposition. Moreover, this phenomenon is accentuated because scaffolds are not vascularised. Therefore, key parameters will be: the composition of the culture medium (availability of oxygen and glucose in particular, and accumulation of metabolic waste products such as  $\text{CO}_2$ , lactic acid, ammonia and products generated by oxidative stress) and the rate of exchange between the inside and the outside of the scaffolds.

#### C.4.3. Cell types and sources

The cell type most commonly studied and used in bone tissue engineering is the osteoblast. Osteoblasts produce a bone matrix and some of them, when completely walled up in their

own matrix, become osteocytes. Bone cells, such as osteoblasts, are either isolated as primary cell types from human or animal bone tissue or modelled using a phenotype-mimicking immortalised or transformed cell line.

Cancer cell lines have acquired the ability to proliferate in culture without limit. Primary cell lines can also be genetically modified to be "immortalised". The advantage of cell lines is the immediate availability of a large numbers of cells and the homogeneity of the cell cultures. Cell lines are less prone to the phenotypic variability observed in primary cell cultures, but at the cost of some functional characteristics that are lost upon immortalisation. However, there are examples of spontaneous genetic changes, such as mutations, which give rise to permanent lines retaining major phenotypic traits. Many cell lines can become unstable with time, and subclones of cell lines tend to develop in different laboratories. In addition, clonal selection generally promotes rapidly growing cells, which may not express all tissue-specific characteristics and therefore produce results which are not entirely representative of tissue cells.

Among the lines most used in bone cell studies, the MC3T3-E1 are murine preosteoblasts [197]. They are often used because of their ease of maintenance and high capacity for differentiation in response to materials (apatite), with or without differentiation medium [198]. However, these cells must be used with caution since, as with any other cell line, they can change over time in culture. Also, mineralising MC3T3 have been shown to not lay down hydroxyapatite but, instead, spots of mineral of unknown form [199].

The MG63 and SaOS-2 human osteosarcoma cell lines are particularly useful in the study of interactions between osteoblasts and materials [200], as well as assessment of biocompatibility and osteoblast differentiation potential. However, the response obtained with these lines may differ from those obtained from healthy cells. Anselme et al. compared the deformation of the cell nuclei in response to substrate surface topography in healthy, cancerous and immortalised cells. Cancer cells displayed a strong deformation, immortalised cells showed reduced deformation, while healthy cells were deformed only after short incubation times. These results suggest a close link between malignant transformation of cells and the state/responsiveness of the cytoskeletal network [201].

Primary stem/progenitor cells provide an alternative to cell lines. An evident advantage of primary cells compared to cell lines is that cells can be isolated from genetically modified animals, expressing a stable phenotype. This avoids the use of silencing RNA techniques, where transfection efficiency and silencing duration are difficult to control. Stem cells display high proliferation and differentiation potential, and are thus "professional cells" for tissue regeneration. Bone marrow in adults harbours several types of stem and progenitor cells, hematopoietic (HSC) and non-hematopoietic, the latter including mesenchymal stem cells (MSC). MSC are undifferentiated cells with high proliferation capacity, able to self-renew and differentiate into different cell lineages, generating all mesenchymal tissues, such as bone, cartilage, tendons, muscles and fat. Although gene and protein profiles characteristic of MSCs are still unclear, studies of *in vitro* differentiation demonstrated the ability to isolate and multiply cells with at least some of their characteristics from cartilage,

trabecular bone, periosteum, adipose tissue and periodontal ligaments [202-208]. Recently, work of the European Genostem consortium further elucidated the biology of stem cells from bone marrow, establishing that the native cells are localised on the abluminal side of endothelial cells of sinuses, demonstrating that stromal cells forming the niche of hematopoietic stem cells and bone marrow MSC are the same entities, and showing that highly proliferating clonal cells amplified in culture are "true" stem cells since, similar to HSC, they display self-renewal and multipotency. However, many questions remain unresolved. It is not clear, for instance, whether the self-renewal capacity of MSC is comparable to that of HSC [209]. Indeed, the very concept of a universal MSC, as opposed to tissue-specific (*e.g.* skeletal stem cells), is contested [210].

The main disadvantage of the use of MSC is that considerable variation may exist between cells of different tissue sources. Cell populations derived from a single tissue source may also be heterogeneous due to variations in the isolation and/or purification technique, or according to passage numbers (genetic drift). For instance, significant changes in contractile force were reported between the cells of successive generations after only three passages [211]. In addition, these cells are extremely sensitive to the batch of serum used. Many methods are available for isolation of primary cells from bone. A common one is to digest small pieces of bone explants from rodent long bone, calvaria (of fetuses or neonates), mandible or iliac crest with collagenase or other matrix-digesting enzymes, followed by subculturing of the cells obtained [212-215]. Osteogenic precursor cells are also regularly isolated from bone marrow [216, 217]. One drawback of these approaches is that the population obtained is far from homogeneous, and the osteogenic precursor cells are a small fraction of these. However, culture with certain factors, such as dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate, directs these cells towards the osteoblastic differentiation pathway. Similarly, other inducing media exists to drive differentiation to adipocytes or chondrocytes. Also, in order to improve the homogeneity of marrow-derived populations, it is possible to sort and select cells with antibodies targeting cell type-specific membrane markers [218, 219].

Primary culture of osteoclasts is also possible by isolating cells from bone [215] and, more efficiently, hematopoietic cells from bone marrow or spleen and culturing in the presence of RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand) and MCSF (macrophage colony stimulating factor), two cytokines required for osteoclast differentiation [220, 221].

#### *C.4.4. Complex 3D models : multiple cell types*

Tissue engineering has made ample use of "minimalist" approaches, based on homogeneous populations of cells grown in the appropriate environmental conditions to give rise to specific practical results (*e.g.* mineralised scaffolds). However, few tissues are derived from a single cell population. Bone is in a state of perpetual change, based on an intimate cross-talk between osteoblasts and osteoclasts. In addition, bone is highly vascularised, thus these cells are in close contact with other cell types, such as the endothelial cells that dictate



neovascularisation [222, 223], matrix-embedded osteocytes or bone lining cells. To these were recently added the "osteomacs", the resident tissue macrophage population that promotes bone formation and is necessary to the maintenance of bone forming osteoblasts [224]. All these cells contribute to the regulation of bone remodeling through a complex signaling network [225].

The creation of complex tissues is essential to mimic the bone environment. This strategy, however, generates new requirements for the design of *in vitro* 3D models, the generation of multiple regulatory signals and the spatial and temporal control of cell differentiation and tissue formation. The challenges facing biologists and engineers are not negligible, and the development of new tools is required for the regulation of microenvironmental conditions necessary to form such complex tissues.

Tissue engineering has long been focused on the creation of stable vascular networks [226-228] and the vascularisation of tissues, including bone [229, 230], providing a working basis for 3D cell culture. Interactions between osteoblasts and endothelial cells have been extensively studied, and complex cellular communication interrelationships have been reported in several *in vitro* studies [231, 232]. Different co-culture models were developed for these studies. Grellier et al. [233] made an inventory of these models, as well as tissue sources for the cells used (*e.g.* human osteoblasts, rat long bone-derived osteoblast-like cells, human umbilical vein endothelial cells or human bone marrow stromal cells) and crosstalk between these different lineages. Studies of co-cultured osteoblasts or osteoprogenitor cells and vascular cells led to conflicting conclusions about the ability of endothelial cells to induce or inhibit the expression of osteogenic genes [222, 234-240]. Indeed, such interactions depend on the origin and differentiation state of the two cell types, as well as the co-culture system used (2D or 3D substrates). However, even in cases where the endothelial cells had an inducing effect, *in vitro* mineralised matrix deposition (*i.e.* the mark of bone tissue) and the concomitant formation of blood vessels have not been observed. *In vivo*, angiogenesis and osteogenesis are closely linked and stringently regulated, and there is much more to learn about the nature and kinetics of the molecular, structural and physical signals that drive the coordination of these two processes *in vitro*.

*In vitro* osteoclast/osteoblast co-cultures on scaffolds allow the study of the remodeling process and, in particular, the crosstalk between resident osteoblasts and invading, differentiating, and resorbing osteoclasts. Tortelli et al. [241] developed a 3D model of bone by seeding primary murine osteoblasts and osteoclast precursors in a ceramic porous scaffold. Using this model, the team demonstrated through comparative analysis of transcriptional activities that the 3D environment stimulates osteoblast differentiation which, in turn, induces early differentiation of osteoclasts. Recently, Papadimitropoulos et al. developed an *in vitro* model to mimic bone turnover by co-culturing osteoblasts, osteoclast and endothelial cells. To address issues that arise due to the very short life osteoclast cells, the authors developed a culture process composed of two steps. In the first step, the scaffolds are seeded with cells from the stromal-vascular fraction of adipose tissue, containing osteoprogenitors and endothelial lineage cells, for a week in a perfusion

bioreactor. In the second phase, CD14+ human peripheral blood cells are infused into the scaffold via the perfusion system. Non-invasive monitoring techniques (*e.g.* analysis of typical markers of bone remodeling in the culture medium) were used to quantify the bone matrix deposition and resorption processes, as well as document the functional regulation of the system via osteoclastogenic and osteotropic factors [242].

### C.5. Flow and mechanical modelisation: a tool for prediction

Most culture systems and bioreactors are not optimised to reproduce original physiological conditions. Parameters, such as the rate of perfusion, flow design (unidirectional, oscillatory, intermittent, etc.), scaffold architecture, shear stress and pressure, are often determined through trial-and-error. It is nonetheless important, for instance, to determine to the degree of shear stress that cells are exposed to in the bioreactor and how the architecture and flow conditions affect mass transport. Such analysis can be difficult to achieve because the modeling of flow passing through the random porous architecture of the scaffold, which changes with cell growth, can be of forbidding complexity. Theoretically, it is possible to combine mathematical modeling and advanced imaging techniques to map cell growth and matrix production in real-time (see [66, 243] for review). A mathematical model that ignores cell proliferation was developed for a 3D system (polyethylene terephthalate matrix, 1.2mm thick, 1.6 cm in diameter and perfused at 1.5 ml/min) for culture of osteoblastic stem cells [60, 193, 244, 245]. This model predicted a  $10^{-5}$  to  $10^{-4}$  Pa shear in the scaffold down to a 70 microns depth, induced by the flow penetration into the pores.

Although it has been shown that shear stress influences osteoblast differentiation, the exposure of cells to shear stress has been modeled only in a few bioreactors [246-248]. In order to evaluate the shear stress induced by the flow on cells, computational fluid dynamic (CFD) models have been successfully used. This method calculates local shear stress and computes the distribution of shear stress inside microstructures [246-248], whereas finite element deformation simulations are used to quantify deformation of cells caused by a fluid flow [249]. Tests were performed on collagen-GAG scaffolds subjected to fluid flow applied externally using a bioreactor. Using this approach, the fluid flow acting on the cells was determined by a CFD simulation and was used to calculate the global cell deformation (Von Mises stress) [250]. This study showed that the impact of mechanical stress on cell shape is primarily determined by cell-substrate interactions (*i.e.* either attached flatly on the scaffold wall or bridging between two struts of the scaffold) [250]. Since the pore size of a scaffold determines both the mechanical load and the type of attachment, the design of an optimal scaffold must take into account the interplay of these two features, requiring a design that optimises both parameters at the same time.

There are very few examples of mechanical stress modeling in 3D cultures. Lacroix and coworkers studied the dynamics of the mechanical stimuli transmitted to cells during their differentiation on a scaffold of irregular morphology subjected to both compressive load and flow. Both the solid phase and the flow within the pores were modeled. From a mechanical

standpoint, this modeling based on finite elements and CFD predicted loading conditions that promote bone formation and critical variations of fluid shear stress during cell differentiation [251, 252].

### C.6. Major limiting factors: perspectives in 3D imaging

The development of an *in vitro* 3D model of bone remains a complex and challenging endeavour for the field of tissue engineering. Although many types of scaffolds have been developed and tested for culture of osteogenic cells *in vitro*, none of the 3D models currently designed are able to closely mimic bone tissue. A major problem is lack of homogeneity in the tissue formed and incomplete differentiation of osteogenic cells. In addition, it is a challenge to develop scaffolds that simultaneously include an osteocompatible mineral component, mechanical properties similar to functional bone and, if needed, be resorbable by osteoclasts. The opacity of bioceramics used in these *in vitro* models is also a major drawback because it limits analysis to traditional microscopy or microfluorescence. In addition, the evaluation of newly formed bone *in vitro* can be difficult given the lesser amount of matrix deposited as compared to *in vivo* implants. Therefore, one of the challenges of tissue engineering is to quantify cell growth and bone formation in the scaffolds in response to different culture conditions. The technique traditionally used in many laboratories is histological examination. It has the advantage of being easily performed with proper equipment, but it takes a lot of handling and analysis time. In addition, histological analysis is only concern a given time-point, and time-course analysis with this technique is very material and time consuming. Hence, it is preferable to use non-invasive imaging techniques for detailed analysis inside the scaffold, with high resolution and real-time observation capabilities throughout the culture period. Optical coherence tomography (OCT) can potentially go down to about 100 micrometers in depth. OCT is a non-destructive and non-invasive modality conceptually similar to ultrasound imaging, but uses infrared radiation. It would be an ideal tool for real-time monitoring of cell growth and tissue development inside scaffolds [253, 254]. However, the depth of penetration of OCT (max 1 mm) limits its use to small samples [255].

Micro-computed tomography (micro-CT) is often used to characterise scaffolds and bone growth in 3D [256]. Micro-CT uses X-rays and provides a non-destructive 3D image of the interior of a sample, regardless of size, with a resolution ranging from 1 to 100  $\mu\text{m}$ . Several micro-X-ray CTs are commercially available, which led to installation of the device in many laboratories. The combination of micro-CT and recently developed microdiffraction x-ray techniques has facilitated qualitative and quantitative characterisation of dense scaffolds, as well as a 3D evaluation of the rate of bone growth in engineered tissue [257]. Synchrotron radiation tomography (SRT) has enabled acquisition of even better results in terms of spatial resolution (under 1  $\mu\text{m}$ ) and signal/noise ratio [258]. In addition to revealing the architecture of the sample, SRT also provides information about composition (*i.e.* the 3D distribution and

degree of mineralisation) [259]. However, equipment to perform this technique is only available in a few research centers around the world.

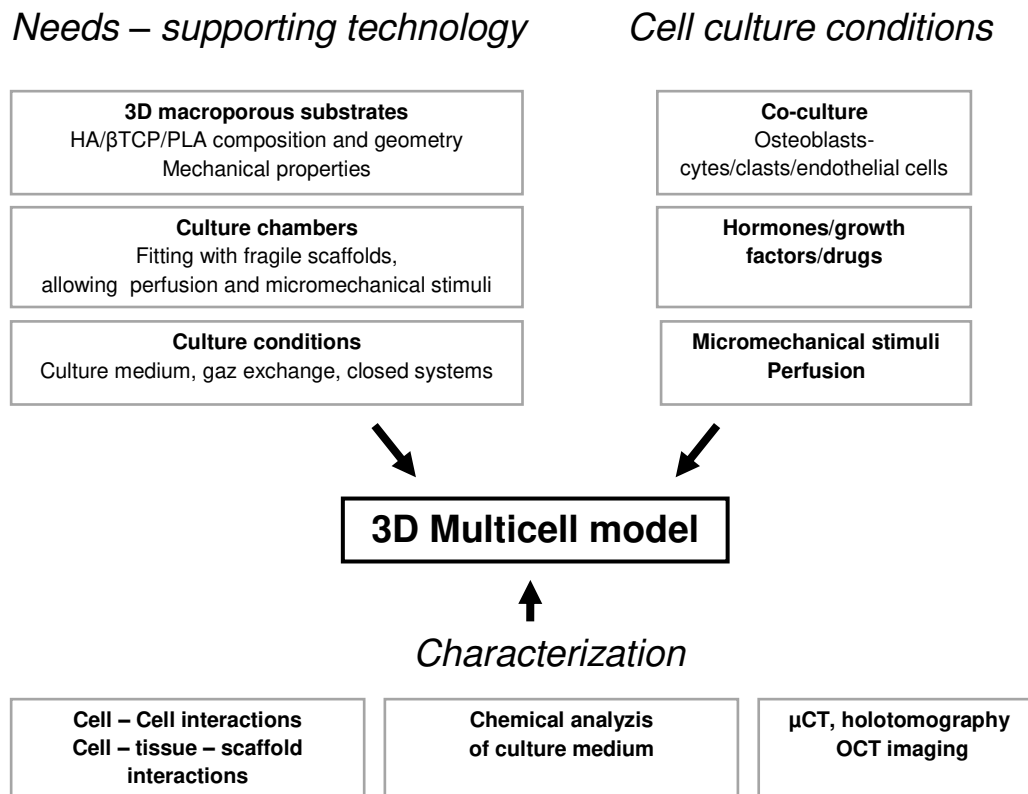
CT and SRT techniques allow visualisation and quantification of mineralised structures, but not the cells. "X-ray synchrotron radiation pseudo-holotomography" was recently developed to visualise soft tissue and microvascular networks in 3D without the use of contrasting agents. The method is based on micro-CT and conventional holotomography techniques. This approach was used to obtain quantitative structural data on a bioceramic/MSC composite implanted in mice for 24 weeks [260].

Due to the complex and dynamic nature of cellular responses to regulatory signals, non-invasive imaging of scaffolds throughout culture could significantly increase our ability to understand cellular responses to environmental parameters with spatial and temporal specificity.

### C.7. CONCLUSIONS

Tissue engineering is a rapidly developing field with incredible potential for multiple applications. This approach allows in-depth study of subtle topography- and environment-dependent mechanisms that cannot be done using traditional 2D *in vitro* cultures. *In vitro* replication of a bone tissue environment may lead to a better understanding of bone processes, paving the way for new therapeutic approaches that can immediately benefit a large number of patients.

It should nonetheless be borne in mind that the extrapolation from an *in vitro* model to the *in vivo* situation in the organism (mouse, human) will remain partial. This means that the findings from cell culture experiments still need validation in a limited number of animal models to ensure that the processes described are not artefacts of the *in vitro* method. No 3D model can provide a "complete" model of bone biology. For this reason, rather than attempting to build the perfect general 3D bone model, research should focus on developing specific tools for the purpose of solving one/several well thought biological questions (*Figure 5*).



**Figure 5:** There is need for a bioreactor to improve the duration of 3D co-cultures with full and standardised control of their environment We propose here a reference model of bone remodeling (3D multicell) with controlled environmental characteristics, including medium composition, medium delivery and mechanical environment. Development of advanced methods for real-time analysis is required to characterise and monitor the physical and chemical environment of the cells and their interactions, as well as to visualize the constructs and their remodeling. Abbreviations : HA = hydroxyapatite,  $\beta$ TCP = beta-tricalcium phosphate, PLA = polylactic acid, OCT = optical coherence tomography,  $\mu$ CT = micro-computed tomography.

## C.8. References

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-6.
- [2] Macfarlane M, Jones P, Goebel C, Dufour E, Rowland J, Araki D, et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: skin irritation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009;54:188-96.
- [3] Paquette JS, Moulin V, Tremblay P, Bernier V, Boutet M, Laviolette M, et al. Tissue-engineered human asthmatic bronchial equivalents. *Eur Cell Mater*. 2004;7:1-11; discussion 1-.
- [4] Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med*. 2005;9:592-608.
- [5] Auger FA, Berthod F, Moulin V, Pouliot R, Germain L. Tissue-engineered skin substitutes: from *in vitro* constructs to *in vivo* applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;39:263-75.
- [6] Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, et al. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials*. 2007;28:3295-305.

- [7] Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*. 2001;344:1511-4.
- [8] Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007;28:4240-50.
- [9] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J*. 2006;20:811-27.
- [10] Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol*. 1989;133:8-13.
- [11] Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation *in vitro*. *J Cell Biochem*. 1999;74:616-27.
- [12] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294:1708-12.
- [13] Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:633-9.
- [14] Ishii I, Tomizawa A, Kawachi H, Suzuki T, Kotani A, Koshushi I, et al. Histological and functional analysis of vascular smooth muscle cells in a novel culture system with honeycomb-like structure. *Atherosclerosis*. 2001;158:377-84.
- [15] Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 1972;54:626-37.
- [16] Hay ED. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd Edition ed. New York Plenum Press.; 1991.
- [17] Burridge K, Tsukita S. Editorial overview: Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;13:525-8.
- [18] Alvarez-Barreto JF, Linehan SM, Shambaugh RL, Sikavitsas VI. Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures. *Ann Biomed Eng*. 2007;35:429-42.
- [19] Alvarez-Barreto JF, Sikavitsas VI. Improved mesenchymal stem cell seeding on RGD-modified poly(L-lactic acid) scaffolds using flow perfusion. *Macromol Biosci*. 2007;7:579-88.
- [20] Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng*. 2003;84:205-14.
- [21] Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, et al. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1809-20.
- [22] Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. *In vivo* bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng*. 2004;10:33-41.
- [23] Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28:1036-47.
- [24] Yang J, Cao C, Wang W, Tong X, Shi D, Wu F, et al. Proliferation and osteogenesis of immortalized bone marrow-derived mesenchymal stem cells in porous polylactic glycolic acid scaffolds under perfusion culture. *J Biomed Mater Res A*. 2002;62:817-29.
- [25] Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. *In vitro* generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2488-93.
- [26] Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:3299-304.
- [27] Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology*. 2006;43:481-8.
- [28] Janssen FW, van Dijkhuizen-Radersma R, Van Oorschot A, Oostra J, de Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. Human tissue-engineered bone produced in clinically relevant amounts using a semi-automated perfusion bioreactor system: a preliminary study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009.

- [29] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. 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.* 2002;62:136-48.
- [30] Granet C, Laroche N, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust MH. Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. *Med Biol Eng Comput.* 1998;36:513-9.
- [31] Roche B, David V, Vanden-Bossche A, Peyrin F, Malaval L, Vico L, et al. Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure? *Bone.* 2012;50:390-9.
- [32] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J.* 2001;81:675-84.
- [33] Qin L, Zhang G, Sheng H, Yeung KW, Yeung HY, Chan CW, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. *Bone.* 2006;39:863-71.
- [34] Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials.* 2001;22:1279-88.
- [35] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22:80-6.
- [36] Radisic M, Euloth M, Yang L, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 2003;82:403-14.
- [37] Radisic M, Yang L, Boublik J, Cohen RJ, Langer R, Freed LE, et al. Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H507-16.
- [38] Radisic M, Park H, Chen F, Salazar-Lazzaro JE, Wang Y, Dennis R, et al. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue Eng.* 2006;12:2077-91.
- [39] Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The Anatomical record.* 1987;219:1-9.
- [40] Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S86-95.
- [41] Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med.* 2005;10:7-40.
- [42] Vico L, Lafage-Proust MH, Alexandre C. Effects of gravitational changes on the bone system *in vitro* and *in vivo*. *Bone.* 1998;22:95S-100S.
- [43] Akyuz E, Braun JT, Brown NA, Bachus KN. Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31:E952-8.
- [44] Lanyon LE, Rubin CT. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *Journal of biomechanics.* 1984;17:897-905.
- [45] Lanyon LE. Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res.* 1992;7 Suppl 2:S369-75.
- [46] Verheyen K, Price J, Lanyon L, Wood J. Exercise distance and speed affect the risk of fracture in racehorses. *Bone.* 2006;39:1322-30.
- [47] Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *Journal of biomechanics.* 2000;33:317-25.
- [48] Turner CH, Yoshikawa T, Forwood MR, Sun TC, Burr DB. High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities. *Journal of biomechanics.* 1995;28:39-44.
- [49] Lemaire T, Naili S, Remond A. Study of the influence of fibrous pericellular matrix in the cortical interstitial fluid movement with hydroelectrochemical effects. *J Biomech Eng.* 2008;130:011001.

- [50] Brown TD, Pedersen DR, Gray ML, Brand RA, Rubin CT. Toward an identification of mechanical parameters initiating periosteal remodeling: a combined experimental and analytic approach. *Journal of biomechanics*. 1990;23:893-905.
- [51] Grayson WL, Vunjak-Novakovic G, Obradovic B. Bioreactors in tissue engineering. In: Obradović B, editor. *Cell and Tissue Engineering*. Belgrade, Serbia: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 217-27.
- [52] Estrada R, Giridharan GA, Nguyen MD, Roussel TJ, Shakeri M, Parichehreh V, et al. Endothelial cell culture model for replication of physiological profiles of pressure, flow, stretch, and shear stress *in vitro*. *Anal Chem*. 2011;83:3170-7.
- [53] Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001;22:2581-93.
- [54] Dillaman RM, Roer RD, Gay DM. Fluid movement in bone: theoretical and empirical. *Journal of biomechanics*. 1991;24 Suppl 1:163-77.
- [55] Keanini RG, Roer RD, Dillaman RM. A theoretical model of circulatory interstitial fluid flow and species transport within porous cortical bone. *Journal of biomechanics*. 1995;28:901-14.
- [56] Piekarski K, Munro M. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature*. 1977;269:80-2.
- [57] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of biomechanics*. 1994;27:339-60.
- [58] Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12600-5.
- [59] Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amedee J. Responsiveness of human bone marrow stromal cells to shear stress. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:302-9.
- [60] Zhao F, Chella R, Ma T. Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in a perfusion bioreactor system: Experiments and hydrodynamic modeling. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96:584-95.
- [61] Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone*. 2003;32:241-51.
- [62] Guo D, Zhang Q, Li J, Liang X, Chen Y, Wang H, et al. Fluid shear stress changes cell morphology and regulates the expression of ATP6V1A and TCIRG1 mRNA in rat osteoclasts. *Mol Med Report*. 3:173-8.
- [63] Botchwey EA, Dupree MA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Tissue engineered bone: measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67:357-67.
- [64] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2005;33:63-70.
- [65] Hillsley MV, Frangos JA. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43:573-81.
- [66] Porter BD, Lin AS, Peister A, Huttmacher D, Guldberg RE. Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. *Biomaterials*. 2007;28:2525-33.
- [67] Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Eng*. 2005;11:1832-9.
- [68] Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*. 1997;273:C810-5.
- [69] Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldberg RE. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs *in vitro*. *Tissue Eng*. 2003;9:1197-203.



- [70] Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, Reis RL, Mikos AG. *In vitro* localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng.* 2006;12:177-88.
- [71] Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng.* 2005;33:1238-48.
- [72] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14683-8.
- [73] Jacobs CR, Yellowley CE, Davis BR, Zhou Z, Cimbala JM, Donahue HJ. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *Journal of biomechanics.* 1998;31:969-76.
- [74] Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone.* 1998;23:399-407.
- [75] Dumas V, Ducharme B, Perrier A, Fournier C, Guignandon A, Thomas M, et al. Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under low-magnitude, high-frequency stimulation is favourable to osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Calcif Tissue Int.* 87:351-64.
- [76] Jaasma MJ, Plunkett NA, O'Brien FJ. Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *J Biotechnol.* 2008;133:490-6.
- [77] Du D, Furukawa KS, Ushida T. 3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102:1670-8.
- [78] Correia C, Bhumiratana S, Sousa RA, Reis RL, Vunjak-Novakovic G. Sequential application of steady and pulsatile medium perfusion enhanced the formation of engineered bone. *Tissue Eng Part A.* 2013;19:1244-54.
- [79] Dumas V, Perrier A, Malaval L, Laroche N, Guignandon A, Vico L, et al. The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials.* 2009;30:3279-88.
- [80] David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, et al. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A.* 2008;14:117-26.
- [81] Demarteau O, Jakob M, Schafer D, Heberer M, Martin I. Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. *Biorheology.* 2003;40:331-6.
- [82] Wartella KA, Wayne JS. Bioreactor for biaxial mechanical stimulation to tissue engineered constructs. *J Biomech Eng.* 2009;131:044501.
- [83] Bouët G. MD, Cruel M., Laurent C., Molimard J., Navarro L., Louis F., Laroche N., Linossier M.T., Vico L., Malaval L. Validation of a new engineered 3D cell culture system *in vitro* for bone tissue engineering under mechanical stimulation. *Tissue Engineering Submitted.*
- [84] Davies CM, Jones DB, Stoddart MJ, Koller K, Smith E, Archer CW, et al. Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater.* 2006;11:57-75; discussion
- [85] Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *Journal of biomechanics.* 2008;41:1095-103.
- [86] Boutahar N, Guignandon A, Vico L, Lafage-Proust MH. Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation. *J Biol Chem.* 2004;279:30588-99.
- [87] Wang JG, Miyazu M, Xiang P, Li SN, Sokabe M, Naruse K. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Sci.* 2005;76:2817-25.
- [88] Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:640-8.

- [89] Bakker AD, Joldersma M, Klein-Nulend J, Burger EH. Interactive effects of PTH and mechanical stress on nitric oxide and PGE2 production by primary mouse osteoblastic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E608-13.
- [90] Danciu TE, Adam RM, Naruse K, Freeman MR, Hauschka PV. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett.* 2003;536:193-7.
- [91] Aspenberg P, Basic N, Tagil M, Vukicevic S. Reduced expression of BMP-3 due to mechanical loading: a link between mechanical stimuli and tissue differentiation. *Acta Orthop Scand.* 2000;71:558-62.
- [92] Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1084-95.
- [93] Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2004;75:396-404.
- [94] Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281:31720-8.
- [95] Chelina AJ, Reddi AH, Martin RB. Bone morphogenetic protein-7 selectively enhances mechanically induced bone formation. *Bone.* 2002;31:570-4.
- [96] Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ. Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J Biol Chem.* 2006;281:9576-88.
- [97] Sukharev S, Corey DP. Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. *Sci STKE.* 2004;2004:re4.
- [98] Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol.* 2005;7:179-85.
- [99] Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:3509-13.
- [100] Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res.* 2013;319:75-87.
- [101] Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology.* 1998;8:437-41.
- [102] Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of Cell Science.* 2003;116:2377-88.
- [103] Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature.* 2009;462:433-41.
- [104] Owen SC, Shoichet MS. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2010;94A:1321-31.
- [105] Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:297-303.
- [106] Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30:546-54.
- [107] Heljak MK, Swieszkowski W, Lam CXF, Hutmacher DW, Kurzydowski KJ. Evolutionary design of bone scaffolds with reference to material selection. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering.* 2012;28:789-800.
- [108] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21:2529-43.
- [109] Oh S, Oh N, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for Tissue Engineering Applications-A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2006;2:49-56.

- [110] Shepherd JH, Best SM. Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair. *Jom*. 2011;63:83-92.
- [111] van Griensven M, Diederichs S, Roeker S, Boehm S, Peterbauer A, Wolbank S, et al. Mechanical Strain Using 2D and 3D Bioreactors Induces Osteogenesis: Implications for Bone Tissue Engineering. In: Kasper DC, Griensven PMv, Pörtner DR, editors. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 95-123.
- [112] Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002;23:4095-103.
- [113] Anselme K. Biomaterials and interface with bone. *Osteoporosis International*. 2011;22:2037-42.
- [114] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17:137-46.
- [115] Rawsterne RE, Todd SJ, Gough JE, Farrar D, Rutten FJM, Alexander MR, et al. Cell spreading correlates with calculated logP of amino acid-modified surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2007;3:715-21.
- [116] Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Hutmacher DW. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*. 2012;37:1079-104.
- [117] Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*. 2011;48:171-81.
- [118] Abousleiman RI, Sikavitsas VI. Bioreactors for Tissues of the Musculoskeletal System. In: Fisher JP, editor. *Tissue Engineering*: Springer US; 2007. p. 243-9.
- [119] Melchels FPW, Barradas AMC, van Blitterswijk CA, de Boer J, Feijen J, Grijpma DW. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:4208-17.
- [120] Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, Zeppetelli S, Netti PA. Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(epsilon-Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation *In vitro*. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16:2661-73.
- [121] Pecqueux F, Tancret F, Payraudeau N, Bouler JM. Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment. *Journal of the European Ceramic Society*. 2010;30:819-29.
- [122] Chen YH, Zhou SW, Li Q. Microstructure design of biodegradable scaffold and its effect on tissue regeneration. *Biomaterials*. 2011;32:5003-14.
- [123] Marcos-Campos I, Marolt D, Petridis P, Bhumiratana S, Schmidt D, Vunjak-Novakovic G. Bone scaffold architecture modulates the development of mineralized bone matrix by human embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2012;33:8329-42.
- [124] McClelland RE, Cogger RN. Use of micropathways to improve oxygen transport in a hepatic system. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*. 2000;122:268-73.
- [125] Galois L, Mainard D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes : An experimental study. *Acta Orthopaedica Belgica*. 2004;70:598-603.
- [126] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2008;26:434-41.
- [127] Lee JS, Cha HD, Shim JH, Jung JW, Kim JY, Cho DW. Effect of pore architecture and stacking direction on mechanical properties of solid freeform fabrication-based scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:1846-53.
- [128] Kapfer SC, Hyde ST, Mecke K, Arns CH, Schroder-Turk GE. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32:6875-82.
- [129] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*. 2004;6:483-95.
- [130] Olivares AL, Marshal E, Planell JA, Lacroix D. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:6142-9.

- [131] Kim J, Ma T. Bioreactor Strategy in Bone Tissue Engineering: Pre-Culture and Osteogenic Differentiation Under Two Flow Configurations. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18:2354-64.
- [132] Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006;27:3230-7.
- [133] Silva MMCG, Cyster LA, Barry JJA, Yang XB, Oreffo ROC, Grant DM, et al. The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2006;27:5909-17.
- [134] Cipitria A, Lange C, Schell H, Wagermaier W, Reichert JC, Hutmacher DW, et al. Porous scaffold architecture guides tissue formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012;27:1275-88.
- [135] Roosa SMM, Kempainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;92A:359-68.
- [136] von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grunenfelder S, van Lenthe GH, Muller R, et al. *In vivo* behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*. 2006;27:5186-98.
- [137] Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and *in vivo* performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials*. 2002;23:1283-93.
- [138] Gray C, Boyde A, Jones SJ. Topographically induced bone formation *in vitro*: implications for bone implants and bone grafts. *Bone*. 1996;18:115-23.
- [139] Levensgood SKL, Polak SJ, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Jamison RD, et al. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2010;31:3552-63.
- [140] Okada S, Ito H, Nagai A, Komotori J, Imai H. Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:591-7.
- [141] Saiz E, Zimmermann EA, Lee JS, Wegst UGK, Tomsia AP. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dental Materials*. 2013;29:103-15.
- [142] Unadkat HV, Hulsman M, Cornelissen K, Papenburg BJ, Truckenmuller RK, Post GF, et al. An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:16565-70.
- [143] Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 2007;28:45-54.
- [144] Chan O, Coathup MJ, Nesbitt A, Ho CY, Hing KA, Buckland T, et al. The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2012;8:2788-94.
- [145] Daculsi G, Layrolle P. Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics *Key Engineering Materials*. 2004;254-256:1005-9.
- [146] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*. 2007;6:997-1003.
- [147] Habibovic P, Yuan HP, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005;26:3565-75.
- [148] Yuan HP, Yang ZJ, Li YB, Zhang XD, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 1998;9:723-6.
- [149] Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annual Review of Materials Research*. 2001;31:357-71.

- [150] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001;22:1241-51.
- [151] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001;22:87-96.
- [152] Levengood SKL, Polak SJ, Poellmann MJ, Hoelzle DJ, Maki AJ, Clark SG, et al. The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:3283-91.
- [153] Li B, Liao XL, Zheng L, Zhu XD, Wang Z, Fan HS, et al. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Acta Biomaterialia*. 2012;8:3794-804.
- [154] Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18:1573-83.
- [155] Liu X, Smith LA, Hu J, Ma PX. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:2252-8.
- [156] Bouler JM, Trecant M, Delecrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of five synthesis parameters on compressive strength. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996;32:603-9.
- [157] Habibovic P, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, et al. Comparison of two carbonated apatite ceramics *in vivo*. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:2219-26.
- [158] Descamps M, Duhoo T, Monchau F, Lu J, Hardouin P, Hornez JC, et al. Manufacture of macroporous beta-tricalcium phosphate bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008;28:149-57.
- [159] Teixeira S, Fernandes H, Leusink A, van Blitterswijk C, Ferraz MP, Monteiro FJ, et al. *In vivo* evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;93A:567-75.
- [160] Sanchez-Salcedo S, Werner J, Vallet-Regi M. Hierarchical pore structure of calcium phosphate scaffolds by a combination of gel-casting and multiple tape-casting methods. *Acta Biomaterialia*. 2008;4:913-22.
- [161] Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA, de Bruijn JD. Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2011;22:97-105.
- [162] ASTM. Standard F2792 - 12a "Terminology for Additive Manufacturing Technologies". ASTM International. West Conshohocken, PA, DOI: 10.1520/F2792-12A , www.astm.org.2012.
- [163] Munch E, Franco J, Deville S, Hunger P, Saiz E, Tomsia AP. Porous ceramic scaffolds with complex architectures. *Jom*. 2008;60:54-8.
- [164] Hubbell JA. *Biomaterials in Tissue Engineering*. Bio-Technology. 1995;13:565-76.
- [165] Hutmacher DW, Goh JCH, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Annals Academy of Medicine Singapore*. 2001;30:183-91.
- [166] Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*. 2000;33:94-101.
- [167] Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24:4353-64.
- [168] Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In: Polak SBAJ, editor. *StemBook2008*.
- [169] Arinze TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005;26:3631-8.
- [170] Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31 Suppl 4:37-47.
- [171] Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2347-59.

- [172] Zhao L, Chang J. Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15:625-9.
- [173] Barralet J, Akao M, Aoki H. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:176-82.
- [174] Spence G, Patel N, Brooks R, Bonfield W, Rushton N. Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92:1292-300.
- [175] Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:1882-94.
- [176] Bohner M. Silicon-substituted calcium phosphates - A critical view. *Biomaterials*. 2009;30:6403-6.
- [177] Hing KA, Wilson LE, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine Journal*. 2007;7:475-90.
- [178] Marchat D, Bouët G, Lueckgen A, Zymelka M, Malaval L, Szenknect S, et al. Physico-Chemical Characterization and *In vitro* Biological Evaluation of Pure SiHA for Bone Tissue Engineering Application. *Key Engineering Materials*. 2013;529-530:351-6.
- [179] Marchat D, Zymelka M, Coelho C, Gremillard L, Joly-Pottuz L, Babonneau F, et al. Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomaterialia*. 2013.
- [180] Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:376-82.
- [181] Soletti L, Nieponice A, Guan J, Stankus JJ, Wagner WR, Vorp DA. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials*. 2006;27:4863-70.
- [182] Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res*. 1998;240:58-65.
- [183] Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng*. 1999;64:580-9.
- [184] Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998;19:1405-12.
- [185] Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng*. 1998;57:46-54.
- [186] Li Y, Ma T, Kniss DA, Lasky LC, Yang ST. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol Prog*. 2001;17:935-44.
- [187] Burg KJ, Delnomdedieu M, Beiler RJ, Culberson CR, Greene KG, Halberstadt CR, et al. Application of magnetic resonance microscopy to tissue engineering: a polylactide model. *J Biomed Mater Res*. 2002;61:380-90.
- [188] Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;33:15-30.
- [189] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81:685-96.
- [190] Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB, et al. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng*. 2002;80:73-83.
- [191] Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells*. 2006;24:65-73.
- [192] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:4783-8.

- [193] Zhao F, Pathi P, Grayson W, Xing Q, Locke BR, Ma T. Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: experiments and mathematical model. *Biotechnol Prog.* 2005;21:1269-80.
- [194] Zahm AM, Bucaro MA, Ayyaswamy PS, Srinivas V, Shapiro IM, Adams CS, et al. Numerical modeling of oxygen distributions in cortical and cancellous bone: oxygen availability governs osteonal and trabecular dimensions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C922-9.
- [195] Deorosan B, Nauman EA. The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2011:429187.
- [196] Rolfe P. Sensing in tissue bioreactors. *Measurement Science and Technology.* 2006;17:578.
- [197] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983;96:191-8.
- [198] Chou YF, Dunn JC, Wu BM. *In vitro* response of MC3T3-E1 pre-osteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;75:81-90.
- [199] Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, et al. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2003;72:537-47.
- [200] Saldana L, Bensiamar F, Bore A, Vilaboa N. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater.* 2011;7:4210-21.
- [201] Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224:1487-507.
- [202] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
- [203] Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells *in vivo*. *Exp Cell Res.* 2003;287:16-27.
- [204] De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928-42.
- [205] De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1209-21.
- [206] Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone.* 2002;30:699-704.
- [207] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-28.
- [208] Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res.* 2006;41:303-10.
- [209] Charbord P, Livne E, Gross G, Haupl T, Neves NM, Marie P, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Rev.* 7:32-42.
- [210] Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine.* 2013;19:35-42.
- [211] Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M. Contractile forces generated by articular chondrocytes in collagen-glycosaminoglycan matrices. *Biomaterials.* 2004;25:1299-308.
- [212] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986;38:143-54.
- [213] Burger EH, Boonekamp PM, Nijweide PJ. Osteoblast and osteoclast precursors in primary cultures of calvarial bone cells. *The Anatomical record.* 1986;214:32-40.

- [214] Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *Apmis*. 1995;103:140-6.
- [215] Wong GL. Bone cell cultures as an experimental model. *Arthritis Rheum*. 1980;23:1081-6.
- [216] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13:81-8.
- [217] Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A, Hata J. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol*. 1992;151:197-205.
- [218] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002;30:783-91.
- [219] Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*. 2003;21:527-35.
- [220] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7260-4.
- [221] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-76.
- [222] Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, Barbeck M, Kolbe M, Hofmann A, et al. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on *in vivo* vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 2009;30:526-34.
- [223] Yu H, VandeVord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*. 2009;30:508-17.
- [224] Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. 2008;43:976-82.
- [225] Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical biochemistry*. 2012;45:863-73.
- [226] Peters MC, Polverini PJ, Mooney DJ. Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:668-78.
- [227] Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature*. 2004;428:138-9.
- [228] Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*. 2008;111:4551-8.
- [229] Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S, et al. Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng*. 2006;12:1721-31.
- [230] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26:434-41.
- [231] Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C775-85.
- [232] Meury T, Verrier S, Alini M. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts *in vitro* by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem*. 2006;98:992-1006.
- [233] Grellier M, Bordenave L, Amedee J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2009;27:562-71.
- [234] Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng*. 2006;12:2685-93.



- [235] Clarkin CE, Garonna E, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. Heterotypic contact reveals a COX-2-mediated suppression of osteoblast differentiation by endothelial cells: A negative modulatory role for prostanoids in VEGF-mediated cell: cell communication? *Exp Cell Res*. 2008;314:3152-61.
- [236] Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *Faseb J*. 2005;19:665-7.
- [237] Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, Bareille R, Guillemot F, Amedee J. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2009;106:390-8.
- [238] Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:684-92.
- [239] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone*. 2008;42:1080-91.
- [240] Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G, Yang B. *In vitro* and *in vivo* effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomedical engineering online*. 2007;6:41.
- [241] Tortelli F, Pujic N, Liu Y, Laroche N, Vico L, Cancedda R. Osteoblast and osteoclast differentiation in an *in vitro* three-dimensional model of bone. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2373-83.
- [242] Papadimitropoulos A, Scherberich A, Guven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F, et al. A 3D *in vitro* bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater*.21:445-58; discussion 58.
- [243] Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, Martin I. Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing. *Adv Mater*. 2009;21:3352-67.
- [244] Zhao F, Ma T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91:482-93.
- [245] Zhao F, Grayson WL, Ma T, Irsigler A. Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds. *J Cell Physiol*. 2009;219:421-9.
- [246] Porter B, Zauel R, Stockman H, Guldberg R, Fyhrie D. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. *Journal of biomechanics*. 2005;38:543-9.
- [247] Cioffi M, Boschetti F, Raimondi MT, Dubini G. Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs: a micro-CT based model. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:500-10.
- [248] Song K, Wang H, Zhang B, Lim M, Liu Y, Liu T. Numerical simulation of fluid field and *in vitro* three-dimensional fabrication of tissue-engineered bones in a rotating bioreactor and *in vivo* implantation for repairing segmental bone defects. *Cell Stress Chaperones*. 2013;18:193-201.
- [249] McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, Prendergast PJ. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses--a computational and experimental study. *Faseb J*. 2005;19:482-4.
- [250] Jungreuthmayer C, Jaasma MJ, Al-Munajjed AA, Zanghellini J, Kelly DJ, O'Brien FJ. Deformation simulation of cells seeded on a collagen-GAG scaffold in a flow perfusion bioreactor using a sequential 3D CFD-elastostatics model. *Med Eng Phys*. 2009;31:420-7.
- [251] Milan JL, Planell JA, Lacroix D. Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid-calcium phosphate glass scaffold. *Biomaterials*. 2009;30:4219-26.

- [252] Sandino C, Lacroix D. A dynamical study of the mechanical stimuli and tissue differentiation within a CaP scaffold based on micro-CT finite element models. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2011;10:565-76.
- [253] Yang Y, Dubois A, Qin XP, Li J, El Haj A, Wang RK. Investigation of optical coherence tomography as an imaging modality in tissue engineering. *Phys Med Biol*. 2006;51:1649-59.
- [254] Liang X, Graf BW, Boppart SA. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography. *J Biophotonics*. 2009;2:643-55.
- [255] Kasseck C, Kratz M, Torcasio A, Gerhardt NC, van Lenthe GH, Gambichler T, et al. Comparison of optical coherence tomography, microcomputed tomography, and histology at a three-dimensionally imaged trabecular bone sample. *J Biomed Opt*. 15:046019.
- [256] Cartmell S, Huynh K, Lin A, Nagaraja S, Guldborg R. Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69:97-104.
- [257] Cancedda R, Cedola A, Giuliani A, Komlev V, Lagomarsino S, Mastrogiacomo M, et al. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials*. 2007;28:2505-24.
- [258] Bernhardt R, Scharnweber D, Muller B, Thurner P, Schliephake H, Wyss P, et al. Comparison of microfocus- and synchrotron X-ray tomography for the analysis of osteointegration around Ti6Al4V implants. *Eur Cell Mater*. 2004;7:42-51; discussion
- [259] Nuzzo S, Peyrin F, Cloetens P, Baruchel J, Boivin G. Quantification of the degree of mineralization of bone in three dimensions using synchrotron radiation microtomography. *Med Phys*. 2002;29:2672-81.
- [260] Komlev VS, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Cancedda R, Rustichelli F. X-ray synchrotron radiation pseudo-holotomography as a new imaging technique to investigate angio- and microvasculogenesis with no usage of contrast agents. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15:425-30.
- [261] Cartmell SH, Rathbone S, Jones G, Hidalgo-Bastida LA. 3D sample preparation for orthopaedic tissue engineering bioreactors. *Methods in molecular biology*. 2011;695:61-76.
- [262] Van Dyke WS, Sun X, Richard AB, Nauman EA, Akkus O. Novel mechanical bioreactor for concomitant fluid shear stress and substrate strain. *Journal of biomechanics*. 2012;45:1323-7.
- [263] Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2003;275:1081-101.
- [264] Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone and mineral*. 1987;2:73-85.

*2e Chapitre*    **Objectifs de la thèse**

---

Nous avons vu que la BSP jouait des rôles multiples et distincts dans le développement, le remodelage et la minéralisation de l'os où elle est fortement exprimée. Après avoir étudié l'effet de la BSP au niveau de l'organisme entier (Malaval *et al.* 2008), nous avons voulu identifier l'influence de cette SIBLING au niveau cellulaire. Nous avons dans un premier temps analysé l'effet de l'absence de BSP sur l'ostéogénèse *in vitro* à partir de cellules de calvaria (MCC). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un premier article scientifique présenté dans la [partie A du 3<sup>ème</sup> chapitre](#). Cet article n'a pour l'heure pas été soumis. Les résultats ont notamment montré que le phénotype des cellules mutantes varie avec leur densité de repiquage, et donc que les effets de la mutation sur l'ostéogénèse sont dépendants de l'environnement des cellules osseuses.

Ceci a plus particulièrement mis en évidence les limites d'un modèle de culture cellulaire classique (2D). D'autre part, cete étude avait pour but d'investiguer *in vitro* l'effet de l'absence de BSP sur la réponse des cellules aux contraintes mécaniques. Pour toutes ces raisons, nous avons développé un modèle de culture cellulaire en 3D pouvant être stimulé mécaniquement et permettant la formation d'os *in vitro*. Le bioréacteur développé par le Dr Jones et son équipe et faisant partie du système ZetOs™, nécessitait des améliorations pour pouvoir réaliser des cultures supérieures à 7 jours, comme conclu dans la thèse de Virginie Dumas (LBTO, 2010). Nous avons ainsi mis au point un nouveau bioréacteur permettant la culture à long terme de un ou plusieurs types cellulaires dans un substitut osseux macroporeux perfusé et soumis à des contraintes mécaniques via le système ZetOs™. Afin d'améliorer l'application des contraintes sur la biocéramique macroporeuse, sa perfusion et sa capacité à résister aux sollicitations mécaniques, nous avons privilégié une architecture cubique possédant une partie dense sur ses faces externes non perfusées. L'étape suivante à consistée à valider ce système tant au niveau de la composante biologique (colonisation, survie, formation osseuse), du biomatériau (dimensions, architecture, physico-chimie), qu'au niveau de la composante mécanique (modélisation des contraintes mécaniques dans le substitut osseux). Ce travail a été détaillé dans un deuxième article scientifique présenté au [3<sup>ème</sup> chapitre, partie B](#) et soumis à la revue *Biomaterials*. Enfin, la finalité de ce travail étant d'évaluer l'effet des contraintes mécaniques et de la BSP sur le devenir cellulaire, nous avons réalisés des expériences préliminaires dans notre système de culture cellulaire en 3D *in vitro* avec des cellules primaires sauvages et KO pour la BSP. Dans un premier temps, nous avons cultivés les cellules KO pour la BSP dans ce modèle afin de les comparer aux sauvages en vue de les stimuler mécaniquement par la suite. Et dans un deuxième temps, nous avons étudié la réponse des cellules sauvages à la contrainte mécanique. Ces premiers résultats ont montré que les MCC BSP-/- cultivées dans le bioréacteur avaient le même comportement que les cellules sauvages, et confirment en 3D la surexpression génique de l'OPN par les cellules BSP-/- observées en 2D.

*3e Chapitre*    **Travaux expérimentaux**

---

## A. Ostéogenèse *in vitro* en culture de cellules primaires de calvaria de souris - Effets de l'extinction génique de la sialoprotéine osseuse (BSP)

### A.1. Article 1

#### ***The impairment of osteogenesis in BSP knockout bone cell cultures is cell density dependent***

Bouët G.<sup>1</sup>, Bouleftour W.<sup>1</sup>, Thomas M.<sup>1</sup>, Vanden Bossche A.<sup>1</sup>, Aubin JE.<sup>2</sup>, Vico L.<sup>1</sup>, Marchat D.<sup>3</sup>, Malaval L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1059, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, SFR IFRESIS, Université de Lyon and Université Jean Monnet, St-Etienne, F-42023 France

<sup>2</sup>Dept. of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

<sup>3</sup>Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Center for Health Engineering, SFR IFRESIS, Saint-Etienne F-42023, France

**Article en préparation**

**Abstract**

Bone sialoprotein (BSP) belongs to the "small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein" (SIBLING) family, whose members interact with bone cells and bone mineral. BSP is strongly expressed in bone and we previously showed that BSP knockout (BSP<sup>-/-</sup>) mice have a higher bone mass than wild type (BSP<sup>+/+</sup>) littermates, with lower bone remodelling.

The delayed ossification and suture closure of BSP<sup>-/-</sup> mouse calvaria during development led us to study the impact of the absence of BSP on *in vitro* osteogenesis in mouse calvaria cell (MCC) cultures. MCC BSP<sup>-/-</sup> cultures exhibit fewer fibroblast (CFU-F), preosteoblast (CFU-ALP) and osteoblast colonies (bone nodules) than wild type, indicative of a lower number of osteoprogenitors. No mineralized colonies were observed in BSP<sup>-/-</sup> cultures, along with little/no expression of either osteogenic markers or SIBLING proteins MEPE or DMP1. At higher plating density, the effects of the absence of BSP were partly rescued, with resumed expression of osteoblast markers and cognate SIBLING proteins, and mineralization of the culture. Osteopontin (OPN) is the only SIBLING expressed in standard density BSP<sup>-/-</sup> culture, at higher levels than in wild type, it and might be responsible for the inhibition of mineralization. Preliminary data suggest that PHEX and/or FGF23 might also be involved in the mechanisms explaining this phenotype.

Taken together, our results show that BSP regulates mouse calvaria osteoblast cell clonogenicity, differentiation and activity *in vitro*, consistent with low levels of bone formation *in vivo*. The BSP knockout bone microenvironment may alter the proliferation/cell fate of early osteoprogenitors.

**Keywords :** SIBLING, bone sialoprotein, mouse calvaria cells, osteoblastic differentiation, mineralization

## Introduction

The SIBLING (Small Integrin Binding N-Linked Glycoproteins) are a family of extracellular matrix (ECM) targeted factors highly expressed in bone and dentin and which comprise BSP (Bone Sialoprotein), OPN (osteopontin), MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein), DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) and DSPP (Dentin Sialophosphoprotein). The SIBLING genes are aligned together in human chromosome 4 and mouse chromosome 5, in a region called the “bone gene cluster” [1, 2]. These proteins all display a disordered structure and most present a large number of acidic amino acids in their sequence, favoring interactions with crystals [3]. They share multiple conserved sites such as an Arg-Gly-Asp (RGD) motif, an Acidic Serine and Aspartate Rich Motif (ASARM) and many phosphorylation sites [4]. The SIBLING play multiple and distinct roles in bone development, remodeling, healing and mineralization [4], and their specific knockouts show distinct phenotypes [5-10]. All SIBLING proteins undergo important post-translational modifications, such as phosphorylation, glycosylation, sulfatation as well as proteolytic cleavage which modify/determine their functions [11, 12]. In particular, protein cleavage can generate bioactive fragments acting locally within the ECM, such as the ASARM peptide [13, 14]. The ASARM motif of MEPE is cleaved by cathepsin B (CatB) and its free form inhibits mineralization [15]. PHEX, an endopeptidase expressed mainly in bone and dentin [16, 17], binds to the ASARM motif and prevents MEPE cleavage by CatB [18, 19]. PHEX was shown to bind free ASARM (from MEPE and OPN) as well, neutralize its activity through hydrolysis and thus abolish its inhibitory action on mineralization [13, 20, 21]. OPN is known to be a mineralization inhibitor by binding to the apatitic mineral crystals in bone [22, 23]. Full-length, phosphorylated OPN [24] as well as its phosphorylated peptides [14] inhibits mineralization in osteoblast cultures and *in vivo* [25, 26]. In register with its anti-ASARM properties, PHEX was recently shown to degrade extensively full-length OPN, including the ASARM motif [27] and would thus be expected to antagonize the inhibitory activity of OPN on mineralization. Studies on DMP1<sup>-/-</sup> and HYP (hypophosphatemic) mice (with no active PHEX), model of XLH (X-linked hypophosphatemia) disease, provide evidence to link bone mineralization and the expression of FGF23, a circulating phosphaturic hormone [28-30]. In DMP1<sup>-/-</sup> and HYP mice as well as XLH patients excessive circulating levels of FGF23 are responsible for several clinical characteristics, including rickets and impaired mineralization of the extracellular matrix, leading to osteomalacia [29, 31]. Studies by Martin et al. [32] suggest that simultaneous DMP1 binding to integrin  $\alpha\beta3$  (through RGD) and membrane-bound PHEX (through ASARM) would inhibit FGFR signaling, thus reducing FGF23 production and stimulating bone formation/mineralization [33].

OPN and BSP are highly expressed by osteoblasts, osteoclasts and hypertrophic chondrocytes, and BSP is particularly abundant in sites of primary bone formation [34]. BSP is a potent mineralization nucleator [35] but also a matrix-associated signal promoting osteoblast differentiation as well as increased production of a mineralized matrix [36]. We previously characterized extensively adult BSP knockout (BSP<sup>-/-</sup>) mice, and showed that they



have a very low bone formation activity respective to wild type (BSP+/+, [10]). Indeed, the number of osteoblastic, mineralized colonies (CFU-OB) is dramatically lower in BSP-/- bone marrow cultures [10]. Nonetheless, mutant mice display an overall normal skeleton and indeed a higher trabecular bone mass than the BSP+/+ [10], due to impaired osteoclasts recruitment and activity [37]. In the present study, we asked how normal bone could be observed after deletion of a protein which appears *in vitro* as a limiting factor for osteoblastogenesis/mineralized matrix production. Because of the complex cellular composition of marrow culture, we studied *in vitro* osteogenesis in cultures of calvaria cells (CC) isolated from BSP+/+ and BSP-/- six day old mice by collagenase digestion. We show in this cell culture model that BSP-/- bone cell cultures display a constitutive impairment of osteogenesis, resulting in part from a defect in osteoprogenitor numbers, and which is partly rescued by a higher cell density. Preliminary data suggest that OPN, PHEX, and/or FGF23 might be involved in the mechanisms leading to this phenotype.

## **Material and Methods**

### *Production of BSP -/- mice*

BSP Knock-out mice were generated as described in Malaval et al. [10]. Briefly, exons II-III of the mouse *lbsp* gene were replaced by a PGKneo cassette that created a null allele in mouse embryonic stem (ES) cells (R1 passage 8; kindly provided by Dr. Andras Nagy [38]). After selection, positive clones were used to generate chimeric mice which were crossed to albino CD1 outbred females, and a chimeric male with germline transmission of the mutation was used to establish offspring on a 129sv/CD1 background. BSP-/- mice are viable and fertile; their phenotype has been extensively described [10, 37, 39-41].

### *Care of animals*

The mice were housed and bred in the PLEXAN facility of the Université Jean Monnet medical faculty (Saint-Etienne, France) at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  on a 12-h light, 12-h dark cycle, fed with A03 food (Scientific Animal Food and Engineering, Aury, France) and given tap water with free access. For bone marrow cultures, 2 month old mice were killed by cervical dislocation, and their long bones were dissected out. For calvaria cell preparation, six days old mice were killed by decapitation, and their skull caps (calvarium) were dissected out. Bone samples were immediately processed in sterile conditions, as described below. The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Union standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Nr 90SV08). The animal experiments were approved by the local Animal Care Committee.

### *Cell isolation and culture*

Primary mouse calvaria cells (MCC) were isolated from skull bones of neonatal (5-day-old) mice (129sv/CD1) by an enzymatic digestion process. The calvaria were dissected-out, and all connective tissues were carefully removed. The samples were cleaned, cut in two halves along the sagittal suture and pooled [42]. The fragments were then digested at 37°C in 0.4% type I collagenase (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in Ham's F-12 Nutrient Mixture (Sigma), under gentle stirring. The first 5 min digest was discarded. Six consecutive extractions (5 to 20 min) were performed. After centrifugation, calvaria cells were collected and expanded for one day in T-75 flasks in minimum essential medium eagle (Sigma) containing 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50 µg/ml streptomycin (Sigma), and 10% fetal calf serum (FCS), hereafter referred to as "culture medium". After 24h, the cells were trypsinized and plated at very low density (50 cells/cm<sup>2</sup>) for isolated colonies assay, or at standard (5 000 cells/cm<sup>2</sup>), or high density (25 000 cells/cm<sup>2</sup>) for dense cultures. Bone marrow cells were flushed-out from cleaned long bones in culture medium, using a syringe fitted with a 21G needle, and grown in a T75 flask for one week. Cell were then trypsinized, counted and plated at 5000/cm<sup>2</sup> in 96 well plates for MTT assay and in T25 flasks for ALP-positive colony counting.

For osteogenesis, the culture medium was supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma) and 10 mM beta-glycerophosphate (Sigma). Cell culture was performed at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every two or three days. In some cultures, a specific cathepsin B inhibitor (CA074, Sigma), was added continuously or by time windows to the culture medium, at doses ranging from 1 to 100 µg/mL. In other experiments, a specific inhibitor of FGFR1 (SU5402, Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, CA, USA, 10µM) was added to the culture starting at day (D)6. Arrested cultures were fixed with buffered PFA, or extracted with appropriate medium for QRT-PCR or protein analysis (see below). Mineralized colonies were stained with the Von Kossa procedure. Labeling for ALP-positive cells was performed according to the manufacturer's instruction (kit 85L2, Sigma).

### *Cell adhesion assay*

Thirty minutes, 1h and 2 h after plating, calvaria cells were washed twice with PBS to rinse off unattached cells, fixed with 4% PFA, stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Chemicon, Temecula, CA, 0,1µg/mL), and the nuclei counted under a fluorescent microscope (DMRB, Zeiss, Le Pecq, France).

### *Growth, proliferation and apoptosis assays*

Cell growth curves from day 1 to day 13 were established using the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) viability assay (Sigma). The cells were incubated (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) with 0.5 mg/ml MTT for 4 h, then DMSO (Sigma) was added for crystal solubilisation before reading the optical density (OD) of the product at 540nm.

The linearity of formazan production was verified with cells plated at known densities (not shown). To assay for proliferation, two techniques were used. Calvaria cells were grown on glass coverslips (10mm diameter) in multiwell plates fixed, permeabilized and immunolabeled for the proliferation marker Ki67 (Sigma) using the horseradish peroxidase Vectastain kit (AbCys, Paris, France) according to the manufacturer's instructions and a DAB substrate kit (AbCys). Ki67 positive and negative nuclei were then counted in 10 fields per coverslips (n=6 coverslips/genotype) using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and their number was normalized to the total number of nuclei. In other dishes, a colorimetric immunoassay was used based on the measurement of BrdU (pyrimidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation (Cell proliferation ELISA BrdU kit, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Apoptosis was assayed by fluorescent transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay using the ApoTag PLUS Fluorescein In Situ Apoptosis Detection kit (Serologicals, Norcross, GA, USA). As a positive control, some wells were incubated with  $10^{-8}$  M dexamethasone overnight prior to the assay.

#### *mRNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction*

Total RNA was extracted from calvaria cell cultures grown for 3, 6, 14 and 17 days, using TRI Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the extracts were centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C to remove cell debris. Chloroform was added to separate the aqueous phase containing RNA from the interphase and the organic phase. The aqueous phase was recovered and precipitated with isopropanol. The RNA pellets were then washed in 70% ethanol in RNase-free water. Finally, after air-drying of 1-2 min, purified RNA pellets were dissolved in RNase-free water and RNA concentration was assessed with the Ribogreen kit (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA). RNA quality was checked with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Samples were stored at -80°C until used. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with the iScript™ cDNA Synthesis kit for Thermocycler (BIO-RAD) according to the manufacturer's instruction. For QRT-PCR, 0,04µg of cDNA mixture were prepared for CFX96™ (BIO-RAD), real time PCR detection system, using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche). Primer sequences and full names of the markers are listed in Table 1. For each gene, expression levels were normalized to cyclophilin A expression; cyclophilin A expression did not change during the culture time-course the conditions used (not shown). Amplified products were examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1 µg/ml ethidium bromide and DNA molecular weight marker.

**Table 1. Oligonucleotides sequences used in QRT-PCR.**

Genes	Forward	Reverse	Product size (pb)	Source
Runx2	ccgggaatgatgagaactac	tgtctgtgccttcttggttc	223	NM_009820.4
OSX	atggcgtcctctctgcttg	aaggtcagcgtatggcttct	153	NM_130458.3
Col1a1	caccctcaagagcctgagtc	ttaggcgcaggaaggtcagc	374	NM_007742.3
OPN	cccggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc	193	NM_009263.2
ALP	agttactggcgacagcaagc	ggacctgagcgttggtgta	244	NM_007431.2
OCN	ctctgacctcacagatgcaa	ctggtctgatagctctgcaca	190	NM_007541.2
BSP	cggaggagacaacggagaag	gtaagtgtgccacagggtc	295	NM_008318.3
DMP1	ttcgagaacttcgctgaggt	ttgtgtatctggcaactgg	135-151	NM_016779.2
MEPE	aggctgtctctgttgactg	ccatcctctgtgccttcac	157	NM_053172.2
Cyclo A	tacacccataatggcactg	ccatggctccacaatgttc	227	NM_008907.1

*Abbreviations:* OSX: osterix ; Col1a1: collagen 1 alpha 1 chain ; OPN: osteopontin ; ALP: alkaline phosphatase ; OCN: osteocalcin; BSP: bone sialoprotein; Cyclo A: Cyclophilin A

### *OPN Immunoassay*

After 6, 14 and 17 days of culture, ELISAs were performed to measure OPN in cell lysate and culture medium using the DuoSet mouse Osteopontin ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were collected in lysis buffer composed of PBS with 0.5% Nonidet 40 and 1% protease inhibition cocktail (PIC, Sigma), 1 $\mu$ L/mL triton (Sigma) and 1,8 mg/mL iodometacin (Sigma). Each sample was run in duplicate in the assays. Data were corrected for fresh culture medium or fresh lysis buffer values and normalized to total protein content of the cell lysate measured with the BCA Protein Assay Kit (Interchim Pierce, Monluçon, France).

### *Statistical analysis*

The STATISTICA<sup>®</sup> software (version 8.2; StataCorp, College Station, TX) was used for statistical analysis. Quantitative data are presented as mean $\pm$ SD. Inter-group differences were tested with the non-parametric Mann-Whitney U-test for all experiments except Ki67 labeling, for which the numbers of positive and negative cells were plotted in a contingency table and compared with a  $\chi^2$  test.

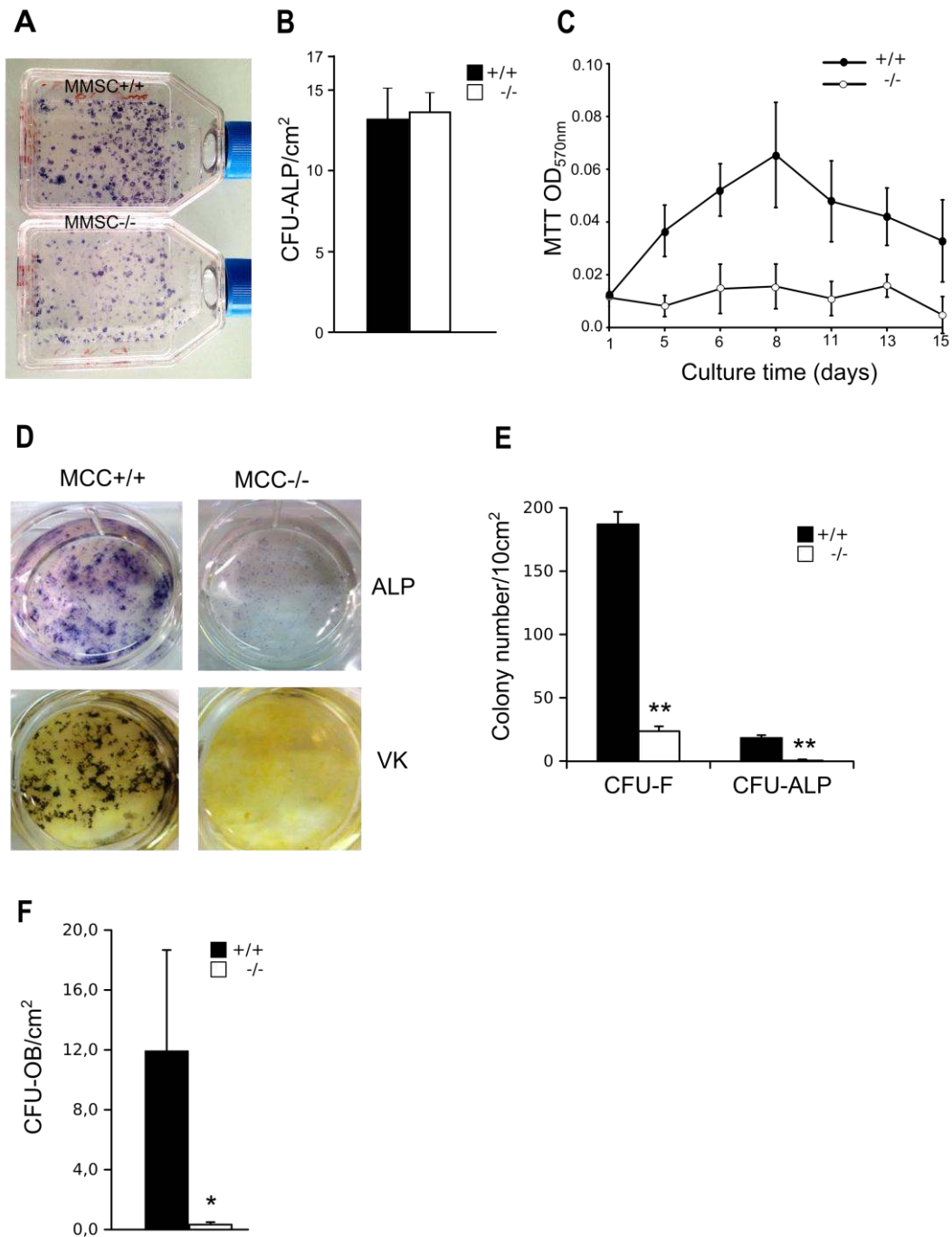
## Results

### *Clonogenicity and osteoblast differentiation in BSP -/- bone marrow and MCC cultures*

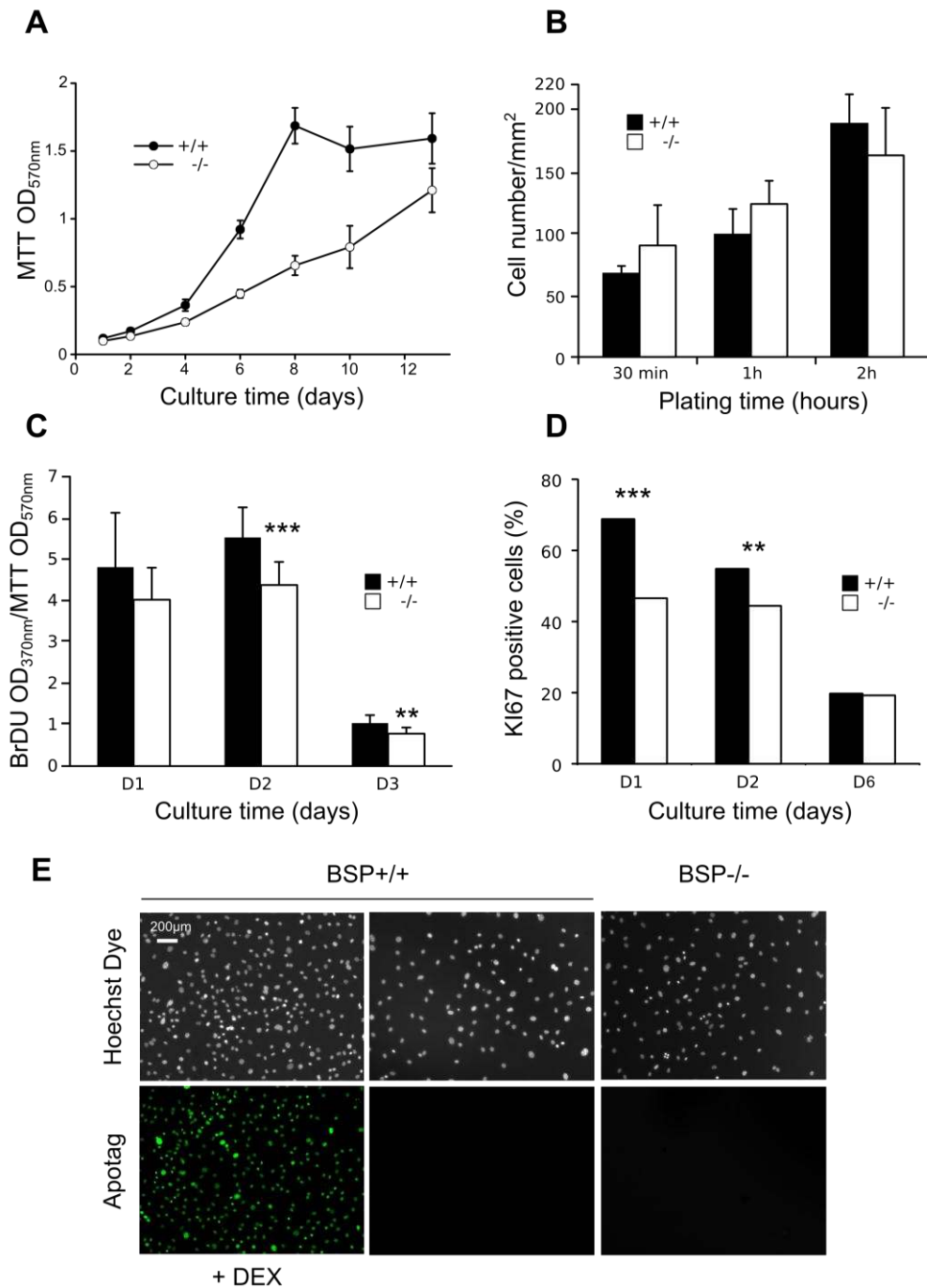
As previously published [43], the number of progenitors (Colony Forming Units, CFU) giving birth to colonies with ALP+ cells but non-mineralized matrix (CFU-ALP) was the same in BSP-/- and BSP+/+ bone marrow cultures (Figs. 1A, B). However, these colonies were clearly smaller in mutant cultures (Fig. 1A) and the MTT assay showed a slower growth in BSP-/- marrow cultures compare to BSP+/+ (Fig. 1C). CFU-fibroblasts (CFU-F) and CFU-ALP numbers were assessed in BSP+/+ and -/- calvaria cell cultures plated at low density ; in contrast to marrow cultures, the total number of CFU-F formed as well as the absolute number and proportion of CFU-ALP were lower in BSP-/- MCC cultures (Fig. 1D). Indeed, ALP staining was much lower in standard density BSP-/- MCC cultures respective to the BSP+/+ (Fig. 1E) and as expected very few Von-Kossa stained, mineralized osteoblast colonies (CFU-OB) were observed in these dishes (Figs. 1E, F).

### *Growth, adhesion, proliferation and apoptosis in calvaria cell cultures from BSP -/- and +/+ mice.*

MTT assay of MCC cultures showed a delayed growth of BSP-/- cells (Fig. 2A). While the rate of MCC adhesion was the same for both genotypes (Fig. 2B), both BrDU incorporation rate (Fig. 2C) and Ki67 labelling (Fig. 2D) showed that BSP-/- MCC cultures exhibit a lower proliferation rate at early culture times and until D6, time at which no difference in proliferation was observed between the two genotypes (Fig. 2D). While high numbers of dexamethasone-induced apoptotic cells were detected in the positive control, no significant levels of apoptosis were observed in BSP+/+ or BSP-/- MCC cultures when assayed at D6 with the TUNEL methods (Fig. 2E).



**Figure 1.** *In vitro* osteoblast differentiation in mouse bone marrow stromal cell (A-C) and mouse calvaria cell (MCC, D-F) cultures. (A) micrographs and (B) quantification of unmineralized, ALP+ colonies (CFU-ALP) in bone marrow stromal cell cultures from BSP -/- and +/+ mice. (C) Time-course of *in vitro* cell growth in BSP+/+ and BSP-/- bone marrow cultures. (D) Micrographs of ALP+ and Von Kossa stained standard cultures. (E) Quantification of total colony forming units-fibroblasts (CFU-F) and CFU-ALP in low density cultures of BSP+/+ and BSP-/- MCC. (F) Quantification of mineralized colonies (CFU-OB) in standard BSP-/- and BSP+/+ MCC cultures. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs BSP+/+.



**Figure 2.** Growth, adhesion, proliferation and apoptosis in calvaria cell cultures of BSP  $-/-$  and  $+/+$  mice. (A) Time-course of *in vitro* cell growth in BSP $+/+$  and BSP $-/-$  MCC cultures. (B) Number of adherent BSP $-/-$  and BSP $+/+$  MCC 30 min, 1 hr and 2 hrs after plating. (C and D) *In vitro* proliferation in BSP $+/+$  and BSP $-/-$  MCC cultures assayed by BrdU (C) and Ki67 (D) techniques. (E) *In vitro* apoptosis in BSP $+/+$  and BSP $-/-$  MCC cultures assayed by TUNEL at D6. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs BSP $+/+$ .

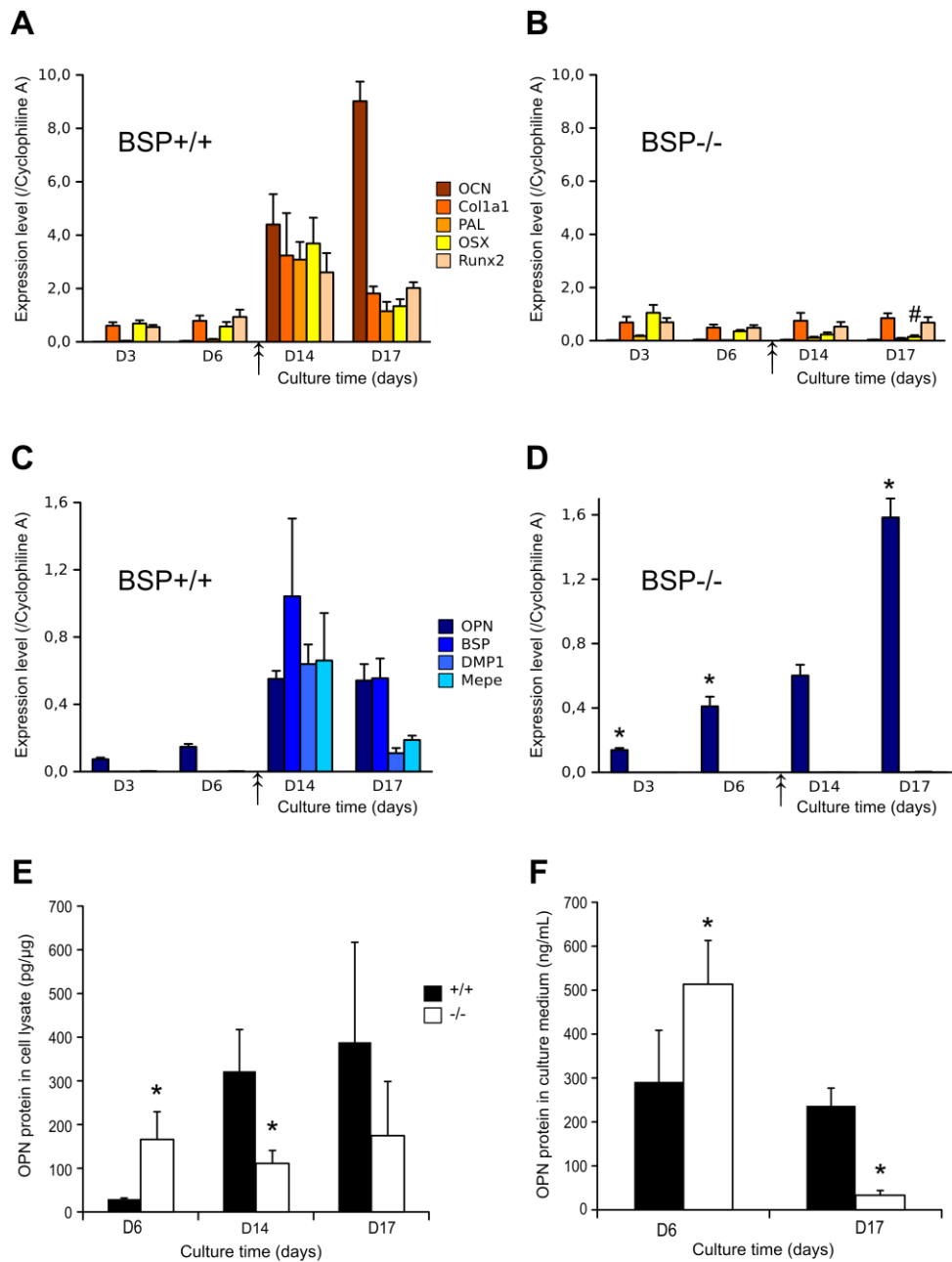
### *Time-course of osteoblast-associated and SIBLING protein expression in osteogenic MCC cultures*

The expression of osteoblast-associated genes was analysed between D3 and D17 of BSP+/+ and BSP-/- MCC culture plated at standard density. Expression levels of most markers assayed were not different between the 2 genotypes at D3 and D6 (Figs. 3A, B). Starting at D14, in coincidence with the appearance of CFU-OB in the cultures, osteoblastic genes ALP, Coll1a1, OSX, Runx2 and the specific mature osteoblast gene OCN were highly expressed in BSP+/+ MCC (Fig. 3A). However, in BSP-/- MCC cultures their expression levels remained the same as at earlier time-points, except for OSX whose levels decreased significantly in late cultures (Fig. 3B). Similarly, most SIBLING mRNA were highly expressed in BSP+/+ MCC starting at D14, with earlier expression at lower levels of OPN at D3 and D6 (Fig. 3C). Strikingly, no significant expression of DMP1 nor MEPE was observed in BSP-/- MCC cultures at any time-point (Fig. 3D). On the other hand, OPN mRNA was overexpressed in early (D3, D6) and late (D17) cultures respective to BSP+/+ cells (Figs. 3C, D). Similar to mRNA expression, OPN protein levels in the cell layer (Fig. 3E) and culture medium (Fig. 3F) of BSP-/- MCC cultures were higher than in BSP+/+ at D6. At D14 and D17 OPN protein amounts in both compartments were lower in mutant cultures than in wild type, despite higher mRNA expression. Additionally, while OPN protein levels in cell lysates were similar from D6 to D17 in BSP-/- dishes, culture medium values decreased significantly at D17 respective to D6 (Fig. 3F).

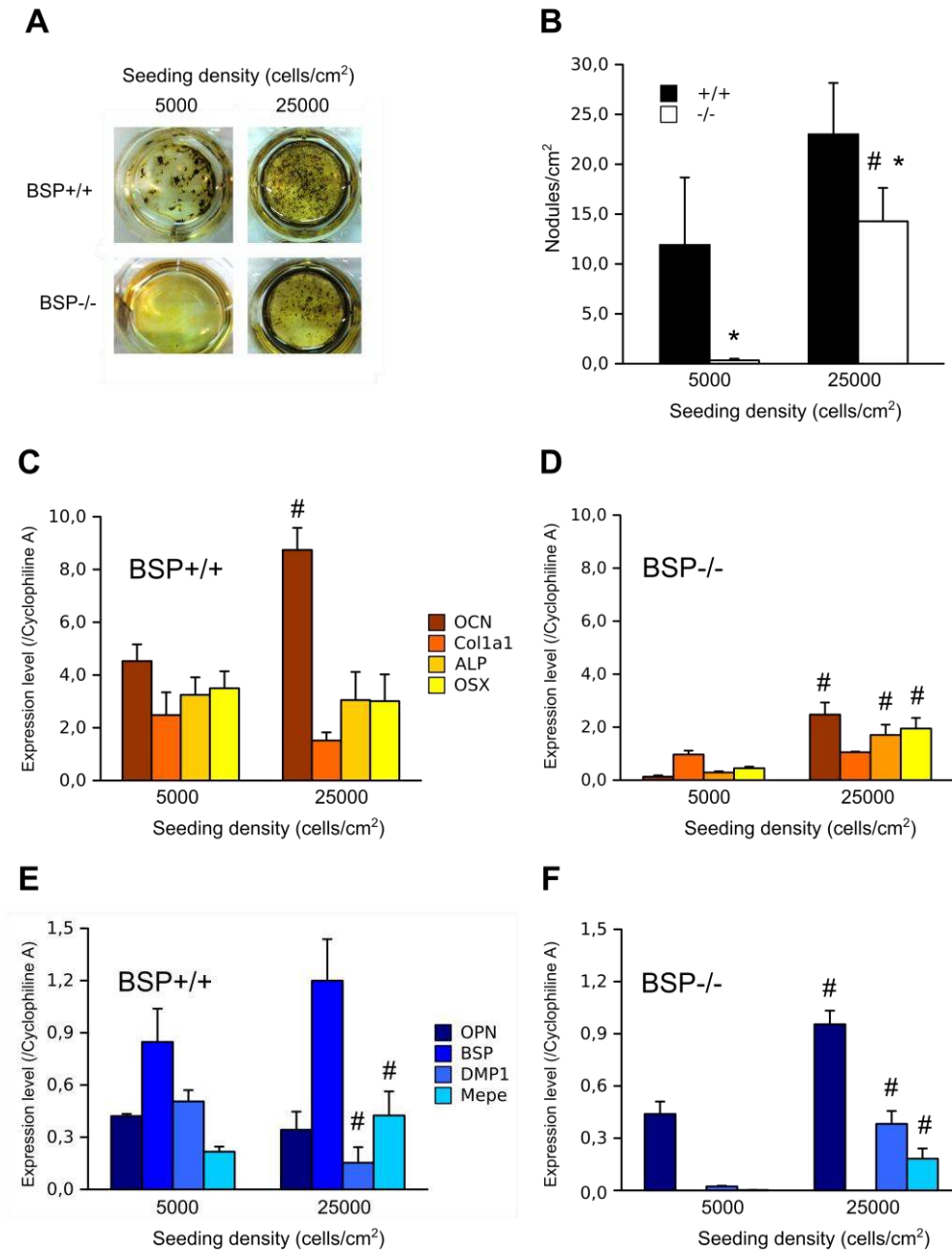
### *Mineralization in high density BSP-/- MCC cultures*

In contrast to low and standard density plating, high density (25000 cell/cm<sup>2</sup>) BSP-/- MCC cultures did form mineralized colonies (Figs. 4A, B). In the BSP+/+, the expression levels of markers did not change between the two conditions, except for increased OCN in high density cultures (Fig. 4C). In contrast, expression of OCN, ALP and OSX increased significantly in BSP-/- high density cultures, although OCN remained well below BSP+/+ values (Fig. 4D). A similar pattern was observed with SIBLING protein expression (Figs. 4E, F). High density culture of BSP+/+ cells did not affect OPN nor BSP expression levels. In contrast, DMP1 expression was decreased, while MEPE expression was increased at high density (Fig. 4E). The mRNA levels of all 3 SIBLING expressed, OPN, DMP1 and MEPE were significantly higher in BSP-/- high density cultures compared to standard (Fig. 4F).





**Figure 3.** Effects of BSP deletion on the time-course of osteoblast marker and SIBLING expression in MCC cultures. (A-D) Time-course of expression of osteoblast-associated gene: osteocalcin (OCN), type 1 collagen (Col1a1), alkaline phosphatase (ALP), osterix (OSX) and Runx2 and SIBLING genes : osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), DMP1 and MEPE at successive time-points of BSP+/+ (A, C) and BSP-/- (B, D) MCC cultures. The arrow marks the appearance of bone nodules. OPN protein was measured in cell lysate (E) and in culture medium (F) at D6, D14 or D17 of culture. \* :  $p < 0.05$  vs time-matched BSP+/+; # :  $p < 0.05$  vs D6.



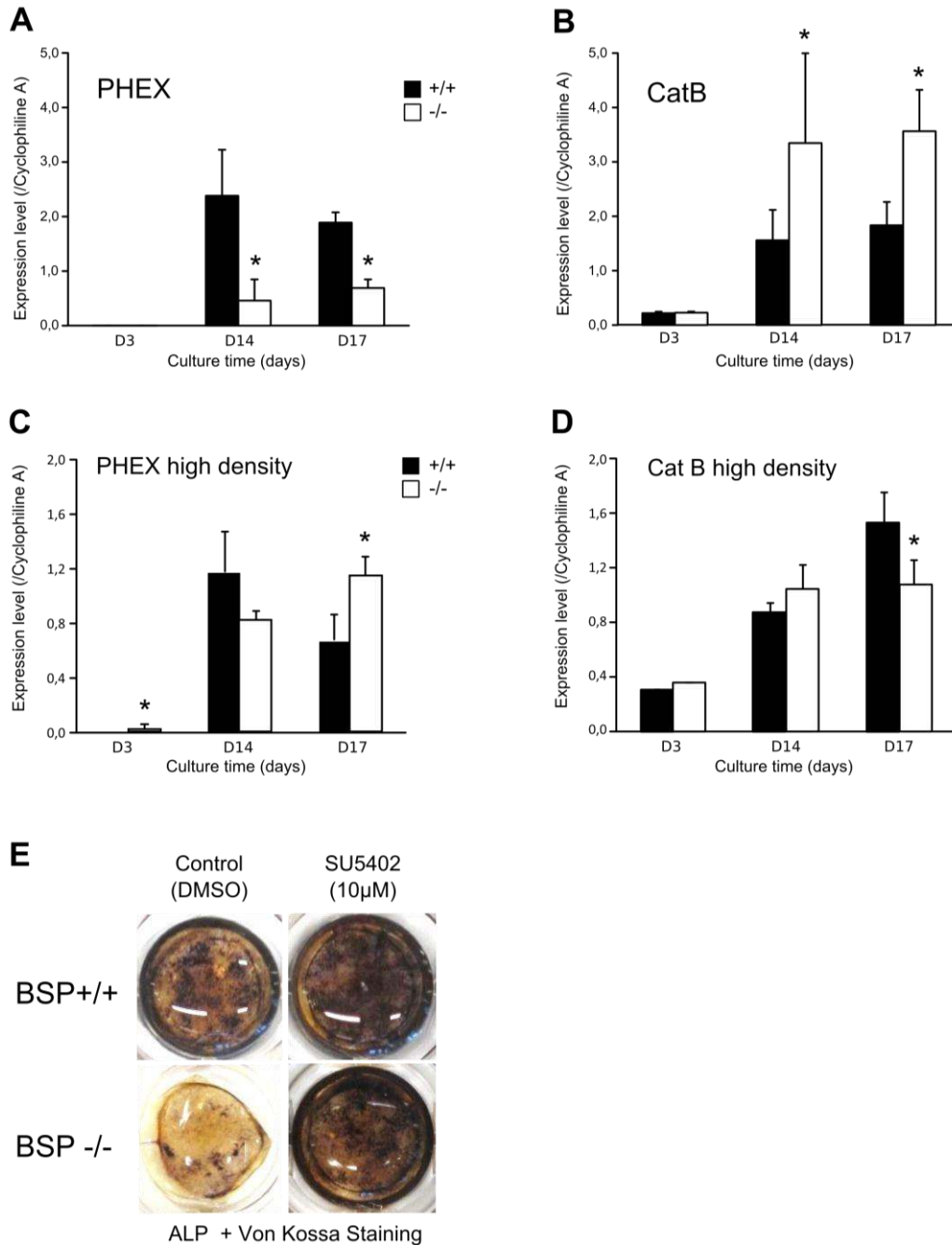
**Figure 4.** *In vitro* osteoblast differentiation in low and high density BSP+/+ and BSP-/- MCC cultures. (A) Micrographs and (B) quantification of total mineralized colonies at D14. Expression of osteoblast-associated (C and D) and SIBLING genes (E and F) at D14 in BSP+/+ (C, E) and BSP-/- (D, F) cultures. \*  $p < 0.05$  vs BSP+/+, #  $p < 0.05$  vs low density.

*Effects of plating density on PHEX and Cathepsin B expression in BSP+/+ and BSP-/- MCC cultures*

PHEX and CatB were highly expressed in MCC cultures of both genotypes starting at D14 (Figs. 5A, B). However, at standard density, PHEX expression was lower in BSP-/- dishes than in BSP+/+, while CatB expression was higher. Interestingly, in high density BSP-/- cultures, PHEX expression was increased while CatB was decreased, reaching the same levels as in BSP+/+ cultures at D14, and respectively higher and lower levels at D17 (Figs. 5C, D). Blocking CatB activity by treating low density BSP+/+ and BSP-/- MCC cultures with a specific inhibitor of CatB activity, CA074, did not significantly affect nodule production nor mineralization in either genotypes (data not shown).

*Blocking the FGFR pathway promotes the mineralization of BSP-/- MCC cultures*

Since PHEX and DMP1 are poorly or not expressed in BSP-/- MCC standard cultures, we attempted to impair the FGFR pathway by treating the cultures with a specific inhibitor of FGFR1, SU5402. Treatments starting from D1 inhibited MCC culture differentiation in both genotypes (data not shown). When the treatment started at D6, osteogenesis proceeded with the same pace as in untreated controls. With this protocol, a significant increase in the amount of mineral formed was observed in BSP+/+ dishes. Interestingly, significant mineralization appeared in BSP-/- culture dishes (Fig. 5E).



**Figure 5.** Time-course expression of PHEX and CathepsinB (CatB) in BSP+/+ and -/- MCC cultures plated at standard (A, B) and high (C, D) density. (E) ALP and Von Kossa staining of BSP+/+ and BSP-/- MCC cultures treated from D6 to D17 with the FGFR1 inhibitor SU5402 (10 $\mu$ M). \*  $p < 0.05$  vs time-matched BSP+/+.

## Discussion

Although bone sialoprotein has long been a marker of late osteoblastic differentiation, the actual role(s) of the protein in bone biology remain poorly known. Previous studies have shown that BSP directly impacts the differentiation of osteoblasts [36]. Indeed, BSP overexpression in osteoblasts increases osteoblast-related gene expression and enhances mineralized nodule formation in culture. Conversely, the reduction of BSP expression in osteoblasts with specific shRNA inhibits the expression of osteoblast markers, leading to a significantly reduced matrix mineralization [36]. Taken together, these results indicate that BSP might serve as a matrix-associated signal regulating osteoblast differentiation and mineralized matrix production.

In the present study, we have shown that BSP  $-/-$  MCC adhere normally to the substrate, but display an impaired clonogenicity and differentiation. They exhibit delayed growth with a lower proliferation rate at early culture times, later normalized. Along with the lower number of CFU-F counted in BSP  $-/-$  MCC, these results suggest that less progenitors (= proliferating cells) were seeded at the start of the BSP  $-/-$  cultures, rather than any intrinsic difference in the culture proliferative rate between the two genotypes, or differential levels of apoptosis, which appeared negligible in these cultures. Earlier work in rat suggested the existence of early, glucocorticoid dependant, ALP-negative progenitors present in the bone marrow and of late, glucocorticoid independant, ALP+ progenitors dominant in the calvaria cell population [44-46]. If this applies to mice, MCC progenitors would be more advanced stages than those found in the bone marrow. These advanced progenitors would logically be in lower number if the progeny of marrow progenitors is reduced in BSP  $-/-$  mutants, as witnessed by the smaller CFU-ALP. Thus, a BSP  $-/-$  bone microenvironment would alter the proliferation potential and/or cell fate of early osteoprogenitors.

The impaired differentiation and mineralization observed in BSP  $-/-$  cultures is reflected in the absence of a surge in the expression of osteoblast-associated genes during the osteogenesis phase. Interestingly, among the SIBLING family genes only OPN is significantly expressed in BSP  $-/-$  MCC cultures, and higher than in BSP  $+/+$  at most time points. OPN protein assayed in the cell layer and culture medium reflected OPN gene expression at D6. However, OPN protein amounts did not change from D6 to D17 in BSP  $-/-$  cell lysates and they decreased in the culture medium, suggesting that the protein is more actively degraded or processed than in the BSP  $+/+$  (see below).

Our *in vitro* results at low and standard plating density are not consistent with the *in vivo* situation of BSP  $-/-$  mice, in which we observed a globally normal bone formation [43]. Therefore, we asked whether cell density could affect the development of the osteoblast phenotype in the absence of BSP. Indeed, bone marker and SIBLING gene expression increase in high density BSP  $-/-$  cultures. Moreover, numerous mineralized nodules do form in the culture, although they are smaller and in lower number than in BSP  $+/+$  dishes. Therefore, the effects of the mutation appear to be at least partly compensated at high cell

density. Cell confluence is a major rate-limiting factor for acid ascorbic-induced osteoblast differentiation and a recent study showed that cell-cell interactions through cadherins mediate osteoblast differentiation through up-regulation of the transcription factor EB1 [47]. It is thus possible that BSP would play a part in the density-dependent differentiation of osteoblasts.

How osteoblast differentiation and mineralization are inhibited in standard density BSP-/- MCC cultures is still not clear, but our results suggest several possible mechanisms involving PHEX, OPN, the ASARM peptide and/or FGF23. In standard density mutant cultures, neither MEPE nor DMP1 are expressed, and the only possible source of ASARM is OPN. MEPE ASARM is cleaved-out and freed by CatB, and captured/degraded by PHEX. In BSP-/- cultures PHEX expression is lower and CatB is higher as compared to BSP+/, which may result in higher amounts of active, inhibitory ASARM. In high density BSP-/- cultures, PHEX expression increases while CatB decreases, suggesting reduced ASARM peptide amounts and a lesser inhibition of mineralization. However, blocking CatB activity in standard density cultures continuously or within time-windows and with different concentration of CU074, a specific inhibitor, did not affect nodule formation or mineralization in either genotype. There is presently no evidence that CatB is the enzyme cleaving out the ASARM from OPN, and other enzymes should be sought for.

In BSP-/- low density cultures, OPN overexpression combined with a low expression of PHEX should result in an inhibition of mineralization. In contrast to mRNA data, OPN protein assays indicate lower amounts of OPN protein assayed in BSP-/- cultures than in the BSP+/, suggestive of massive degradation. The fact that this occurs in a context where PHEX expression is kept low suggests that other degrading enzymes might be involved, such as for instance cathepsin D [48]. Of note, both full-length OPN and its peptides appear able to block mineralization [49]. Nonetheless, the involvement of OPN and/or its ASARM peptide in the inhibition of mineralization of BSP-/- MCC cultures, although likely remains unclear at the moment.

That PHEX and DMP1 are poorly or not expressed in BSP -/- cultures should result in an increase of FGF23 secretion through enhancement of FGFR activity [32]. Indeed, the inhibition of the FGFR pathway with the SU5402 inhibitor lead to a significant mineralization of low density BSP-/- MCC cultures, which might reflect a decrease of FGF23 expression/protein levels, still to be investigated.

In conclusion, the present study shows that BSP regulates mouse calvaria osteoblast cell clonogenicity, differentiation and activity *in vitro*, consistent with low levels of bone forming activity *in vivo*. The BSP knockout bone microenvironment may alter the proliferation/cell fate of early osteoprogenitors, explaining the smaller size of the CFU-PAL observed in BM cultures and the lower number of CFU in MCC cultures. The overexpression of the OPN protein, which has also been documented *in vivo* in the blood and calvaria bone of BSP-/- mice (Bouleftour et al., in preparation), might play a part in the inhibition of mineralization

in the absence on BSP. The PHEX-FGF23 axis could also be involved in the mechanism of impaired differentiation and mineralization of BSP-/- calvaria cells. Further analyses are now required to test these hypotheses.

### **Acknowledgements**

This work was funded by the French “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM) and by the French Ministry of Research (PhD fellowship to GB). The authors have no conflicting financial interests.

### **References**

- [1] Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, et al. MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*. 2000;67:54-68.
- [2] MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Dong J. MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect Tissue Res*. 2002;43:320-30.
- [3] Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol*. 2005;50:599-609.
- [4] Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:33-40.
- [5] Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, et al. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:24874-80.
- [6] Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation *in vitro*. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13:1101-11.
- [7] Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, et al. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:1998-2007.
- [8] Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006;38:1310-5.
- [9] Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization *in vivo*: an FTIR imaging analysis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20:2169-77.

- [10] David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, et al. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue engineering Part A*. 2008;14:117-26.
- [11] Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:126-36.
- [12] Boskey AL, Chiang P, Fermanis A, Brown J, Taleb H, David V, et al. MEPE's diverse effects on mineralization. *Calcified tissue international*. 2010;86:42-6.
- [13] Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge AM, et al. Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology*. 2008;149:1757-72.
- [14] Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25:695-705.
- [15] Rowe PS, Matsumoto N, Jo OD, Shih RN, Oconnor J, Roudier MP, et al. Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone*. 2006;39:773-86.
- [16] Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B. cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics*. 1996;36:22-8.
- [17] Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, et al. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1998;46:459-68.
- [18] Guo R, Rowe PS, Liu S, Simpson LG, Xiao ZS, Quarles LD. Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297:38-45.
- [19] Rowe PS, Garrett IR, Schwarz PM, Carnes DL, Lafer EM, Mundy GR, et al. Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). *Bone*. 2005;36:33-46.
- [20] Liu S, Rowe PS, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol*. 2007;192:261-7.
- [21] Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23:1638-49.
- [22] Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions *in vitro*: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*. 1993;22:147-59.
- [23] McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;760:177-89.
- [24] Addison WN, Azari F, Sorensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin,



- and inhibiting alkaline phosphatase activity. The Journal of biological chemistry. 2007;282:15872-83.
- [25] Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. Calcified tissue international. 2002;71:145-54.
- [26] Narisawa S, Yadav MC, Millan JL. *In vivo* overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2013;28:1587-98.
- [27] Barros NM, Hoac B, Neves RL, Addison WN, Assis DM, Murshed M, et al. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2012;28:688-99.
- [28] Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. The Journal of biological chemistry. 2003;278:37419-26.
- [29] Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2006;291:E38-49.
- [30] Liu S, Zhou J, Tang W, Menard R, Feng JQ, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2008;295:E254-61.
- [31] Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. The Journal of clinical investigation. 2008;118:3820-8.
- [32] Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ, et al. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. FASEB J. 2011;25:2551-62.
- [33] Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008;23:939-48.
- [34] Gorski JP, Wang A, Lovitch D, Law D, Powell K, Midura RJ. Extracellular bone acidic glycoprotein-75 defines condensed mesenchyme regions to be mineralized and localizes with bone sialoprotein during intramembranous bone formation. The Journal of biological chemistry. 2004;279:25455-63.
- [35] Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. Matrix Biol. 2008;27:600-8.
- [36] Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. Bone. 2007;41:462-73.
- [37] Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Sabido O, Aubin JE, et al. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption *in vitro*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010;25:2393-403.

- [38] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:8424-8.
- [39] Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, et al. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone*. 2010;46:447-52.
- [40] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, Aubin JE, et al. Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. *Endocrinology*. 2010;151:5103-13.
- [41] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin JE, Vico L, et al. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone*. 2012;50:1064-73.
- [42] Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone*. 1998;23:119-25.
- [43] Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2008;205:1145-53.
- [44] Centrella M, Casinighino S, McCarthy TL. Differential actions of prostaglandins in separate cell populations from fetal rat bone. *Endocrinology*. 1994;135:1611-20.
- [45] Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *The Journal of cell biology*. 1991;114:373-84.
- [46] Roche P, Goldberg HA, Delmas PD, Malaval L. Selective attachment of osteoprogenitors to laminin. *Bone*. 1999;24:329-36.
- [47] Pustynnik S, Fiorino C, Nabavi N, Zappitelli T, da Silva R, Aubin JE, et al. EB1 levels are elevated in ascorbic acid (AA)-stimulated osteoblasts and mediate cell-cell adhesion induced osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2013.
- [48] Christensen B, Schack L, Klaning E, Sorensen ES. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:7929-37.
- [49] Boskey AL, Christensen B, Taleb H, Sorensen ES. Post-translational modification of osteopontin: effects on *in vitro* hydroxyapatite formation and growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419:333-8

## A.2. Résultats complémentaires

### *L'addition de BSP exogène ne restore pas le phénotype des cultures BSP-/-*

Nous avons tenté de rétablir le phénotype minéralisant des cellules de calvaria BSP -/- en ajoutant de la BSP exogène (recombinante humaine) à différentes concentrations (10ng/mL, 100ng/mL et 1µg/mL) au milieu de culture. Cependant, l'addition de BSP exogène n'a pas permis de compenser l'effet de l'absence de BSP sur la différenciation et la minéralisation dans les cultures BSP-/. Plusieurs hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, il est possible que la protéine BSP endogène soit requise pour cette étape. Ensuite, nous avons vu (1<sup>er</sup> chapitre) l'importance des modifications post-traductionnelles. Il se peut que des modifications post-traductionnelles spécifiques jouent un rôle dans ce processus, et ne soient pas réalisées dans la protéine recombinante utilisée dans cette expérience *in vitro*. Si la nécessité de BSP endogène peut être testée à l'aide de siRNA, le rôle des modifications post-traductionnelles est plus complexe à évaluer.

Dans le but de vérifier si les MCC BSP +/+ à densité normale ou les BSP -/- cultivées à forte densité sécrètent un facteur favorisant la minéralisation des cultures, nous avons réalisé une co-culture compartimentée (Transwell) dans laquelle des cellules BSP-/- ont été repiquées à densité standard (5000/cm<sup>2</sup>) dans le puit inférieur et mises au contact de cultures BSP+/+ à densité standard, ou BSP-/- à haute densité dans la nacelle. Cette expérience n'a malheureusement donné aucun résultat probant. En effet, quel que soit le contenu de la nacelle, les cellules situées dans le puits inférieur sont rapidement mortes, excepté sur les bords des puits, probablement à cause d'une mauvaise oxygénation de la culture.

## A.3. Conclusion et perspectives

Les résultats de notre étude indiquent que la BSP régule la clonogénicité, la différenciation et l'activité *in vitro* des cellules de calvaria murines, en accord avec le faible niveau de formation osseuse observée *in vivo*. Le microenvironnement osseux dépourvu de BSP semble altérer la prolifération/le devenir des ostéoprogéniteurs précoces, expliquant ainsi la taille plus petite des CFU-PAL observées dans les cultures de moelle et le plus faible nombre de CFU dans les cultures de cellules de calvaria. La surexpression de l'OPN observée dans nos cultures pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la minéralisation observée en absence de BSP. Cette hypothèse a notamment été corroborée *in vivo* par d'autres études du laboratoire dans le sang et dans les calvaria de souris BSP-/- (Bouleftour et al, en préparation). Afin de creuser cette piste, la priorité consiste à étudier la cinétique d'expression protéique de l'OPN dans le lysat cellulaire et dans le milieu de culture de cellules repiquées à forte densité. Il serait logique d'observer une diminution de l'expression

de l'OPN à forte densité cellulaire. Cependant, les modifications post-traductionnelles de l'OPN peuvent compliquer l'exploitation des résultats trouvés, en faussant les résultats du dosage ELISA, ou en altérant les propriétés de l'OPN d'une manière indépendante des quantités dosées. Il sera nécessaire de privilégier la technique du western blot et choisir soigneusement les anticorps utilisés afin de mettre en évidence un possible clivage de la protéine.

D'autre part, PHEX et FGF23 pourraient également être impliqués dans le mécanisme conduisant au défaut de différenciation et de minéralisation des cellules de calvaria BSP<sup>-/-</sup>. En effet, nous avons pu observer que PHEX était sous-exprimé dans les cultures BSP<sup>-/-</sup> par rapport aux BSP<sup>+/+</sup> et que l'inhibition de la voie de signalisation de FGF23 semblait favoriser la minéralisation des cultures BSP<sup>-/-</sup>. La priorité est donc ici d'étudier l'expression génique et protéique de FGF23 dans les cellules traitées ou non avec l'inhibiteur de FGFR1. Il sera intéressant de regarder, dans ces nouvelles conditions, l'expression protéique de l'OPN.

La dépendance du phénotype des cellules BSP<sup>-/-</sup> à leur densité nous montre l'importance des contacts cellule-cellule et donc l'importance du microenvironnement cellulaire. Afin d'étudier ces cellules dans un environnement plus proche des conditions *in vivo*, nous avons développé un modèle de culture en 3D présenté dans la partie suivante.

## B. Développement et validation d'un modèle de culture en trois dimensions (3D) pour l'ostéogénèse *in vitro*

Comme nous l'avons vu dans la [partie C du 1<sup>er</sup> chapitre](#), *in vivo* les cellules résident dans un microenvironnement 3D complexe, composé de plusieurs types cellulaires produisant une matrice extracellulaire et des molécules de signalisation. Ce microenvironnement est soumis, dans la plupart des tissus dont l'os, à des contraintes mécaniques qui déterminent des aspects importants de leur physiologie. Paradoxalement, la majeure partie de nos connaissances concernant la physiologie des cellules *in vitro* ont été obtenues à partir de cellules cultivées en 2D sur des substrats en plastique. C'est par exemple le cas de l'étude de la BSP que nous venons de décrire dans la [partie A](#) de ce chapitre. Cette étude a montré en particulier que le développement du phénotype des cellules BSP-/- était lié à la densité et/ou aux contacts intercellulaires. Ceci mettait d'autant plus en évidence l'importance du microenvironnement des cellules dans l'élaboration et le comportement des modèles *in vitro*. La BSP est d'autre part un gène de réponse rapide à la contrainte mécanique. Or, le simple fait de cultiver des cellules dans un environnement 3D induit une contrainte de type mécanique à travers les interactions entre cellules et substrat. En effet, ces interactions sont différentes du fait de l'organisation spatiale divergente des cellules dans un environnement en 2D ou en 3D. Les interactions cellules-substrat constitue un domaine d'intervention directe de la BSP qui est un ligand d'intégrines assurant l'adhésion et/ou la signalisation à/vis-à-vis de la MEC ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 3$ ).

La question se posait donc de savoir si le phénotype des cellules BSP-/- serait le même dans un environnement 3D. Ce dernier apporterait d'autant plus d'information s'il était possible de le soumettre à des signaux mécaniques exogènes. Le développement et la validation du système de culture en 3D *in vitro* fait l'objet de l'article suivant.

*N.B. : L'étude mécanique présentée dans cet article a été réalisée par Magali Cruel, à l'époque élève-ingénieur à l'EMSE et actuellement doctorante au Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS) à l'Ecole Centrale de Lyon.*

## **B.1. Article 2**

### ***Validation of a new 3D in vitro cell culture system for bone tissue engineering under mechanical stimulation***

Bouët G.<sup>1</sup>, Marchat D.<sup>2</sup>, Cruel M.<sup>2</sup>, Laurent C.<sup>2</sup>, Navarro L.<sup>2</sup>, Louis F.<sup>1</sup>, Linossier MT.<sup>1</sup>, Vico L.<sup>1</sup>,  
Malaval L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *INSERM U1059, Laboratoire de Biologie intégrative du Tissu Osseux, University of Lyon, St-Etienne, 42023, France*

<sup>2</sup> *Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, CNRS:UMR 5307, F-42023 158 cours Fauriel Saint-Etienne cedex 2, France*

**Article soumis à *Biomaterials***

### **Abstract**

An engineered 3D *in vitro* cell culture system was designed which would allow the induction and control of *in vitro* osteogenesis in a reproducible manner under conditions more similar to the *in vivo* bone microenvironment than traditional 2D models. To reach this goal, a new bioreactor was designed, allowing efficient mechanical loading and perfusion of the scaffold in addition to an original cubic calcium phosphate bioceramic of highly controlled composition and structure. This bioceramic was composed of an internal portion containing homogeneously interconnected macropores surrounded by, on the non-perfused surfaces, a dense layer which minimized fluid flow bypass around the scaffold and allowed the bioceramic to resist high and dynamic mechanical loading. Our system could mechanically stimulate cells within the scaffold, which was evaluated by numerical modelling. Results showed that after homogeneous seeding inside the scaffold and perfusion at a steady flow of 2 $\mu$ L/min, mouse calvarial cells grew and differentiated as osteoblasts, in a reproducible manner producing a mineralized matrix. In summary, this study provided a “proof-of-concept” for osteoblastic cell culture in a controlled 3D culture system under perfusion.

**Keywords** : Bone tissue engineering, Bioreactor, Cell culture, Scaffold, calcium phosphates, bioceramic

## Introduction

The applications of tissue engineering are no longer restricted to the development of artificial living tissues as manufactured products, but extends beyond therapeutic implants towards the creation of *in vitro* physiological models of living tissues. Cells *in vivo* reside in a complex three-dimensional (3D) micro-environment, consisting of several cell types producing extracellular matrix (ECM) and signalling molecules which are subjected (in most tissues including bone) to mechanical stimuli which determine important aspects of (bone) physiology. Paradoxically, most of our knowledge about cell physiology comes from traditional *in vitro* two-dimensional (2D) experiments on cell monolayers, though it is well established that signal transduction and many other cellular functions differ between 2D and 3D culture conditions [1-3]. These differences are expected, as 2D substrates oblige the cells to adapt to an artificially flat and rigid surface [4], and adding the 3rd dimension is essential to understanding the fundamental aspects of cells working *in vivo*. 3D systems are more representative of *in vivo* conditions, in which several cellular types and the extracellular matrix interact in a complex and dynamic fashion [5-7].

New generation systems, based on tissue engineering principles, endeavour to reproduce the environment of the cells within a living organism. Their goal is to provide a robust spatial and temporal control of biophysical, biochemical and mechanical microenvironmental cues [8-12] as well as monitoring cellular organization and responses. In order to achieve success in such experimental models, many parameters must be tightly controlled for the culture proper (e.g. cell seeding, matrix deposition and mineralization) and its supporting environment (e.g. nutrient supply, waste removal), which necessitates optimization of the scaffold and the bioreactor [13].

The purpose of a scaffold is to provide a biomimetic 3D environment for bone cells. To achieve this goal, scaffolds should exhibit several properties. Phase, chemical composition and surface chemistry are key parameters directly affecting cellular activities such as cell attachment, proliferation and differentiation towards the desired phenotype [14-16]. Additionally, scaffold architecture should allow controlled and homogeneous cell seeding [17-19], cellular responses [19], mass-transport [20] and possess proper mechanical properties [21] throughout the experiment. The architecture directly (e.g. nutrient accessibility) or indirectly (e.g. adsorption of proteins, local shear stresses) influences the cellular fate. Optimization of the mechanical properties for a scaffold is important to support the perfusion, and in particular, the mechanical stimulation of the culture (e.g. compressive strength).

Perfusion and the mechanical stimulation are ensured by the bioreactor. Bioreactors have been shown to improve the efficiency of cell seeding within macroporous structures [22-24], cellular proliferation [25-27] and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells [28-31]. Apart from spinner flasks and rotating wall vessels, most systems used for bone tissue engineering are perfusion bioreactors [32, 33]. Indeed, even if spinner flasks and rotating



wall vessels minimize the nutrient and metabolite concentration gradients compared to static conditions, they fail to properly perfuse the scaffolds [34]. In perfusion bioreactors, a pump system allows the circulation of medium throughout the seeded structure, where the scaffold perfusion rate is a crucial parameter which must be adapted to the 3D culture conditions considered, i.e. design of the bioreactor, scaffold architecture and target cell/tissue type.

Generally, mechanical forces developed in scaffolds at the cellular level (such as shear stress) can induce osteogenic differentiation of progenitor cells and support extra-cellular matrix deposition [32, 35-38]. However, few perfusion bioreactors can simultaneously perfuse the scaffold and apply dynamic compressive strain-like compression on the fluid and/or the scaffold. Such systems were developed and marketed by Bose® [39] and Zetos® [40], or are more artisanal [41]. Although the mechanical performance of the latter system has been validated, osteogenic cell culture has not been yet achieved [41].

Regarding both commercial systems, they were initially developed for the culture of tissues (e.g. natural bone, cartilage) rather than for the manufacturing of scaffolds, and the technical properties/specifications (e.g. geometry allowing bypass, range of mechanical stimulations) were not fully adapted to the stimulation of CaP macroporous bioceramics. Moreover, these systems were designed to deliver controlled mechanical stimulation and perfusion flow, though it is unknown whether they allow for long-term cell growth, differentiation and osteogenesis under mechanical loading. This uncertainty was most likely due to the fact that the macroscopic design (i.e. geometric structure) of the scaffolds or living tissues inserted into the culture chamber area were not specifically designed for the chamber. This lack of design conformity between the chamber and the scaffold does not ensure proper perfusion or homogeneous mechanical loading of the scaffold, possibly due to fluid bypass around the scaffold or the irregular shape of the scaffold surface, respectively.

The aim of this study was to develop both a bioceramic scaffold and a perfusion bioreactor in order to improve existing 3D culture systems, and finally generate and control *in vitro* osteogenesis in reproducible manner. To achieve this objective, the culture system should provide controlled homogeneous fluid flow perfusion (i.e. flow conditions) within the scaffold and provide accurate and controlled mechanical stimulations within the scaffold, mimicking the signalling experienced by bone cells *in vivo*. This signalling is complex as it implies external mechanical loads generating substrate deformation and fluid flow shear stress as well as fluid flow shear stress induced by differential pressure within the circulatory system.

The choice was made to work with a mechanical loading applied perpendicularly to fluid flow in order to uniformly compress the entire scaffold surface. This implies that the cubic scaffold consisted of dense flat surfaces in contact on one side with the piston delivering the compressive stress, and on the opposite side with the counter-piston (i.e. the bottom of the perfusion chamber which contained the scaffold). One of the challenges was to insure

adequate parallelism between the flat surfaces of the piston and of the scaffolds. In an effort to improve the mechanical properties of the bioceramic, which needs to resist to high and dynamic mechanical loading, the non-perfused surfaces parallel to the compressive stress, have been consolidated with a dense layer. This dense layer, surrounding the porous scaffold and parallel to the direction of perfusion, was expected to avoid or limit fluid flow bypass around the scaffold, essential for determining the flow experienced by cells within the scaffold and involved the manufacture of scaffolds with reproducible and accurate dimensions.

The purpose of this study was validation of a new 3D culture system developed with the aim of controlling osteoblastic differentiation in a physiologically-relevant *in vitro* model. Scaffolds were fabricated then characterized in terms of morphology (e.g. X-ray tomography, Hg porosimetry and scanning electron microscopy), physico-chemical properties (e.g. X-ray diffraction, infrared spectrometry) and mechanical properties (e.g. compression test). Moreover, numerical modelling and finite element analysis were used to model mechanical constraints of the scaffold. Biological validation was through observation of cell distribution, viability and growth within the scaffold using fluorescent markers, RNA quantification, oxygen monitoring and scanning electron microscopy. Finally, in order to study the osteogenic potential of the calvarial cells, mRNA expression of osteoblastic markers (e.g. osteocalcin) and bone matrix protein deposition (e.g. collagen, alkaline phosphatase) were evaluated within the scaffold by immunolabeling and staining.

## **Material and Methods**

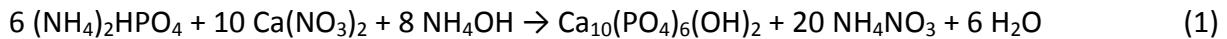
### *Powders synthesis*

Calcium phosphate powders were prepared by an aqueous precipitation method using diammonium phosphate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 99% pure, Merck, Germany) and calcium nitrate tetrahydrate salts (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O, 99% pure, Merck, Germany). After dissolution of these salts in pure water (< 0.1 μS/cm), the phosphate solution was injected into the calcium solution using a peristaltic pump (Heidolph, Germany), performed under a flow of argon (4.8, Linde, 0.4 L.min<sup>-1</sup>) to prevent any excessive carbonation of the precipitate. The pH of the suspension was adjusted by the addition of 28% ammonia solution (Merck, Germany) by means of a dosing pump (GALa 0420 TTT, Prominent, Strasbourg, France), and the temperature was controlled/regulated automatically with an external T-probe. The suspension was continuously stirred and refluxed. After complete introduction of the phosphate solution, the suspension was matured for 17 h, and then filtered using a filter press (Latham International, England). Finally, the precipitate was dried (70°C for 3h) then calcined at 400°C for 2 h before being fine crushed to a 1 to 10 μm range (Alpine, AF100, Germany). Synthesis parameters are listed in Table 1.

**Table 1: Powder synthesis parameters**

Powder	( $n_{Ca}/n_P$ ) reagents	pH	$T$ /°C	[Ca] / mol.L <sup>-1</sup>	[P] / mol.L <sup>-1</sup>	Adding flow / mL.min <sup>-1</sup>	$t_{maturation}$ / h
HA	1.667	8.0	65	2.329	1.397	316	17
Ap-TCP	1.500	7.0	35	2.117	1.422	316	17

Calcium hydroxyapatite  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (HA), was synthesized directly in aqueous solution according to the following reaction:



Considering the wet method used,  $\beta$  tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) could be precipitated directly in aqueous solution. For an ideal Calcium/Phosphorus final molar ratio of 1.500, an apatitic tricalcium phosphate  $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$  (Ap-TCP) was precipitated as follows :



Pure  $\beta$  TCP formation was complete only after calcination of this apatitic compound (at a temperature over 750°C) according the following dehydration reaction :



### *Scaffolds preparation*

The scaffolds were manufactured by impregnating an organic template with a calcium phosphate slurry according to the process of Descamps et al. [42]. This allowed for full control of the round shape and diameter of the macro-pores (i.e. pore size higher than 100  $\mu$ m), their interconnections, as well as the formation of micro-pores (i.e. pore size lower than 20  $\mu$ m). The latter aspect was controlled through the physical properties of the powder (e.g. specific surface area) and the sintering parameters. The macro-scale properties were adjusted through the organic template, which was composed of interconnected polymethylmethacrylate (PMMA) beads (500-700  $\mu$ m diameter, Lucite Daikon Bead Polymer, The Netherlands) and overlapping was performed by chemifforming, using acetone (99.9% Sigma-Aldrich, Germany) solution diluted to 75 vol%, and controlled through the macroscopic shrinkage of the template.

These templates were impregnated with a calcium phosphate slurry prepared by blending 63.9 wt% of dried powder for 2 h at 45 rpm in an alumina jar with alumina beads of 10 mm diameter (Tosoh, 99.5%, Japan), 35.1 wt% of pure water and 1.0 wt% of dispersing agent (Darvan C-N,R. T. Vanderbilt Company Inc, USA). The second step consisted of mixing the suspension with an organic binder (Duramax B-1000, Rohmand Haas, France) via a propeller

stirrer for ~1 h. The mass of Duramax ( $m_{\text{Duramax}}$ , in gram) was calculated according to the mass of suspension ( $m_{\text{Suspension}}$ , in gram) as follows:

$$m_{\text{Duramax}} = (2 * m_{\text{Suspension}}) / 54 \quad (4)$$

The dried powder was composed of a mixture of 85 wt% of  $\beta$ -TCP powder and 15 wt% of HA powder. The same lots of HA powder and  $\beta$ -TCP powder were used for the entire study. Before mixing, these powders were calcined at 800°C for 2 h and 1 h (ramps 4°C/min), respectively, in order to achieve specific surface areas of  $10.0 \pm 0.2 \text{ g/m}^2$  and  $20.5 \pm 0.3 \text{ g/m}^2$ . These values were determined on outgassed powders at 150°C for 8 hours by means of the Brunauer-Emmett-Teller (BET) 5 points method using  $\text{N}_2$  adsorption isotherms (Micromeritics ASAP 2010, Germany). Moreover, these thermal treatments did not change the particle size distribution of the powders, which ranged between 1 and 10  $\mu\text{m}$  (data not included).

The green body, obtained after drying overnight at 37°C, was debinded to eliminate organic components (e.g. binder) as well as the PMMA skeleton [42], then sintered to get the macroporous ceramic. Sintering was performed at 1100°C for 3 h (ramps 4°C/min), a temperature below the allotropic phase transformation  $\beta \rightarrow \alpha$  (1150-1200°C) which provoked a relative 7% increase of the lattice volume due to the density difference between both forms (3.07 for the  $\beta$ -form and 2.86 for the  $\alpha$ -form) [43]. Finally, the ceramics were sterilized at 180°C for 30 min with a dry heat sterilizer (Poupinel, Binder, Germany) before use.

### *Scaffolds characterization*

Crystalline phases were identified for powders and crushed scaffolds by means of a  $\theta/2\theta$  X-ray diffractometer (Siemens D5000, Germany) using  $\text{CuK}\alpha$  radiation at 40 kV and 20 mA. X-ray diffraction (XRD) patterns were collected over  $2\theta$  range of 28.4-32.7° with a step size of 0.02° and counting time of 21 s per step. Phase identification was performed by comparison to standard patterns from the International Centre for Diffraction Data – Powder Diffraction Files (ICDD-PDF). The Ca/P molar ratio of powders and HA/ $\beta$ -TCP scaffolds were determined after calcination at 1000°C for 15 h from quantitative X-ray diffraction analysis according to a standard procedure [44].

Fourier Transformed Infrared (FT-IR) measurements were carried out with the use of a HYPERION 2000 Spectrometer (Bruker, Germany). The spectra were recorded on powders and crushed scaffolds over a 450-4000  $\text{cm}^{-1}$  range with a 2  $\text{cm}^{-1}$  resolution and each pattern was an average of 32 successive scans.

Morphometric characterization of the scaffolds was performed by scanning them with a high-resolution micro-X-ray computed tomograph ( $\mu\text{CT}$ , Viva CT40, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) and data were acquired at 70 keV, with a 10- $\mu\text{m}$  cubic resolution. Three-dimensional reconstructions of the porous fraction of the scaffolds were generated using the following parameters: sigma, 0.8; support, 1; threshold, 263. The structural

parameters of material fractional volume (= 1-porosity, in %), and average separation between the struts (= pore diameter in this 3D configuration, in  $\mu\text{m}$ ) were generated from the whole stack of sections using the dedicated Scanco software (version 6.0).

Scaffold porosity was characterized by Hg porosimetry (Autopore IV, Micromeritics, Germany) and Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG, JEOL JSM-6500F, USA). Qualitative SEM images were obtained after gold sputtering (20 mA, 50 s) of the samples for electrical conductance (Quorum Q150R ES, England). Due to the “bottleneck” structure of the macropores, which resulted from the overlapping of spheres (i.e. size-limiting pore interconnections), pore size distribution determined by Hg porosimetry corresponded to the diameters of the interconnection.

Compression tests were conducted on three representative scaffolds. These tests were run with an Instron mechanical testing machine (single-column model 3342 capacity 500 N, Instron, Norwood, USA) at a speed rate of 0.1 mm/min. The samples were loaded with an increasing force up to 400 N and displacements precisely monitored by stereo image correlation. The stress-strain data were obtained by taking into account the initial dimensions of the scaffold. The macroscopic modulus  $E_{\text{macro}}$  was measured from the elastic region of the curve. This value was useful for determining the microscopic mechanical properties of the material for numerical simulations.

#### *Numerical modeling and finite element analysis*

For mechanical constraint modelling, the scaffolds were imaged by a Nanotom<sup>®</sup> X-ray computed tomography system equipped with a tungsten X-ray source (Phoenix|x-ray, General Electric, Fairfield, USA) and scans performed at 180 keV and 100  $\mu\text{A}$  with a cubic resolution of about 3.5 to 5  $\mu\text{m}$ . More than 1500 projections were used for volume reconstruction by means of the software Phoenix datos|x (General Electric, Fairfield, USA) and the 3D file was opened with the ImageJ software (NIH, Bethesda, USA, version 1.4) to generate a stack of images. After cropping to the region of interest, stacked images were binarized by threshold adjustment and reconstruction artefacts eliminated with erosion-dilatation operations.

The stack was then opened with the 3D visualization software Avizo<sup>®</sup> (Mercury Computer Systems, Chelmsford, USA, version Standard 5) and a 3D surface mesh was generated from the binarized images. The quality of this mesh was improved, uncorrected regions removed and the 3D volume meshed with tetrahedron elements. Approximately half of the scaffold, truncated perpendicularly to the fluid flow direction, was meshed and exported for simulations to significantly reduce the calculation time. The mesh generated presented around 570,000 elements. Simulations of the biomaterial mechanical behaviour under compression were performed with a finite element model (Abaqus<sup>®</sup>, Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France, version 6.9-2) and the behaviour of the material was assumed to be homogeneous, linear, isotropic and elastic. A displacement of 2.5  $\mu\text{m}$  was imposed on the nodes constituting the upper face of the sample, corresponding to a load of 20 N on the

scaffold, while nodes from the bottom face were blocked both in the compression and translation directions. Poisson's ratio  $\nu$  was fixed at 0.3 from previous studies [45] and the elastic modulus  $E_{micro}$  was defined after a first step of inverse analysis, as described in Van Rietbergen et al. [46]. In this approach, the simulation was run with a first guess of the microscopic elastic modulus  $E_0$  and the predicted macroscopic elastic modulus  $E_{Comp}$  can be calculated by simulating the same boundary conditions as in the experiments. Within the linear elastic assumption, the true microscopic elastic modulus  $E_{micro}$  can then be determined by:

$$E_{micro} = \frac{E_{macro}}{E_{comp}} * E_0 \quad (5)$$

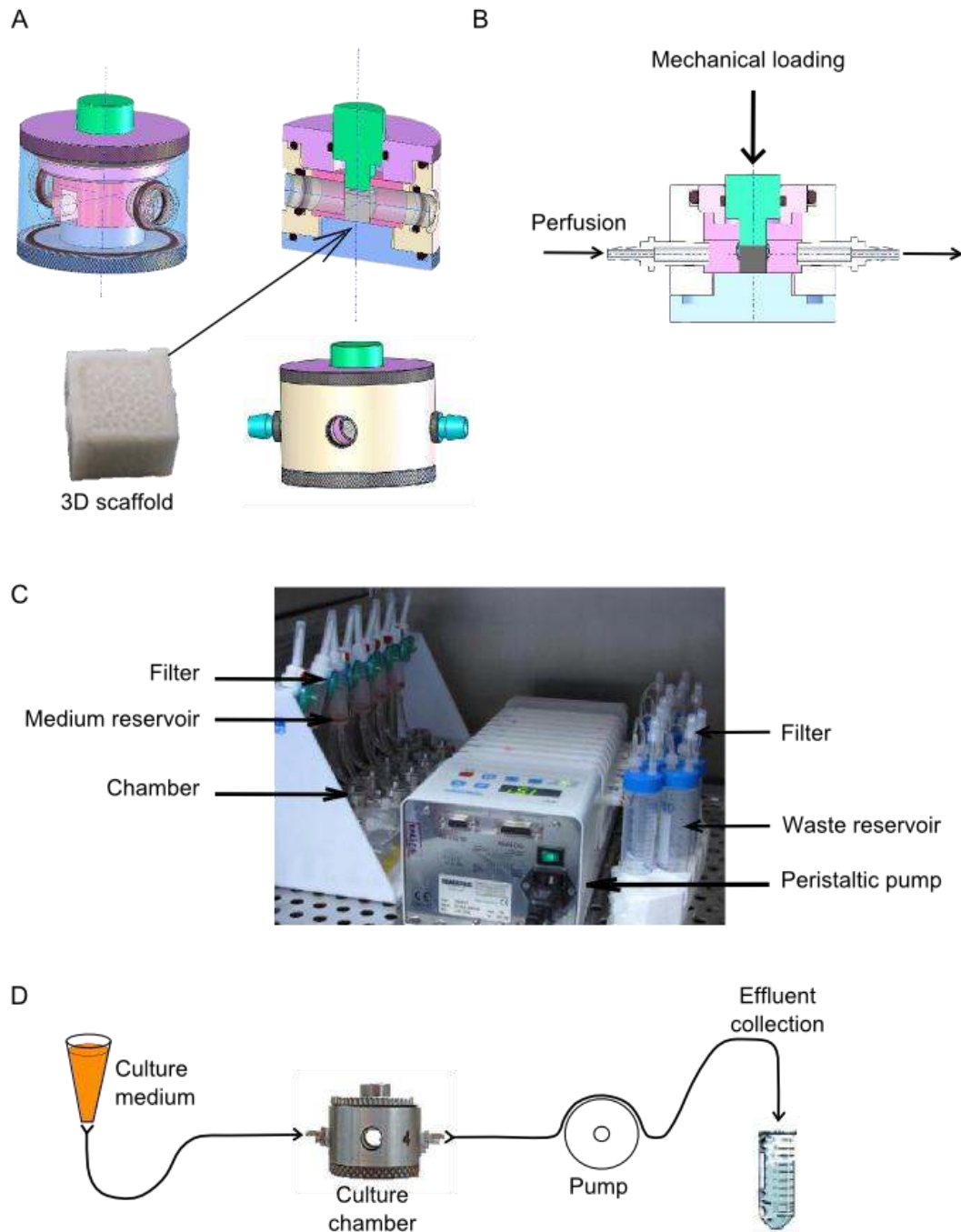
The output of interest was the distribution of strains inside the porous part of the scaffold.

### Bioreactor

The major components of the bioreactor culture system were a steel culture chamber (Figure 1A, B) connected to a peristaltic pump. During the experiment, both were located in an incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in dry atmosphere (Figure C). The culture chamber was designed to enable direct perfusion of the medium through the scaffold, which was inserted into a close-fitting slot (Height 5-5.25 x Depth 5.25 x Width 5.25) (Figure 1A, B). The top portion of the chamber was a mobile piston which allowed vertical mechanical loading of the scaffold. The bioreactor was compatible with the Zetos<sup>®</sup> compression device [40, 47, 48] which can exert cyclic compression on the mobile piston through a piezo-electric actuator controlled by a computer program. The sides of the bioreactor were transparent for optical monitoring of the sample (Figure 1A) and the mobile top and bottom pieces fitted with polytetrafluoroethylene (PTFE) o-rings to prevent leakage. The scaffold was perfused by means of a peristaltic pump (IPC-N, Ismatec, Glattbrugg, Switzerland) using 2-stop tubing (Masterflex, Beligneux, France). Before perfusing the bioreactor, the media was contained in an infusor (Codan, Vallauris, France) where a port in the infusor wall allowed medium and CO<sub>2</sub> equilibration as well as medium changes. The port was plugged by a 22 µm sterile syringe filter (Pall, Ann Arbor, MI, USA) to avoid contamination. The peristaltic pump (IPC-N, Ismatec, Glattbrugg, Switzerland) was inserted between the chamber and a waste collector (Figure 1C). Up to 12 perfused chambers could be run in parallel (Figure 1C). Chambers and the fluid circuits were sterilized by autoclaving (121°C for 20 min) before use.

Oxygen measurements were performed using a flow-through oxygen mini-sensor (FTC, PreSens, Regensburg, Germany) based on the quenching of luminescence by oxygen. This system does not consume oxygen and is independent of the flow rate. The sensor is connected by optical fibres to a transmitter device (Fibox-3, PreSens) connected to a computer. Two FTC sensors were incorporated into the fluid circuit, respectively 1 cm from the inlet and the outlet of the chamber. The temperature was monitored at the location of

the chamber with a temperature sensor (Pt 1000, PreSens) connected to the transmitter. Oxygen and temperature were measured once a day during the 3 week of experiments.



**Figure 1.** Bioreactor and fluid circuits. (A) The bioreactor and exploded view. The scaffold location is indicated by the arrow. (B) The bioreactor with piston on top, which allows mechanical loading perpendicular to the direction to perfusion flow. Picture (C) and schema (D) of the bioreactor and the fluid circuits, consisting of the culture chamber, medium reservoir, filter, waste reservoir, and peristaltic pump.

### *Cell isolation and 3D culture*

Mice (129sv/CD1 mixed background) were bred in the PLEXAN facility of the University of Jean Monnet medical faculty (Saint-Etienne, France) at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 12 h light/dark cycle. Mice were fed A03 food (Scientific Animal Food and Engineering, Aury, France) and had free access to tap water.

Six day-old mice were killed by decapitation; the skull caps (calvariae) were dissected out and processed as described below. The procedure for the care and euthanasia of the animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization 90SV08) and animal experiments were approved by the local Animal Care Committee.

The calvariae were isolated, cleaned of contaminating connective tissues, dissected along the sagittal suture and pooled [49]. The bone pieces were digested at  $37^\circ\text{C}$  with 0.4 wt% of Collagenase type 1 (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) in Ham's F-12 Medium (Sigma). The cells extracted during the first 5 min of digestion were discarded and six consecutive digestions, from 5 to 20 min, were performed. The cells were pooled, filtered and plated in T-75 flasks in Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Sigma), and 10% fetal calf serum (FCS, Biowest, France) (hereafter referred to as culture medium).

Before seeding, the scaffolds were immersed in the culture medium under vacuum for 30 min to remove air bubbles. Calvarial cells were trypsinized 24 h after plating, then  $1.5 \times 10^6$  cells added to a scaffold in a tightly-sealed 5 mL vial, gently rotated for 24 h at 15 rpm and  $37^\circ\text{C}$  and seeded scaffolds then inserted into medium-filled chambers. To induce osteogenesis, the perfusion culture medium was supplemented with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid (Sigma) and 10 mmol/L beta-glycerophosphate (Sigma). 3D cell cultures were performed for 7, 14 or 21 days and the medium in the tank was changed every two or three days.

The efficiency of the seeding was assessed by counting the cells left in the vial. The number of cells adherent to the porous face was also counted manually in 10 randomly-selected fields/scaffold ( $40\,000\ \mu\text{m}^2$ ). Using the same method (10 fields/scaffold), the number of cells inside the scaffold was investigated after cutting the scaffold at the middle (i.e. parallel to perfusion direction) by means of a razor blade (Accu-Edge®, Feather safety razor co., Osaka, Japan). On average, one field encompassed 2 half-pores (corresponding to a calculated surface area of  $0.454\ \text{mm}^2$ ).

### *Macroscopic characterization of cellular activity*

For immunolabeling, the scaffolds were rinsed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature (RT). They were then cut in half, further fixed in PFA for 15 min and again extensively washed in PBS.



Anti-mouse FN primary rabbit antibody (Sigma, ref. 051M4777) was used to label fibronectin (FN) using Alexa-Fluor®-488 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA, ref. A011034) as the secondary label. For collagen type 1 (Coll1), an anti-mouse Coll1 primary rabbit antibody (Abcam, Cambridge, UK, ref. ab292) and Alexa-Fluor®-555 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, ref. A21428) were used.

All primary antibodies were diluted 1:100 in PBS containing with 10% serum from the secondary antibody species (labeling buffer) and incubated overnight at 4°C in a humid chamber. The pieces were rinsed with PBS and incubated with a mixture of the respective secondary antibodies (1:100) and 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Chemicon, Temecula, CA, 0,1 µg/mL) in labeling buffer for 1.5 h at RT. After rinsing, the scaffolds were examined using a Zeiss AxioObserver® fluorescent videomicroscope (Zeiss, Le Pecq, France) and images acquired with the AxioCam® camera using the AxioVision® software (Zeiss, version 4.8.1.0).

To evaluate osteoblast differentiation, alkaline phosphatase (ALP) staining was performed on half-scaffolds after 14 days in culture the following the manufacturer's protocol (Alkaline Phosphatase kit, Sigma, Ref. 85L2). After 14 days of culture, mineral nodules were stained bright red by the Alizarin Red Solution (2% in water, pH 4.1-4.3), where half-scaffolds were incubated for 1 min in this solution, washed in distilled water to remove the excess of stain and examined using a light microscope (AxioObserver®, Zeiss).

Scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-6500F, USA) was used to image cells and ECM deposited in the scaffold after 7 days in culture. After a first rinsing in sodium cacodylate buffer solution (0.1 M, pH=7.4), scaffolds were fixed with 2.5% glutaraldehyde buffer for 60 minutes at 4°C and rinsed twice in sodium cacodylate buffer solution (0.1 M, pH=7.4). Cells were dehydrated in successive ethanol baths (30% to 100%) for 10 or 15 min: 30%-10 min, 50%-10 min, 70%-10 min, 80%-10 min, 90%-10 min, 95%-15 min and 100%-15 min. Pellets were immersed in hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma) for 30 s then dried and stored in a desiccator. Finally, just prior to imaging, pellets were coated with a thin gold layer by the low vacuum sputter coating method to create an electrically-conductive surface.

#### *RNA extraction and QRT-PCR*

Frozen scaffolds (in liquid nitrogen) were crushed at 3000 rpm for 15 s with two stainless steel beads (0.7 mm, Retsch, Haan, Germany) using a Mikro-Dismembrator S laboratory ball mill (Sartorius, Palaiseau, France) and total RNA isolated by mixing TRI reagent (Sigma) with finely crushed scaffolds. Extracts were centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C to remove debris and RNA isolated from the supernatants following the manufacturer's protocol. Purified RNA concentration was assessed with the Ribogreen kit (Invitrogen) and its quality controlled with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Samples were stored at -80°C until further analyses. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with the iScript™ cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) for

Thermal Cycler (MJ Mini Personal Thermal Cycler, BIO-RAD) according to the manufacturer's instruction.

For QRT-PCR, 0.04µg of cDNA mixture was prepared using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche). Reactions (CFX96TM, BIO-RAD) were performed in 20 µl PCR mixture containing 5X Master Mix (dNTP mixture with dUTP instead of dTTP, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye, Taq DNA Polymerase, and reaction buffer) and forward and reverse primers (10 µM). See Table 2 for primer sequences. For each gene, mRNA expression levels were normalized to cyclophilin A. An RNA sample extracted from mouse calvarial 2D cell cultures was used to build the standard curves from 10-fold dilutions of total RNA. The sized of amplified products were estimated using DNA molecular weight marker after electrophoresis in a 2 wt% agarose gel stained with 1 µg/mL ethidium bromide.

Table 2: Primer sequences (5' to 3') used for real-time QRT-PCR

Genes	Forward	Reverse	PCR product size (pb)	Source
Runx2	ccggaatgatgagaactac	tgtctgtgccttcttggttc	223	NM_009820.4
OSX	atggcgtcctctctgcttg	aaggtcagcgtatggcttct	153	NM_130458.3
Col1a1	cacctcaagagcctgagtc	ttaggcgcaggaaggtcagc	374	NM_007742.3
OPN	cccggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc	193	NM_009263.2
ALP	agttactggcgacagcaagc	ggacctgagcgttggtgta	244	NM_007431.2
OCN	ctctgacctcacagatgcca	ctggctgatagctcgtcaca	190	NM_007541.2
BSP	cggaggagacaacggagaag	gtaagtgtgccacaggct	295	NM_008318.3
Cyclophilin A	tacacccataatggcactg	ccatggcttcacaatgttc	227	NM_008907.1

Abbreviations: OSX, osterix ; Col1a1, collagen I alpha 1 chain ; OPN, osteopontin ; ALP, alkaline phosphatase ; OCN, osteocalcin; BSP, bone sialoprotein

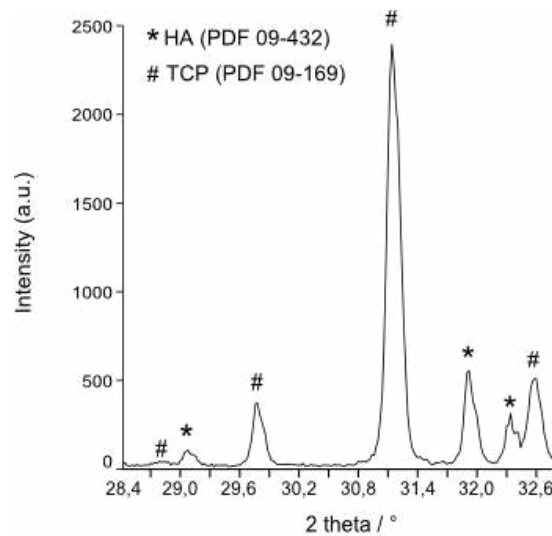
### Statistical analysis

Quantitative data were presented as Mean ± Standard deviation (SD) and the non-parametric Mann-Whitney U-test performed using the STATISTICA® software (version 8.2; StataCorp, College Station, TX).

## Results

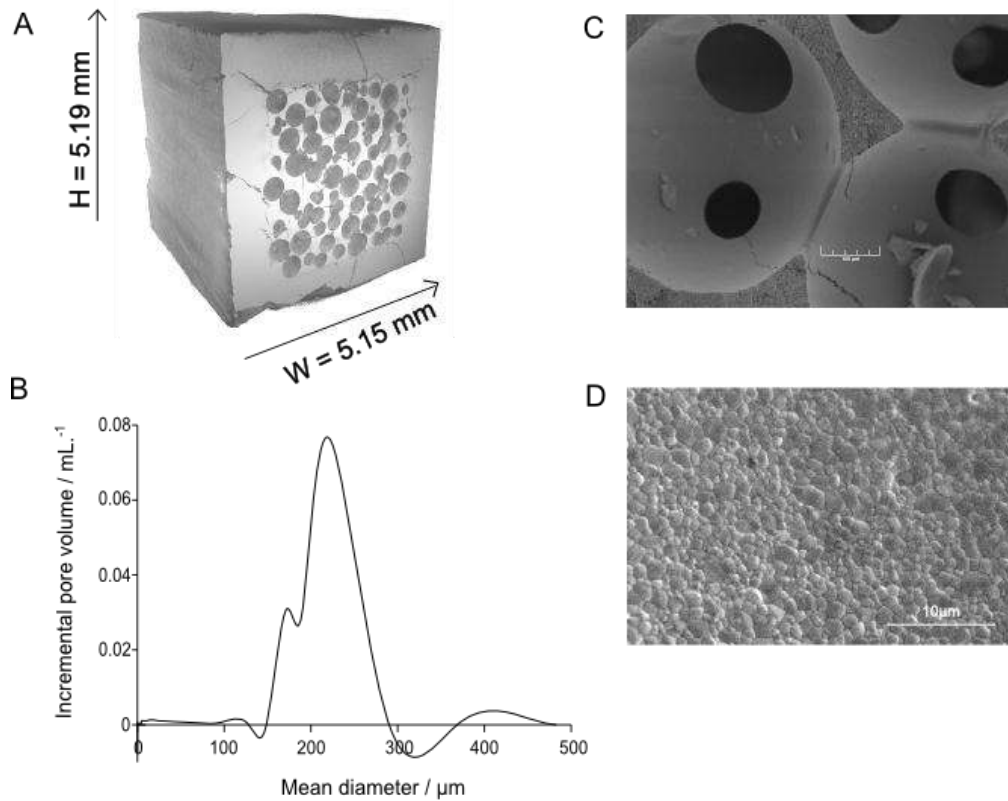
### Scaffold characterization

Macroporous scaffolds, produced with pure lots of HA and  $\beta$ -TCP of powder (data not included), exhibited peaks characteristic of HA (PDF 09-432) and TCP (PDF 09-169), as shown in Fig. 2. No secondary crystalline (XRD) or amorphous phase (IR spectroscopy, data not included) was detected. The percent by weight of the crystalline phase HA and  $\beta$ -TCP in scaffolds, determined by means of the standard method of Raynaud et al. [44], was assessed at  $15.6 \pm 0.3\%$  and  $84.4 \pm 0.3\%$ , respectively (N = 6).



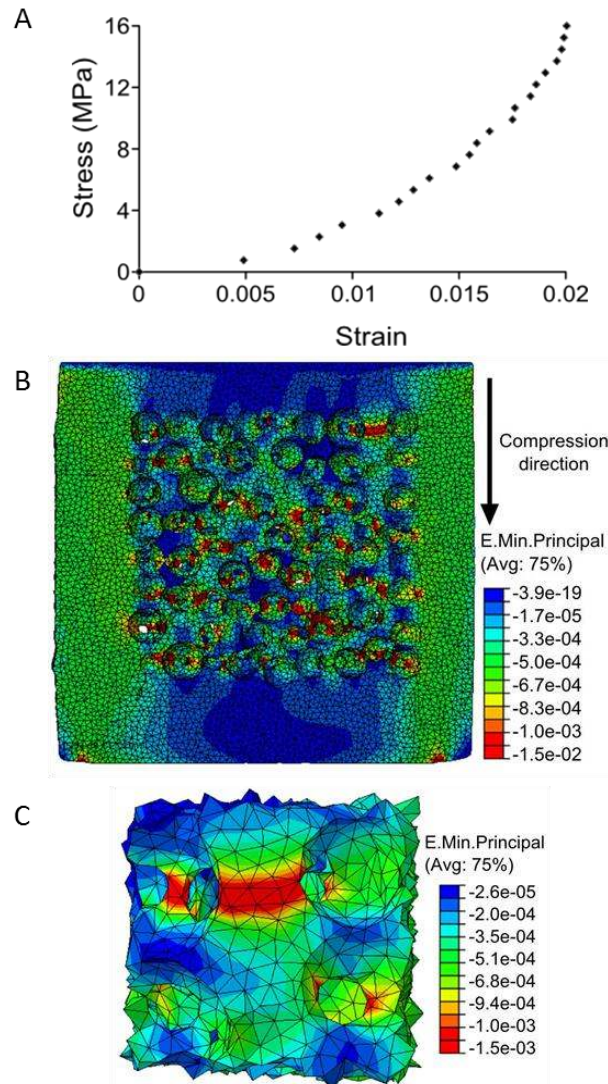
**Figure 2.** Scaffold chemical characterization : XRD patterns of scaffold.

Scaffolds had a cubic geometry H  $5.19 \pm 0.05$  x L  $4.90 \pm 0.20$  x W  $5.15 \pm 0.08$  mm (N = 40), with a 0.9 mm thick dense part (hereafter “cortical”) surrounding the porous internal portion parallel to the direction of perfusion (see Fig. 3A). This original architecture allowed fluid to perfuse the scaffold, improved the mechanical properties and more specifically compressive strength of the scaffold, and allowed for homogeneous compressive load application on the flat surface of the scaffold. Micro-CT measurements (N = 4) showed an average macropore diameter of  $380 \pm 30$   $\mu$ m,  $66 \pm 1\%$  porosity and that macropores were uniformly distributed and interconnected (Fig. 3A). Hg porosimetry measurements (Fig. 3B), taking into account the “bottleneck” structure of the macropores (Fig. 3C), allowed for the evaluation of interconnection diameters which ranged between  $\sim 150$  and  $280$   $\mu$ m. These values were confirmed by SEM image analysis using ImageJ software (data not shown). The ceramic portion of the scaffold was relatively dense, leading to a surface with limited micropores (Fig. 3D).



**Figure 3.** Scaffold physic characterization. (A) 3D display of a scaffold microCT image. (B) Interconnection size evaluation by mercury porosimetry. SEM micrographs of the interconnected pores (C) and the scaffold surface (D).

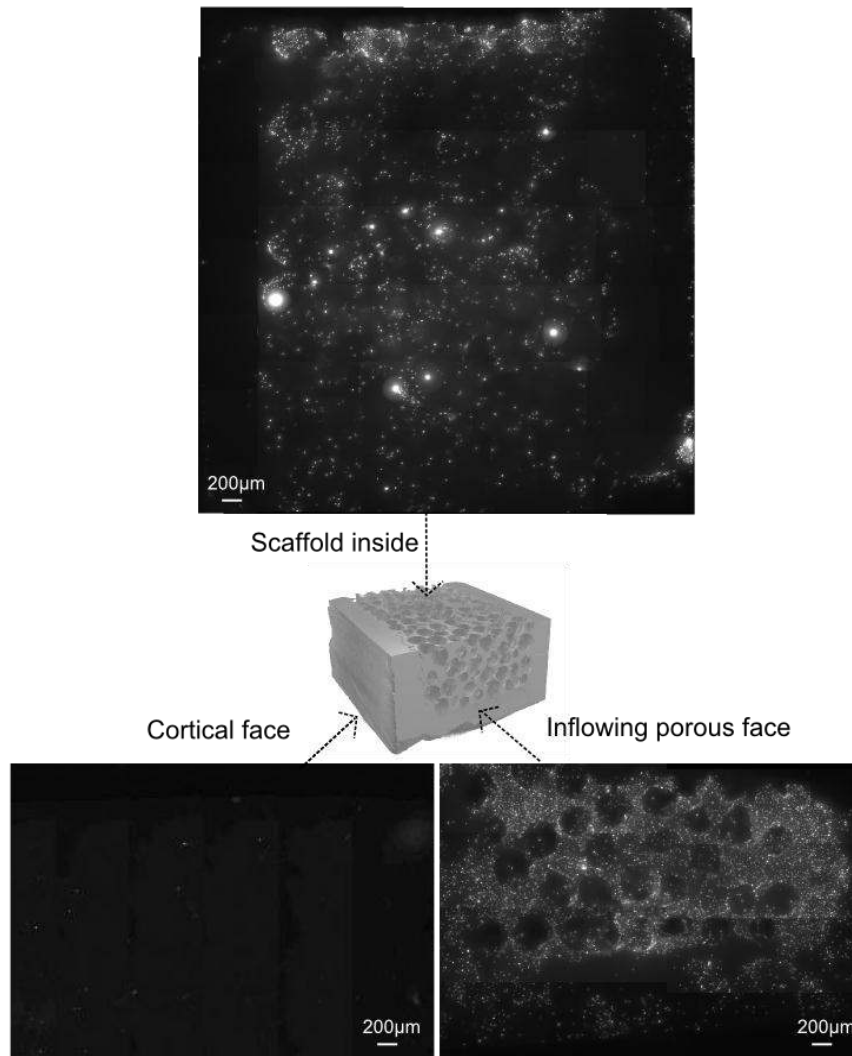
From macroscopic compression tests, stress-strain curves were obtained (see Fig. 4A for a representative curve). The mean macroscopic modulus  $E_{\text{macro}}$  was  $1591 \pm 41$  MPa ( $N = 3$ ) (Fig. 4A) with the microscopic modulus ( $E_{\text{micro}}$ ), obtained by an inverse analysis, was equal to 5432 MPa. The microscopic modulus was used as input data for the Abaqus<sup>®</sup> software used for the numerical simulations. As a first approximation, a purely elastic deformation was assumed, even if scaffolds presented with microporosity and microcracks which could create high stress zones leading to a non-elastic behaviour. The strain distributions within the scaffold, obtained through numerical simulations, are shown in Fig. 4B. Strain levels were low at the top and bottom surfaces and moderated along the vertical “cortical”. Interestingly, higher levels of strain occurred in the porous region within the scaffold, ranging from  $5 \cdot 10^{-4}$  up to  $10^{-2}$  (Fig. 4C).



**Figure 4.** Scaffold mechanical characterization. (A) Stress-strain curve from sample compressing test (B) Distribution of compressive strains inside the scaffold with an applied force of 20N. The table on the left indicates the different colours that correspond to different strain magnitudes in ascending order from the top to the bottom. (C) Detail view of a high strain zone between pores.

#### Cell seeding efficiency

By counting the cells remaining in the rotated vials, it appeared that the cell seeding technique used resulted in high initial cell seeding densities for the scaffolds. An average of  $10^5$  cells remained from the initial  $1.5 \times 10^6$  suspended cells in each vial, indicating that  $\sim 1.4 \times 10^6$  cells were theoretically seeded in/on the scaffold. The distribution of cell nuclei after seeding the scaffold (inside and outside) revealed that cells were absent on the cortical face (Fig. 5), that cells were homogeneously distributed on the porous faces ( $785 \pm 227$  cells/mm<sup>2</sup>) as well as inside the scaffold ( $127 \pm 55$  cell/mm<sup>2</sup>). These data indicated the scaffold architecture, as well as the seeding technique, allowed uniform cell colonization and distribution within the scaffold (Fig. 5).



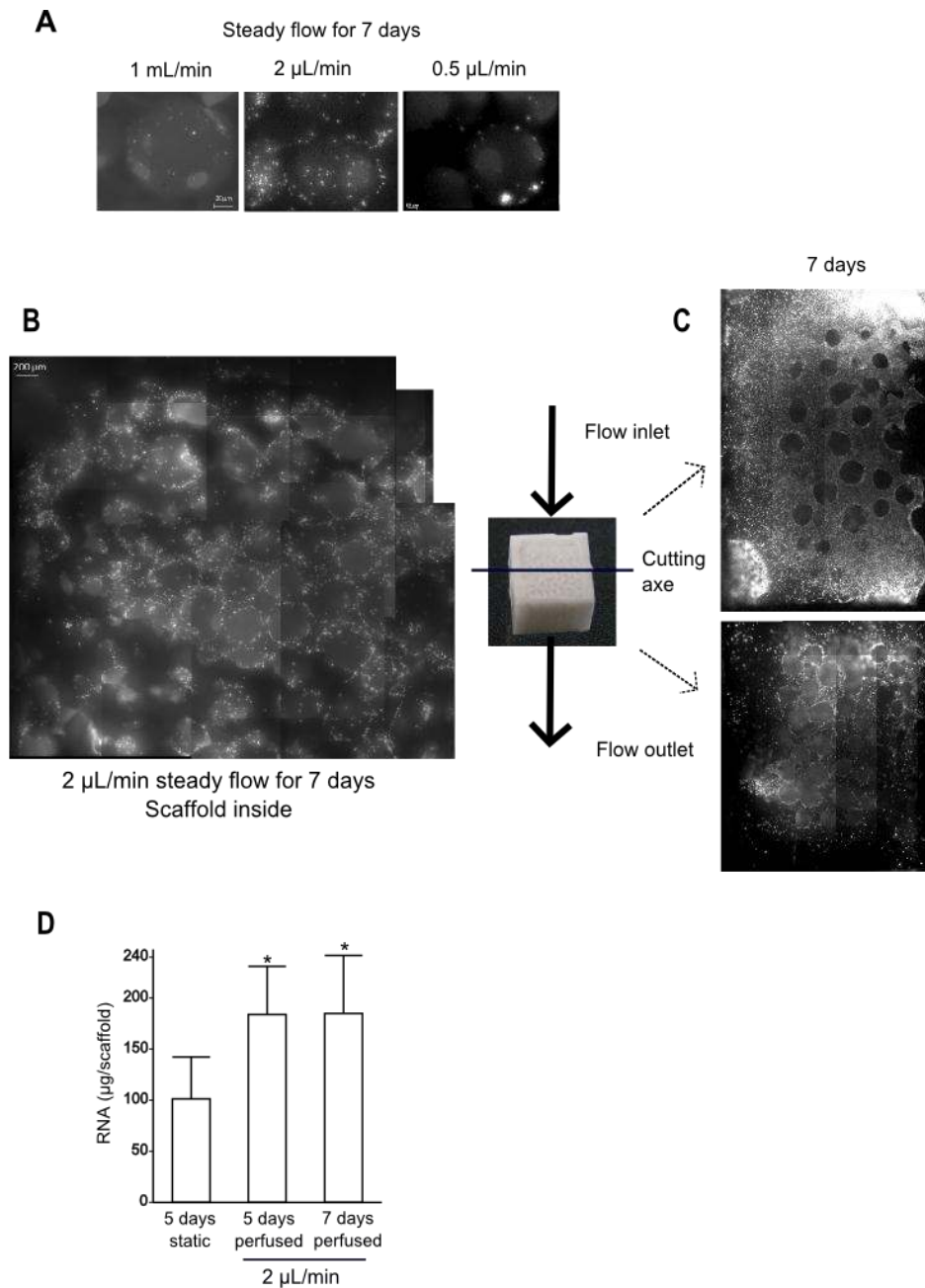
**Figure 5.** Cells distribution inside the scaffold after seeding

#### *Optimisation of scaffold perfusion*

Three steady flow (i.e. non-pulsatile) rates were tested to establish the optimal culture medium perfusion conditions for scaffolds: 1 mL/min (currently used in the literature for 3D cell culture [25, 50-52]), 0.5  $\mu$ L/min (similar to the medium renewal rate used in 2D culture), and 2  $\mu$ L/min for 7 days.

The steady flow rate of 1 mL/min corresponded to complete perfusion of the chamber volume (600  $\mu$ L) in 36 seconds, and compared to the other rates, resulted in low cell adhesion within the scaffolds (Fig. 6A). The very low flow rate (0.5  $\mu$ L/min) was deleterious for cell attachment (Fig. 6A) while the steady flow rate of 2  $\mu$ L/min led to a homogeneous and dense cell distribution within the scaffold (Fig. 6A). Moreover, after 7 days of culture at 2  $\mu$ L/min, the inlet and the outlet surfaces were not obstructed by an excess of extracellular matrix deposition (Fig. 6C).

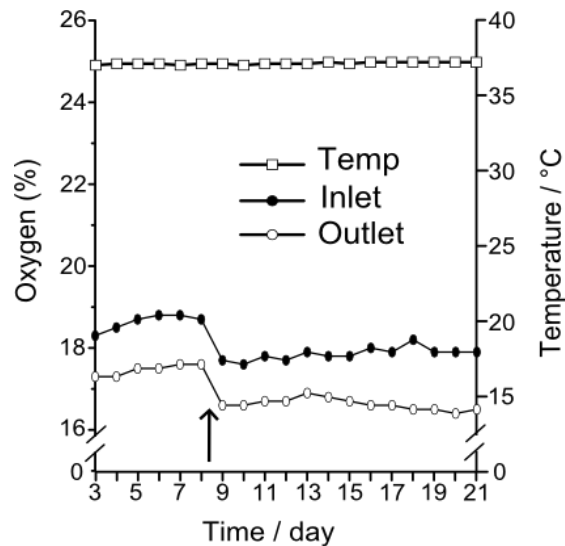
The 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate was compared to static culture (performed in the same culture chamber) without perfusion of medium through the scaffold. Results after 5 days of culture indicated perfusion of the scaffold increased the number of cells by  $\sim 2$ -fold (Fig. 6D).



**Figure 6.** Flow optimization. (A) Micrographs of cultured cells in the scaffold perfused with different fluid flow rates (DAPI stained nuclei) at 7-day. Nuclear distribution (DAPI staining) inside (B) and at inlet and outlet of the scaffold (C). (D) RNA extracted from cells under static and dynamic conditions. \*  $p < 0.05$  vs static.

*Cell viability and 3D culture kinetics*

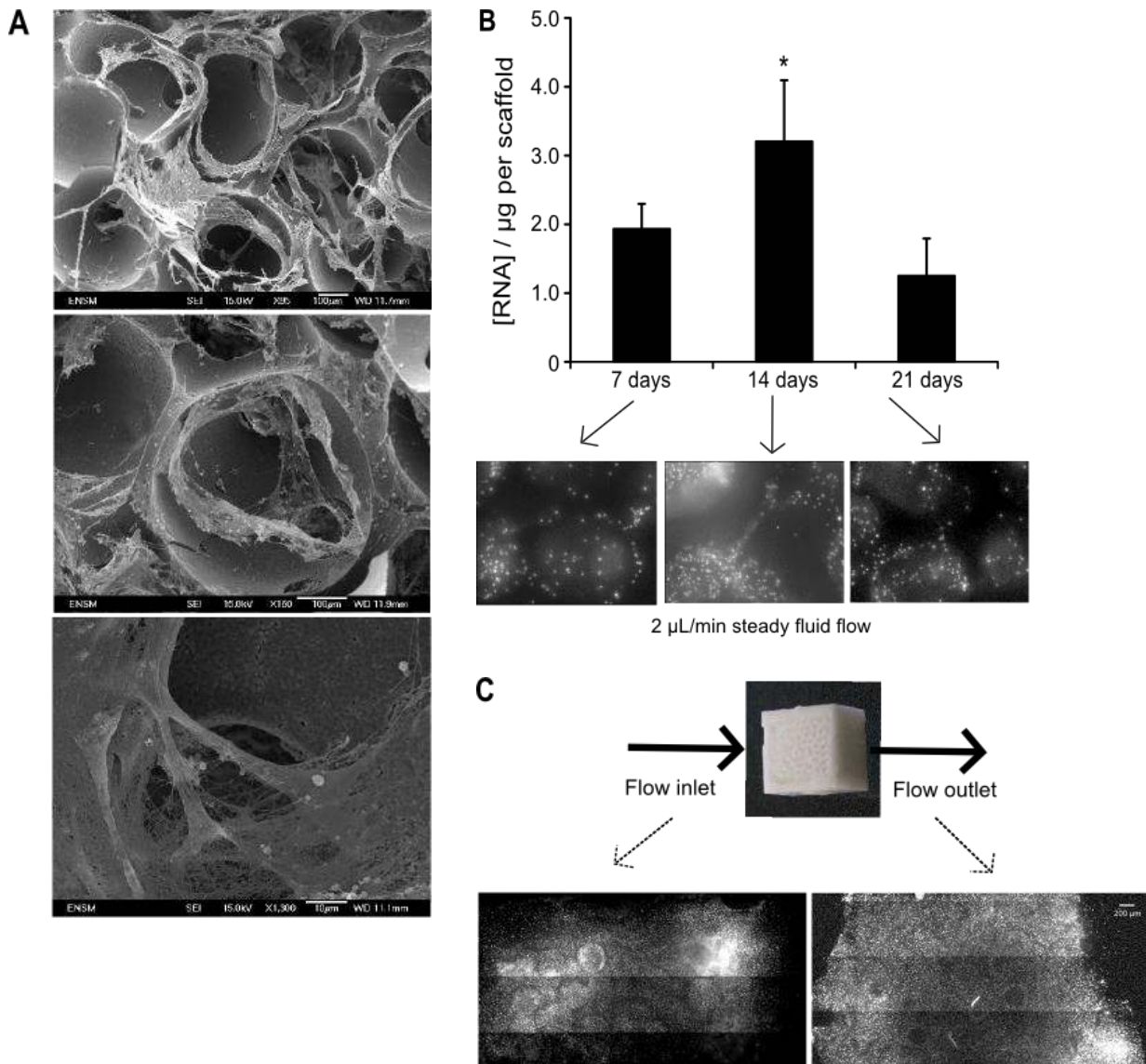
Cellular oxygen consumption was monitored for 21 days by measuring the oxygen concentration of the medium at the inlet and outlet of the chamber (Fig. 7). As expected, oxygen was consumed within the scaffold, confirmed by the lower oxygen concentration in the outflow medium than in the inflow. Results indicated that the difference in concentration between the inflow and outflow remained constant over the cell culture (~1.2%), though a small decrease in concentration was measured between day 8 and day 9:  $18.63 \pm 0.42\%$  to  $17.47 \pm 0.38\%$  for the inflowing medium and  $17.85 \pm 0.15\%$  to  $16.62 \pm 0.14\%$  for the outflowing medium. The temperature remained constant at the nominal value of  $37^\circ\text{C}$  throughout the culture period.



**Figure 7.** Online monitoring of dissolved oxygen concentration in the inlet and outlet medium and temperature during 21 days of culture in the perfused scaffold. Arrow indicates a calibration artifact.

Scanning electron micrographs used to examine the morphological aspects of calvarial cells cultured on scaffolds at day 7 (Fig. 8A) indicated the cells laid down a matrix inside and between the macropores. RNA concentration indicated (Fig. 8B) the number of cells inside the scaffolds increased between culture days 7 and 14, then decreased between culture days 14 and 21. These results were confirmed by confocal microscopy images of cell nuclei at the centre of the scaffolds (Fig. 8B). At day 21, high matrix and cell density were observed at the inlet and outlet surfaces of the scaffold, resulting in an obstruction of the scaffold pores and a non-uniform cell density between the inlet and outlet surfaces as well as within these surfaces (Fig. 8C).





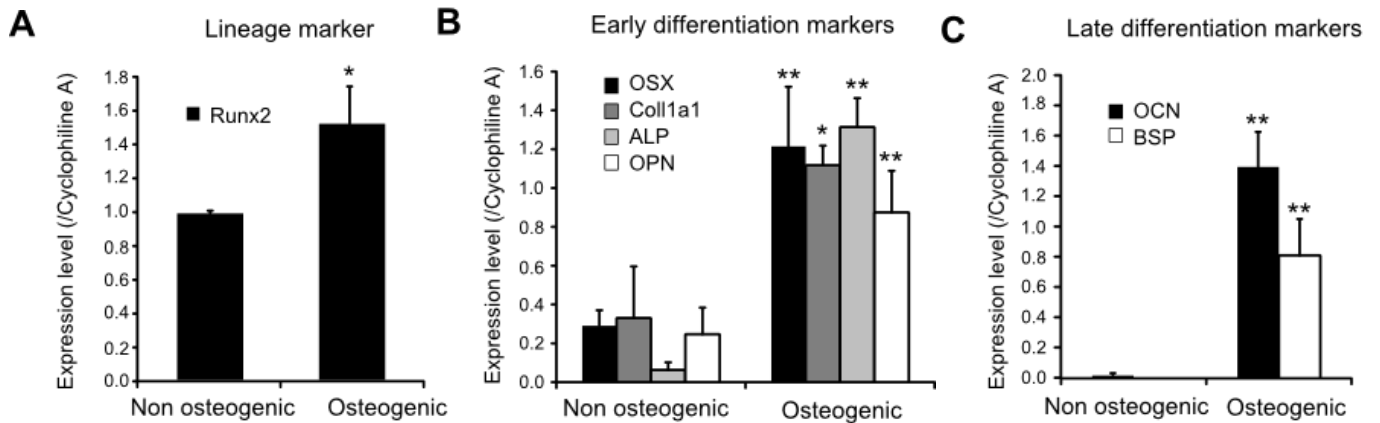
**Figure 8.** Cell viability. (A) SEM micrographs of the scaffold surface (inside and inlet) after 7 days of culture. (B) RNA amount evolution and micrographs showing amount of DAPI stained cell nuclei during culture. (C) Cell (nuclei) distribution at the inlet and outlet of the scaffold after 21 days of culture. \*  $p < 0.05$  vs 21 days.

Unidirectional steady perfusion of the bioreactor at 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  thus permitted uniform cell growth and matrix deposition within the scaffolds for at least 14 days of cell culture.

### Osteogenesis

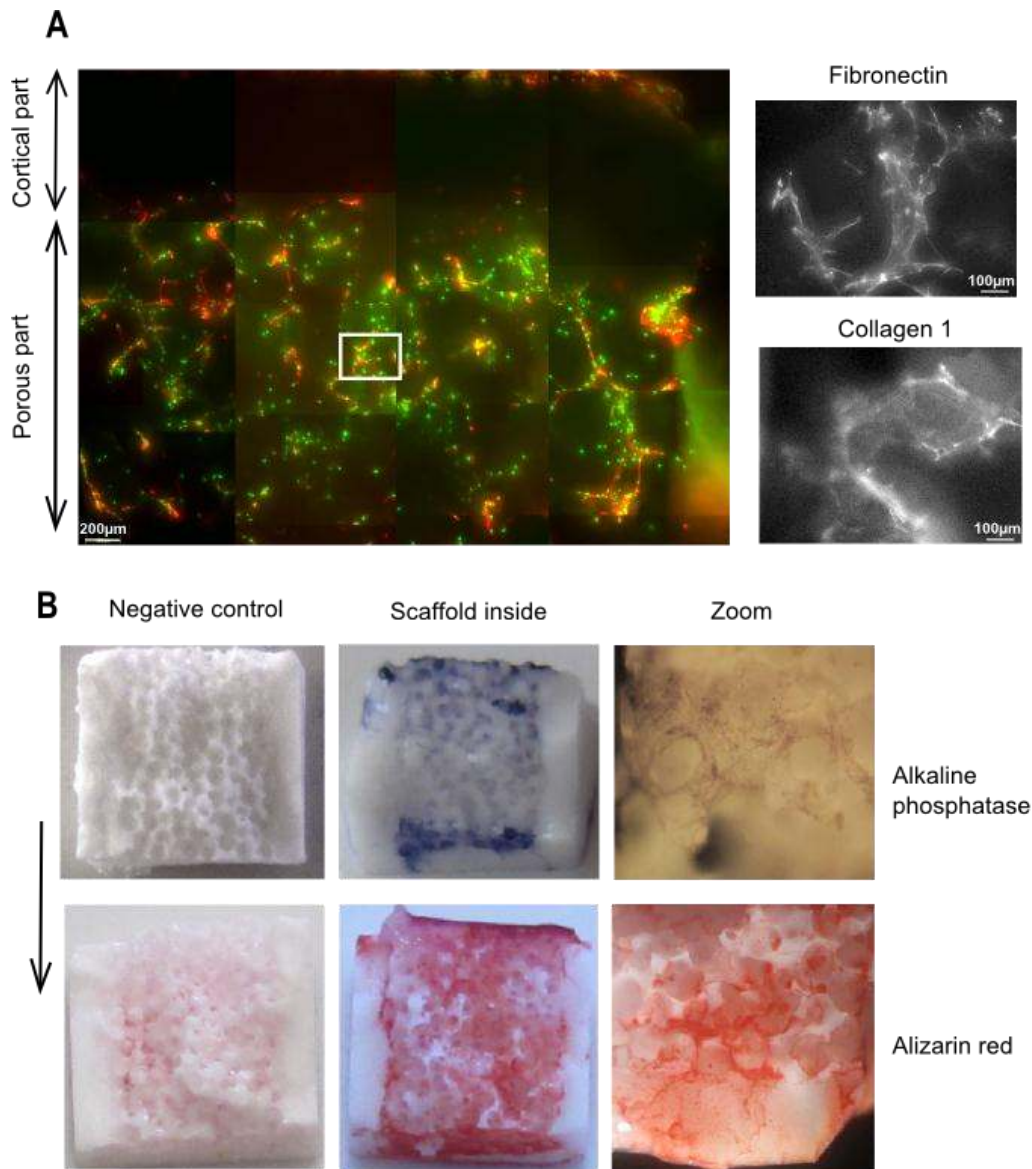
Differentiation of primary calvarial osteoprogenitor cells cultured for 14 days in the scaffolds was evaluated by QRT-PCR. Cultures grown in either osteogenic or standard medium expressed the lineage marker Runx2 (Fig. 9A). Nevertheless, a significant increase (60%) was observed in osteogenic medium compared to non-osteogenic medium. The expression of early osteoblastic differentiation genes, OSX, ALP, Coll1a1 and OPN, was considerably

increased by growth in osteogenic medium (Fig. 9B) while late differentiation markers, OCN and BSP, were exclusively expressed in scaffolds perfused with osteogenic medium (Fig. 9C).



**Figure 9.** Gene expression by the primary osteoprogenitor cells cultured in the scaffold for 14 days with or without osteogenic medium. (A) Lineage marker, (B) early and (C) late differentiation gene expressions (normalized by cyclophilin A). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs non osteogenic.

Bone matrix formation and mineralization in the scaffold were observed after 14 days of osteogenic culture using immunolabeling and differential staining (Fig. 10). Both Fibronectin (FN) and Collagen 1 (Coll1) networks appeared within the macropores, where DAPI-labelled cell nuclei (red dot-plot, Fig. 10A) were co-localized with a homogeneous distribution of FN and Coll1 inside the scaffold (Fig. 10A). Moreover, both osteoblast differentiation and mineralized matrix deposition, revealed by alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining, respectively, were observed throughout the scaffold (Fig. 10B) though both were clearly more intense at the inlet and outlet surfaces than within the scaffold.



**Figure 10.** Osteogenesis by primary osteoprogenitor cells cultured in the scaffolds for 14 days. (A) Micrographs (along the flow axis) of nuclei inside the scaffold stained with DAPI (green) and immunolabelled fibronectin network (red). Higher magnification (rectangle) of immunolabelled fibronectin and collagen 1. (B) ALP and alizarin red stained culture (indicating mineralization) inside the scaffold. Arrow indicates flow direction.

### Discussion

The bioceramic design was optimized to be efficiently perfused and mechanically stimulated. The interconnected macroporosity, evaluated at 70%, previously reported as an optimal value [53], associated with the dense shell limiting medium flow bypass between the chamber wall and the scaffold sides, was homogeneously seeded and perfused. This result

supported a recent study which suggests that a quadrangular design improves scaffold perfusion compared to the cylindrical design frequently used [54]. More generally, the high control of macropores and interconnections diameters, micropore density, as well as the phase and chemical compositions of the scaffolds permitted reproducible cell culture. Besides the effect of the “cortical” portion on perfusion, it also improved the global mechanical properties of the scaffold and its ability to withstand high mechanical loading with a macroscopic and microscopic elastic modulus of 1.6 GPa and 5.4 GPa, respectively. These values are similar to what is been reported for human trabecular bone tissue [55], where the macroscopic elastic modulus of human trabecular bone tissue varies between 1 and 5 GPa depending on the anatomical site and age, while the microscopic modulus obtained for trabecular bone (by nanoindentation) ranges from 11GPa to 18GPa [55].

It is well known that the mechanical properties of the scaffold affect the cellular response and fate [13]. Indeed, cells have an ability to sense and probe the stiffness of their surroundings as they adhere and interact with the extracellular matrix (ECM) [56]. Consequently, scaffolds for bone often contain ceramic hydroxyapatite, which has a stiffness similar to bone, while polymers are suitable scaffolds for cartilage, tendon or ligament [11, 57]. Engler et al. have shown that mesenchymal stem cells (MSC) differentiate into different cell types based upon substrate stiffness, where MSCs cultivated on a hard substrate (gel-based) become osteogenic cells [58].

Assuming a relationship between the elastic modulus and material stiffness [59], it appeared that the bioceramic developed for this study possessed sufficient stiffness to promote osteogenic differentiation. According to the numerical results, the highest strain values in loaded scaffolds reached  $\sim 0.01$ , similar to strains experienced by *in vivo* bone tissue during walking; between 0.0024 and 0.0125 according to Nazer et al. [60]. This suggested the scaffold architecture delivered the appropriate stimuli as it reproduced the *in vivo* mechanical competence. Finally, the homogeneous stress distribution in the porous part of the scaffold, emphasized by numerical simulation indicated the strategy, which consisted of applying the loading to a flat surface of a consolidated bioceramic, was mechanically relevant, and that scaffold architecture allowed control of the mechanical stimulation of cells in an accurate manner.

Seeding cells in bioceramics was the first step in establishing a 3D cell culture. This step plays a crucial role in the progression of tissue formation since it should allow a uniform cell distribution and enhanced cellularity [61]. Although static seeding is the most commonly used method, low seeding efficiencies and non-uniform cell distributions are often reported [23, 62, 63]. Therefore, based on the literature [64-66], a dynamic seeding technique was used in this study to improve seeding efficiency. The architecture of the scaffolds combined with the dynamic seeding technique resulted in a homogeneous distribution of cells inside the 3D structure. The absence of cell on the cortical face could be explained by the absence

of micropores, the flat surfaces (i.e. not curved like in the macropores) and/or the exposure of these surfaces to turbulence and/or impact with the vial wall.

Once seeded, the scaffolds were inserted in the perfusion bioreactor for long term culture. Our bioreactor has been simplified, with a minimum number of parts, in order to facilitate handling and limit contamination.

Although diffusion is the predominant mass transfer mechanism used in 2D culture, it is not suitable in 3D culture as the rate of nutrient diffusion through the scaffold is too low to satisfy the needs of the cells within the whole scaffold [67]. Under these conditions, cell growth and matrix production are limited to a depth of 200  $\mu\text{m}$  in PLAGA foams [68]. The rate of nutrient diffusion can be greatly improved by perfusing the scaffold with a unidirectional or oscillatory flow [64, 69, 70] in a continuous or dynamic manner [28, 69, 71]. Additionally, by increasing transportation rates for nutrients and metabolic wastes, a perfusion bioreactor provides a convenient way to mechanically stimulate cells seeded in a scaffold through fluid shear stress [72, 73]. It is well-established that *in vivo* mechanical stimuli are mainly transmitted to bone cells via shear stresses [73], which can be used *in vitro* to stimulate bone formation [74, 75]. Constant perfusion flow rates for 3D cultures reported in the literature range between 1 [76] and 10 mL/min [77]. In our bioreactor, a fluid flow of 1 mL/min proved to be deleterious for cells, as this rate probably exceeded a critical threshold value, inducing cell death or their washing out due to excessive shear stress [50, 78]. These differences in flow rate were potentially due to the differences in construction for the bioreactors. Whereas our system (i.e. bioreactor + scaffold) confined the fluid flow inside the scaffold, many perfusion bioreactors have medium flow bypass, decreasing the flow felt by cells within the scaffolds [47, 79, 80]. A 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  steady flow maintained for 14 day resulted in homogeneous cell distribution and matrix deposition into the scaffold, indicating that this flow profile, combined with the bioceramic physico-chemical properties and architecture, allowed cells to first adhere then spread onto the bioceramic surface. The perfusion setting enhanced delivery of nutrients throughout the scaffold for 14 days, and maintained constant oxygen levels (at the inlet and outlet of the bioreactor) for 21 days, at values equivalent to 2D culture (21%). The metabolic consumption of oxygen by cells within the scaffold was consistent with those observed in other studies run for a shorter culture time (up to 7 days) [66, 81, 82]. The small decrease in oxygen levels observed on each side of the chamber between day 8 and day 9 was probably due to a technical problem with the oxygen sensor, since it worked without interruption and without recalibration for 21 days.

Cells grown under these conditions differentiated into functional osteoblasts. Real-time QRT-PCR results showed significantly increased expression levels of all osteoblastic genes present under osteogenic conditions, including Runx2. Increased expression of Runx2 indicated that the cells were committing to the osteoblastic lineage. The fibronectin network, observed on the pore surfaces, suggested the beginning of osteoid deposition [83], where the fibronectin network serves as a pattern for subsequent establishment of collagen fibres.

The overexpression of early osteoblast-specific genes under osteogenic conditions, including osterix, collagen type 1, ALP and OPN, confirmed osteogenic differentiation. Mature osteoblast marker overexpression of OCN and BSP, indicated that at least part of the cells in the scaffold were fully differentiated and able to mineralize the matrix (confirmed by alizarin red staining). These results indicated that, similar to 2D culture systems, primary bone formation can be induced in the 3D culture system by perfusing the scaffolds with a steady fluid flow of osteogenic medium. While culturing cells in a 3D scaffold perfused with a steady flow of non-osteogenic medium (2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) was not enough to fully differentiate calvarial cells in osteoblasts, perfusion parameters, and consequently induced shear stresses, could change the cell behaviour and fate in this model. Thereby, further works will analyse cellular responses to other perfusion profiles such as oscillatory flows [64], in an effort to maximise osteoblast cell differentiation and bone matrix deposition in the scaffolds.

The system developed for this study was optimized for intermediate term applications (0-14 days). At 14 days, osteogenesis was more marked at the inlet and outlet of the scaffold and was probably due to the higher density of cells. The normal, homogeneous growth of cells through the entire scaffold from day 0 to day 14, indicated that nutrients (including oxygen) were normally delivered within the scaffold, despite pore obstruction. The only limiting factor was cell density, which was higher at the inlet and outlet of the scaffold, which was a result of the seeding step. This observation emphasized the importance of the seeding in achieving a homogeneous cell density throughout the scaffold and so a controlled cell culture (homogeneous cell behaviour) [18].

Apart from the cell density, it is known that the behaviour and fate of cells grown in scaffolds are influenced by several parameters such as scaffold architecture (e.g. the shape, the size, the distribution and the interconnection of the macropores), scaffold mechanical properties (which affect intrinsic mechanical stimuli experienced by the cells at the macroscopic and microscopic level), or the convective flow (i.e. mass-transport through perfusion and scaffold deformation) [13, 84-87]. The engineered *in vitro* 3D cell culture systems developed for this study could be adapted/improved for other applications such as long term cell culture (e.g. >21 days) by adjusting scaffold properties (e.g. composition, architecture) and perfusion conditions. In any case, the modification of the scaffold architecture would necessitate adaptation of perfusion parameters to the new design. At first glance, computed modelling would be the better and cheaper way to predict the effects of architecture or perfusion modifications on the physical parameters which affect cell behaviour (such as shear stress or scaffold permeability).

This study highlighted that the development and the follow-up of such controlled and constrained systems require multi- and trans-disciplinary knowledge and experimental, know-how implying close collaboration between biology (molecular and cellular), engineering, physicochemistry and mechanics (of solid and fluid matter) experts. In further

work, another important issue will be the development of mathematical models and biostatistics tools capable of predicting the outcome of cell bioprocesses.

### **Conclusion**

The goal of this study was to create a new engineered *in vitro* 3D cell culture system combining a perfusion bioreactor and a cubic calcium phosphate scaffold in an effort to improve upon existing systems with regards to controlling the culture (e.g. perfusion, culture time) and mechanical stimulation of seeded cells. This was a proof-of-concept study for osteoblastic cell culture in a 3D culture system under perfusion. A perfusion bioreactor setup was designed, which could mechanically stimulate cells within the scaffold, in addition to an original and highly controlled cubic macroporous calcium phosphate bioceramic, which allowed reproducible cell culture and was able to withstand high mechanical loading and deliver appropriate stimuli as it reproduced the *in vivo* mechanical conditions. After a homogeneous seeding inside the scaffold, this system allowed for the reproducible cultivation of calvarial cells without any contamination. The system permitted accurate control of key cell culture parameters (e.g. O<sub>2</sub>, sterility, mass-transfer) similar to 2D models, but in a system physiologically similar to bone *in vivo* (e.g. calcium phosphate inorganic matrix, organic matrix, cells) which would drive calvarial cell from multiplication to matrix mineralization.

Bioreactor-based 3D model systems are powerful *in vitro* tools serving to limit the use of animal models. In the long run, this system could facilitate the understanding of structure-function relationships under normal and pathological conditions. Moreover, they may provide tools for bench-testing factors in toxicological or pharmacological studies.

### **Acknowledgements**

We thank Marc Binet from System Industrie (Pierrelatte, France) for lending us the Presens transmitter device, Jérôme Molimard (ENMSE) and Norbert Laroche (LBTO) for their technical help, and Nicolas Curt (ENMSE) for the bioreactor manufacturing. The study was funded by the European Space Agency (ERISTO program, CCN n°8 ESTEC, contract number 4200014232 (formerly 14232/00/NN/SH)) and the French Ministry of Research (PhD fellowship to Guénaëlle Bouët).

## References

- [1] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294:1708-12.
- [2] Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:633-9.
- [3] Ishii I, Tomizawa A, Kawachi H, Suzuki T, Kotani A, Koshushi I, et al. Histological and functional analysis of vascular smooth muscle cells in a novel culture system with honeycomb-like structure. *Atherosclerosis*. 2001;158:377-84.
- [4] Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 1972;54:626-37.
- [5] Hay ED. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd Edition ed. New York Plenum Press.; 1991.
- [6] Burridge K, Tsukita S. Editorial overview: Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;13:525-8.
- [7] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010;123:4195-200.
- [8] Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 2009;462:433-41.
- [9] Owen SC, Shoichet MS. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;94:1321-31.
- [10] Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of cell science*. 2003;116:2377-88.
- [11] Abousleiman RI, Sikavitsas VI. Bioreactors for tissues of the musculoskeletal system. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;585:243-59.
- [12] Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue engineering Part A*. 2009;15:205-19.
- [13] Bouët GM, D.; Malaval, L.; Vico, L. Tissue engineering strategies for experimental approaches: *in vitro* bone tissue. *Biomaterials*. Submitted.
- [14] Anselme K. Biomaterials and interface with bone. *Osteoporosis International*. 2011;22:2037-42.
- [15] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17:137-46.
- [16] Rawsterne RE, Todd SJ, Gough JE, Farrar D, Rutten FJM, Alexander MR, et al. Cell spreading correlates with calculated logP of amino acid-modified surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2007;3:715-21.
- [17] Abousleiman RI, Sikavitsas VI. Bioreactors for Tissues of the Musculoskeletal System. In: Fisher JP, editor. *Tissue Engineering*: Springer US; 2007. p. 243-9.
- [18] Melchels FPW, Barradas AMC, van Blitterswijk CA, de Boer J, Feijen J, Grijpma DW. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:4208-17.
- [19] Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, Zeppetelli S, Netti PA. Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(epsilon-Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation *In vitro*. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16:2661-73.
- [20] Grayson WL, Vunjak-Novakovic G, Obradovic B. Bioreactors in tissue engineering. In: Obradović B, editor. *Cell and Tissue Engineering*. Belgrade, Serbia: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 217-27.
- [21] Pecqueux F, Tancret F, Payraudeau N, Bouler JM. Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment. *Journal of the European Ceramic Society*. 2010;30:819-29.
- [22] Alvarez-Barreto JF, Sikavitsas VI. Improved mesenchymal stem cell seeding on RGD-modified poly(L-lactic acid) scaffolds using flow perfusion. *Macromol Biosci*. 2007;7:579-88.



- [23] Alvarez-Barreto JF, Linehan SM, Shambaugh RL, Sikavitsas VI. Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures. *Ann Biomed Eng.* 2007;35:429-42.
- [24] Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84:205-14.
- [25] Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, et al. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A.* 2008;14:1809-20.
- [26] Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. *In vivo* bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng.* 2004;10:33-41.
- [27] Yang J, Cao C, Wang W, Tong X, Shi D, Wu F, et al. Proliferation and osteogenesis of immortalized bone marrow-derived mesenchymal stem cells in porous polylactic glycolic acid scaffolds under perfusion culture. *J Biomed Mater Res A.* 92:817-29.
- [28] Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. *In vitro* generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2488-93.
- [29] Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:3299-304.
- [30] Janssen FW, van Dijkhuizen-Radersma R, Van Oorschot A, Oostra J, de Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. Human tissue-engineered bone produced in clinically relevant amounts using a semi-automated perfusion bioreactor system: a preliminary study. *J Tissue Eng Regen Med.* 4:12-24.
- [31] Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology.* 2006;43:481-8.
- [32] Rauh J, Milan F, Gunther KP, Stiehler M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews.* 2011;17:263-80.
- [33] Yeatts AB, Fisher JP. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering Part C, Methods.* 2011;17:337-48.
- [34] Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of biomedical engineering.* 2004;32:112-22.
- [35] McCoy RJ, O'Brien FJ. Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review. *Tissue engineering Part B, Reviews.* 2010;16:587-601.
- [36] Kim J, Ma T. Perfusion regulation of hMSC microenvironment and osteogenic differentiation in 3D scaffold. *Biotechnology and bioengineering.* 2012;109:252-61.
- [37] Suck K, Roeker S, Diederichs S, Anton F, Sanz-Herrera JA, Ochoa I, et al. A rotating bed system bioreactor enables cultivation of primary osteoblasts on well-characterized Sponceram regarding structural and flow properties. *Biotechnology progress.* 2010;26:671-8.
- [38] Wang TW, Wu HC, Wang HY, Lin FH, Sun JS. Regulation of adult human mesenchymal stem cells into osteogenic and chondrogenic lineages by different bioreactor systems. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2009;88:935-46.
- [39] Cartmell SH, Rathbone S, Jones G, Hidalgo-Bastida LA. 3D sample preparation for orthopaedic tissue engineering bioreactors. *Methods in molecular biology.* 2011;695:61-76.
- [40] Davies CM, Jones DB, Stoddart MJ, Koller K, Smith E, Archer CW, et al. Mechanically loaded *ex vivo* bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater.* 2006;11:57-75; discussion
- [41] Van Dyke WS, Sun X, Richard AB, Nauman EA, Akkus O. Novel mechanical bioreactor for concomitant fluid shear stress and substrate strain. *Journal of biomechanics.* 2012;45:1323-7.

- [42] Descamps MD, T.; Monchau, F.; Lu, J.; Hardouin, P.; Hornez, J.C.; Leriche, A. Manufacture of macroporous  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008;28:149-57.
- [43] Descamps MH, J.C.; Leriche, A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Journal of the European Ceramic Society*. 2007;27:2401-6.
- [44] Raynaud SC, E.; Bernache-Assolant D.; Laval J.P. Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry. *Journal of the American Ceramic Society*. 2001;84:359-66.
- [45] Shibata Y, He LH, Kataoka Y, Miyazaki T, Swain MV. Micromechanical property recovery of human carious dentin achieved with colloidal nano-beta-tricalcium phosphate. *Journal of dental research*. 2008;87:233-7.
- [46] van Rietbergen BW, H.; Huiskes, R.; Odgaard, A. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite-element models. *Journal of biomechanics*. 1995;28:69-81.
- [47] Dumas V, Perrier A, Malaval L, Laroche N, Guignandon A, Vico L, et al. The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials*. 2009;30:3279-88.
- [48] David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, et al. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:117-26.
- [49] Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone*. 1998;23:119-25.
- [50] Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldborg RE. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs *in vitro*. *Tissue Eng*. 2003;9:1197-203.
- [51] Janssen FW, Oostra J, Oorschot A, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: *in vivo* bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*. 2006;27:315-23.
- [52] Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue engineering*. 2003;9:549-54.
- [53] Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, et al. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:327-36.
- [54] Hidalgo-Bastida LA, Thirunavukkarasu S, Griffiths S, Cartmell SH, Naire S. Modeling and design of optimal flow perfusion bioreactors for tissue engineering applications. *Biotechnology and bioengineering*. 2012;109:1095-9.
- [55] Guo XE. Mechanical properties of cortical bone and cancellous bone tissue. In: S.C. C, editor. *Bone mechanics handbook*. Florida: CRC Press; 2000.
- [56] Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310:1139-43.
- [57] Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:297-303.
- [58] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-89.
- [59] Chiesa RC, A. Biomimetic, bioresponsive, and bioactive materials : integrating materials with tissue. In: J. SMPG, editor. *Biomimetic, bioresponsive, and bioactive materials*: Wiley; 2012. p. 141-60.
- [60] Al Nazer R, Lanovaz J, Kawalilak C, Johnston JD, Kontulainen S. Direct *in vivo* strain measurements in human bone-a systematic literature review. *Journal of biomechanics*. 2012;45:27-40.
- [61] Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;33:15-30.

- [62] Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2347-59.
- [63] Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:376-82.
- [64] Du D, Furukawa KS, Ushida T. 3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102:1670-8.
- [65] Godbey WT, Hindy SB, Sherman ME, Atala A. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25:2799-805.
- [66] Janssen FW, Hofland I, van Oorschot A, Oostra J, Peters H, van Blitterswijk CA. Online measurement of oxygen consumption by goat bone marrow stromal cells in a combined cell-seeding and proliferation perfusion bioreactor. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006;79:338-48.
- [67] Mueller SM, Mizuno S, Gerstenfeld LC, Glowacki J. Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14:2118-26.
- [68] Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998;19:1405-12.
- [69] Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, Reis RL, Mikos AG. *In vitro* localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng*. 2006;12:177-88.
- [70] Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Eng*. 2005;11:1832-9.
- [71] Jaasma MJ, Plunkett NA, O'Brien FJ. Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *J Biotechnol*. 2008;133:490-6.
- [72] Hillsley MV, Frangos JA. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43:573-81.
- [73] Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001;22:2581-93.
- [74] Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12600-5.
- [75] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2005;33:63-70.
- [76] Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, Pompe W, Gelinsky M. Mineralised collagen--an artificial, extracellular bone matrix--improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2008;19:269-75.
- [77] Jagodzinski M, Breitbart A, Wehmeier M, Hesse E, Haasper C, Krettek C, et al. Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture. *Journal of biomechanics*. 2008;41:1885-91.
- [78] Singh H, Ang ES, Lim TT, Hutmacher DW. Flow modeling in a novel non-perfusion conical bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 2007;97:1291-9.
- [79] Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D, et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials*. 2003;24:2277-86.
- [80] Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T. Application of perfusion culture system improves *in vitro* and *in vivo* osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *Tissue engineering*. 2003;9:1205-14.

- [81] Abaci HE, Devendra R, Smith Q, Gerecht S, Drazer G. Design and development of microbioreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments. *Biomedical microdevices*. 2012;14:145-52.
- [82] Volkmer E, Otto S, Polzer H, Saller M, Trappendreher D, Zagar D, et al. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone *in vitro* using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2012;23:2793-801.
- [83] Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*. 2002;30:699-704.
- [84] Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28:1036-47.
- [85] Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbuhl R, Bohner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an *in vitro* and *in vivo* study. *Acta biomaterialia*. 2008;4:1904-15.
- [86] Correia C, Bhumiratana S, Sousa RA, Reis RL, Vunjak-Novakovic G. Sequential application of steady and pulsatile medium perfusion enhanced the formation of engineered bone. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:1244-54.
- [87] Khatiwala CB, Peyton SR, Metzke M, Putnam AJ. The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *Journal of cellular physiology*. 2007;211:661-72.

## B.2. Discussion et perspectives à court terme

Nous avons développé et validé un modèle de culture ostéoblastiques en 3D. Ce modèle représente le chaînon manquant entre la culture cellulaire en 2D, qui ne représente pas fidèlement l'environnement *in vivo* des cellules, et l'animal, qui est un modèle complexe et dont l'usage est soumis à une réglementation de plus en plus restrictive.

Les modèles 3D *in vitro* comme le nôtre sont développés dans le but d'améliorer nos connaissances sur les interactions entre les cellules et leur micro-environnement (bio)-chimique, biophysique, ou encore biomécanique, ainsi que sur les voies de régulation cellulaire du tissu osseux. A l'heure actuelle, les législations sur l'expérimentation animale se durcissent et visent, partout dans le monde, à en limiter l'utilisation, et ce plus particulièrement dans le cadre de l'élaboration de nouveaux médicaments ou de produits cosmétiques. Ainsi, ces modèles de culture suscitent un intérêt grandissant, notamment pour tester et valider l'action de molécules ciblant le tissu osseux.

Comme nous l'avons vu dans la [partie C.5. du 1<sup>er</sup> chapitre](#), la modélisation numérique joue un rôle très important dans la conception de tels modèles de culture. Elle reste cependant un outil sous-utilisé dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la biologie en général. Sans doute à cause d'un déficit d'interaction entre les différents domaines scientifiques (*e.g.* biologie, mathématiques, biomécanique, physico-chimie). En plus d'être un outil puissant et rentable pour le design et l'optimisation de modèles de culture en 3D, la modélisation permet également de mieux comprendre les aspects fondamentaux des réponses cellulaires dans des environnements 3D complexes.

La collaboration établie entre le laboratoire INSERM U1059-LBTO et le Centre Ingénierie et Santé de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne a permis de modéliser les champs de contrainte au sein de la biocéramique. Cette modélisation a été très utile et nous a indiqué que la compression appliquée était bien transmise à l'intérieur du support 3D, là où se situent les cellules. Cette modélisation ne prend cependant pas en compte le milieu de culture. Or, comme nous l'avons vu dans la [partie « C.2.2.2.2 Effects of macroscopic mechanical loading » du 1<sup>er</sup> chapitre](#), une compression exercée sur un os ou une biocéramique engendre, en plus d'une déformation macroscopique de la structure, un mouvement de fluide générant des forces de cisaillement au niveau des cellules. Ce type de modélisation est complexe car il est d'une part multifactoriel, et d'autre part car il doit prendre en compte l'architecture plus ou moins complexe de la biocéramique. Cette modélisation est toutefois essentielle car elle nous donnerait accès à des informations utiles quant aux réelles forces s'exerçant sur les cellules lors, par exemple, de compressions répétées. Il serait également intéressant de modéliser le flux de perfusion à l'intérieur de la biocéramique afin d'adapter plus finement le débit de la pompe péristaltique en fonction de la force de cisaillement subie par les cellules. Bien entendu, ces forces de cisaillement sont fonction de l'architecture macroscopique et microscopique de la biocéramique, nécessitant

un modèle numérique spécifique/unique par biocéramique (*e.g.* structure, composition, densité de micropores).

An niveau biologique, ce système de culture permet aux cellules de se multiplier et de se différencier en ostéoblastes qui minéralisent la matrice qu'ils ont déposée. Cette minéralisation est surtout observée à l'entrée et à la sortie de la biocéramique, certainement en raison de la plus forte densité cellulaire. Or, comme démontré dans le cadre de l'étude sur la BSP, la densité cellulaire a une influence sur le devenir des cellules. Dans le but d'obtenir des densités cellulaires homogènes sur toute la surface de l'échantillon et ainsi de pouvoir cultiver des cellules sur des temps plus long (supérieur à 21 jours par exemple), l'architecture interne de la biocéramique peut être optimisée (*e.g.* structure en forme de macro-canaux traversant). Ceci permettrait de faciliter la colonisation de la biocéramique par les cellules lors de la phase critique de l'ensemencement, mais aussi la modélisation du flux de perfusion et les échanges. Cette modification de l'architecture nécessiterait une ré-adaptation de la perfusion ainsi que de la contrainte appliquée à l'échantillon. Cette mise au point devrait dans un premier temps passer par une étape *in silico* via les modélisations, avant de passer à une étape *in vitro*.

La validation de notre modèle concernant les contraintes mécaniques s'arrête à la modélisation de celles-ci dans la biocéramique. La [partie C.2. du 3<sup>ème</sup> chapitre](#) présente toutefois des données préliminaires sur l'effet des contraintes mécaniques sur des cellules de calvaria cultivées dans notre système de culture 3D *in vitro*.

## C. Ostéogenèse en 3D sous contrainte mécanique – Données préliminaires

### C.1. Ostéogenèse par les cellules KO BSP cultivées en 3D

#### C.1.1. Contexte

Comme nous l'avons dit précédemment, la BSP est un gène de réponse rapide à la contrainte mécanique. C'est pourquoi nous avons souhaité analyser le comportement de cellules de calvaria issues de souris BSP<sup>-/-</sup> dans un environnement 3D. Comme indiqué plus haut, le simple fait de cultiver ces cellules sur un support 3D, qui plus est perfusé, constitue une contrainte mécanique, et nous voulions vérifier si la mutation affectait leur comportement dans ces conditions, en particulier par rapport au support 2D. Nous avons ainsi cultivé les MCC BSP<sup>-/-</sup> dans notre système de culture 3D avec un flux de 2 $\mu$ L/min continu, et étudié leur expression génique après 2 semaines de culture en 3D.

#### C.1.2. Résultats et discussion

De la même manière que les cellules sauvages utilisées dans l'article 2, les MCC BSP<sup>-/-</sup> adhèrent aux biocéramiques et les colonisent entièrement. Leur viabilité et leur comportement sont tout à fait similaires aux cellules sauvages (Figure 21).

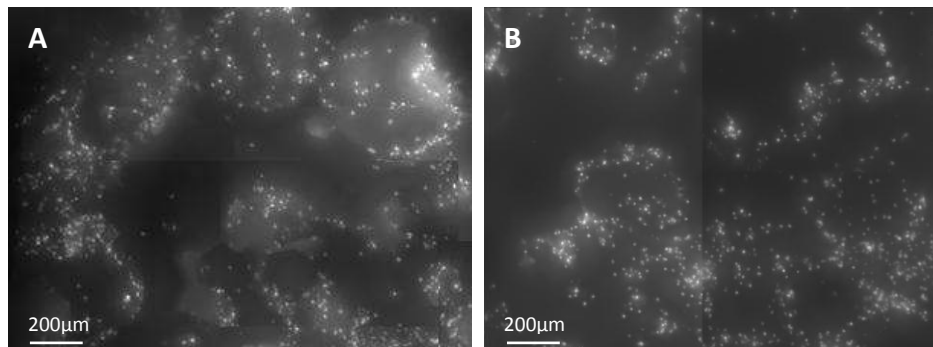


Figure 21 : Cellules de calvaria BSP<sup>+/+</sup> (A) et BSP<sup>-/-</sup> (B) cultivées 7 jours en 3D dans le bioréacteur perfusé (2 $\mu$ L/min continu).

Photographie en mosaïque de l'intérieur de la biocéramique après marquage des noyaux cellulaires au DAPI.

Les cellules BSP<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup> se différencient en ostéoblastes comme l'indiquent l'expression de différents marqueurs ostéoblastiques, tels que OSX et OCN (Figure 22). D'autre part, nos résultats préliminaires indiquent, comme en 2D, la surexpression génique de l'OPN par les cellules BSP<sup>-/-</sup> en culture 3D (Figure 22). Nous remarquons également que l'OCN est exprimée au même niveau dans les deux génotypes. Ce dernier résultat peut être due à la

densité cellulaire plus élevée dans la biocéramique, de l'ordre de 785 cellules/mm<sup>2</sup> sur les faces d'entrée et de sortie et 127 cellules/mm<sup>2</sup> à l'intérieur, par rapport à la culture en 2D dans les conditions standard (soit 50 cellules/mm<sup>2</sup>). En effet, selon la zone analysée de l'échantillon, la densité cellulaire en 3D se situe entre la densité dite standard (50 cellules/mm<sup>2</sup>) et la forte densité (250 cellules/mm<sup>2</sup>) ou est supérieure à la forte densité.

Ces expériences nécessitent d'être répétées (pour diminuer la variabilité interéchantillon) et d'être rapportés à la densité cellulaire dans les biocéramiques.

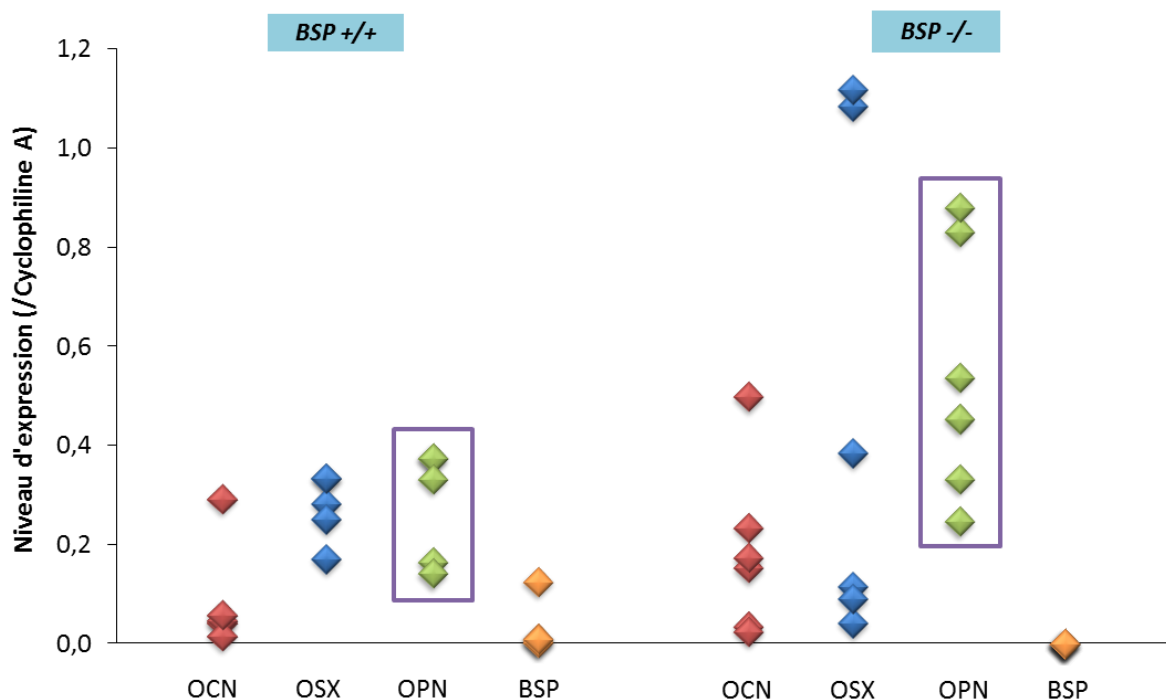


Figure 22 : Niveau d'expression génique de cellules BSP+/+ et -/- cultivées pendant 2 semaines en 3D sous perfusion (2μL/min continu). Chaque valeur correspond à 1 biocéramique analysée.

## C.2. Effet des contraintes mécaniques sur des cellules de calvaria cultivées en 3D

### C.2.1. Contexte

Comme nous l'avons vu dans le [1er chapitre](#), la masse osseuse ainsi que son architecture dépend des stimuli mécaniques appliqués au squelette (Turner 1998). La perte osseuse a lieu lorsque les os porteurs sont en microgravité (Vico *et al.* 2000), tandis que la masse osseuse augmente après la charge mécanique appropriée du squelette. Ces changements de stimulus mécanique modulent le turnover de l'os principalement via le lignage ostéoblastique (Mikuni-Takagaki *et al.* 1996). La voie de signalisation impliquée dans la mécanotransduction ostéoblastique n'est pas totalement connue mais l'implication de gènes précoces comme le facteur de transcription AP-1 (activating protein), et plus précisément c-fos et c-jun, a été



montré *in vivo* et *in vitro* à la fois dans les ostéocytes et les ostéoblastes (Lean *et al.* 1996, Moalli *et al.* 2000). L'importance de c-fos dans la formation osseuse a été démontrée par l'extinction génique de c-fos, qui entraîne une inhibition complète de la formation des ostéoclastes, le développement d'une ostéopétrose (Grigoriadis *et al.* 1994), et une diminution de la différenciation ostéoblastique (Demiralp *et al.* 2002). Au contraire, la surexpression de c-fos est responsable du développement d'ostéosarcome chez la souris (Wang *et al.* 1995) et stimule l'entrée de l'ostéoblaste dans le cycle cellulaire (Sunters *et al.* 1998). L'expression de c-fos est impliquée dans la régulation précoce de l'ostéogenèse, la formation osseuse et la réparation des fractures (Ohta *et al.* 1991).

Au laboratoire, Corinne Granet a étudié le profil d'expression *in vitro* de c-fos (ainsi que d'autres AP-1) en réponse à la déformation mécanique de cellules ostéoblastiques, ROS17/2.8, via le système Flexercell Fx-3000 (Granet *et al.* 2002). Ces expériences ont été réalisées avec une déformation de 1%, qui est la limite maximale physiologique mesurée dans les os de membres d'athlètes (Milgrom *et al.* 2000), et à fréquence faible (0,05 Hz) dans le but de limiter le shear stress induit par les mouvements du milieu de culture. Cette étude a montré que c-fos était exprimé (ARNm) de façon précoce et transitoire, à savoir entre 10 et 30 min, en réponse à la déformation mécanique. Au niveau protéique, c-fos est présent dans le noyau cellulaire entre 20 et 45 min après la fin du stimulus. Cette étude nous a donc donné des éléments quant à la cinétique d'expression de c-fos.

D'autre part, nous savons que parmi les divers stress mécaniques qui ont été appliqués pour stimuler les cellules osseuses, la charge de compression est apparue comme étant ostéogénique (Rath *et al.* 2008). L'appareil ZetOs™ (Figure 23) a été conçu dans l'optique de produire des contraintes mécaniques sur une biopsie osseuse (cylindriques de  $\varnothing=10\text{mm}$ , et  $h=4\text{mm}$ ). Il est constitué d'une chambre de culture pouvant être perfusée, et d'un dispositif permettant de contraindre, par l'intermédiaire d'un piston, l'échantillon situé dans la chambre de culture. Il a ainsi pu être montré (David *et al.* 2008) qu'après 3 semaines de culture dans le ZetOs™, les biopsies d'os trabéculaire bovin montraient une meilleure activité et différenciation ostéoblastique, un module d'Young plus élevé, et une résistance à la rupture supérieure aux échantillons non contraints. Ce travail a donc permis de montrer qu'il était possible, grâce au ZetOs™, de retrouver *in vitro*, les effets produits *in vivo* par les contraintes mécaniques.

L'intensité et la fréquence des contraintes optimale pour stimuler le métabolisme osseux restent néanmoins des paramètres mal renseignés dans la littérature. Un consensus semble tout de même se dégager autour du concept "basse amplitude/haute fréquence" (BAHF) (Rubin *et al.* 2001, Judex *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2003, Dumas *et al.* 2009). *In vivo*, lors de la locomotion, qui est connue pour être ostéogénique, l'os est naturellement soumis aux contraintes en compression et reçoit à la fois des contraintes haute amplitude/basses fréquences et des BAHF (figure 2 de la partie C du 1<sup>er</sup> chapitre) (Fritton *et al.* 2000). Ainsi, ces deux types de stimulations mécaniques sont présentes *in vivo*, ce qui laisse supposer que leur combinaison serait une stratégie pour améliorer l'ostéogenèse dans un modèle 3D de biomatériaux cellularisés par des ostéoblastes. C'est le travail qu'a réalisé Virginie Dumas au

laboratoire. Son étude a montré qu'une déformation de 0.1% à 25 Hz modulée par un signal sinusoïdale à 3Hz (régime combiné) augmentait l'expression génique et protéique de collagène et de fibronectine par des cellules MG63ensemencées dans des biomatériaux macroporeux d'HAP, cultivés dans le ZetOs<sup>TM</sup> (Dumas *et al.* 2009). Ces travaux ont cependant été réalisés dans des conditions inadéquates du fait de la forme cylindrique de la céramique (et de la chambre), qui ne permettait pas une perfusion homogène du biomatériau. Le grand diamètre (10mm) et le décalage de  $\pi/4$  des entrées et sorties n'autorisaient en effet pas la perfusion de la partie centrale. C'est pourquoi les études de Virginie Dumas ont été réalisées avec des temps de culture courts, soit 6 jours maximum.

Il était donc nécessaire de concevoir une nouvelle chambre de culture, (i) perfusable, (ii) pouvant s'adapter au système ZetOs<sup>TM</sup> et (iii) permettant de cultiver sur le long terme des biomatériaux cubiques de petite taille. L'architecture cubique a été choisie afin (i) d'appliquer une contrainte mécanique homogène sur toute la surface de la biocéramique et (ii) de perfuser de façon homogène une surface plane.

Après avoir modélisé les contraintes mécaniques appliqués aux biocéramiques via le ZetOs<sup>TM</sup> et montré que celles si étaient transmises aux cellules de la partie poreuse à l'intérieur de l'échantillon ([partie B1 : article 2](#)), nous avons répété les expériences réalisées par Virginie Dumas avec notre nouveau système. Ainsi, des cellules de calvaria de souris sauvages ont été cultivées à court terme dans notre modèle et soumises à 15 min de stimulation mécanique à régime combiné (25Hz + 3Hz). L'expression génique de ces cellules a ensuite été étudiée à différents temps post-stimulation en accord avec les résultats obtenus par Corinne Granet et Virginie Dumas (même si nous étions bien conscients que les systèmes de culture, types cellulaire, etc, n'étaient pas les mêmes).

Comme expliqué précédemment la MEC joue un rôle important dans le maintien et la modulation de la fonction osseuse. Plusieurs études suggèrent que la structure et l'organisation de la matrice en 3D peuvent influencer le phénotype des cellules (Cukierman *et al.* 2001, Salaszyk *et al.* 2004, Salgado *et al.* 2004). Des protéines de la MEC contribuent à la régulation de la survie et de la différenciation des ostéoblastes, comme la fibronectine (Globus *et al.* 1998), le collagène (Suzawa *et al.* 2002) ou encore l'OPN (Huang *et al.* 2004, Kojima *et al.* 2004) ou la BSP. Bien que ces protéines soient présentes en faible quantité par rapport à la masse totale de protéines de la MEC, elles modulent de façon coordonnée une large variété de fonctions spécifiques de l'os incluant la minéralisation (Boskey 1989, Hunter and Goldberg 1993, Harris *et al.* 2000), l'adhésion cellulaire (Roche *et al.* 1999, Harris *et al.* 2000) (Horton 1995) et le remodelage osseux (Ek-Rylander *et al.* 1994, Razzouk *et al.* 2002)). Ainsi, nous avons observé les modifications des protéines de la MEC en réponse à la contrainte mécanique ainsi que de certains marqueurs ostéoblastiques.

### C.2.2. Matériel et méthode

#### C.2.2.1. Dispositif de compression mécanique : le Zetos™

Le “système de diffusion et de contrainte” a été conçu à l’Université Phillips de Marburg en Allemagne par l’équipe du Dr. David Jones. Il a été développé pour appliquer des compressions cycliques sur des biopsies osseuses cylindriques cultivées dans une chambre de culture perfusée (David *et al.* 2008). La force appliquée ainsi que la déformation de l’échantillon peuvent être mesurés simultanément pendant la charge. La fréquence et l’amplitude de la compression appliquée sur les échantillons peuvent être prédéfinies ou spécifiées par l’expérimentateur. Il est ainsi possible d’utiliser le Zetos™ comme un outil de compression pour les biomatériaux. Dans nos expériences, nous avons appliqué une force de compression dynamique sur le piston de la chambre pour stimuler mécaniquement les cellules cultivées dans la biocéramique. Au moment de la contrainte, les bioréacteurs « contraints » et « témoins » sont déconnectés de la pompe péristaltique pour être placés dans le système Zetos™ (Figure 23) maintenu au cours des expériences à 37°C dans un incubateur. Un système de vis permet d’appliquer une « précharge » (« preload ») statique (5N, 1mm) sur l’échantillon afin de s’assurer que le piston de la chambre de culture et la surface de la biocéramique soient bien en contact. Le dispositif de contrainte est entièrement piloté par ordinateur grâce à un module électronique. Il possède un déclencheur piezoélectrique (situé dans le piston de mise sous contrainte) qui transforme une tension électrique en expansion linéaire. La réponse à la force exercée est une charge électrique directement proportionnelle à l’amplitude de la charge mécanique subie. Au niveau du piston se trouve un capteur de charge permettant de contrôler la charge appliquée au biomatériau.

#### C.2.2.2. Signal mécanique appliqué

Le logiciel de commande permet le chargement dynamique des échantillons avec différents signaux mécaniques, soit standard (sinusoïdal, triangulaire, carré) soit définis par l’utilisateur à partir d’une équation, pouvant représenter par exemple un signal physiologique (marche, saut, course) ou une partie de ce signal (*e.g.* BAHF). Le second paramètre à prendre en compte est le temps : la durée et la fréquence de répétition du signal. L’amplitude du signal est réglée soit en force soit en déplacement. Le signal validé par Virginie Dumas est une onde sinusoïdale basse fréquence (3 Hz) avec une amplitude de 1000  $\mu$ strain (*i.e.* déformation par rapport à la taille initiale) sur laquelle est superposée une vibration haute fréquence (25 Hz) et basse amplitude (200  $\mu$ strain) (Figure 24). Tous les bioréacteurs « contraints » ont été soumis à un unique épisode de 15 min de compressions cycliques après quoi ils reprenaient place dans l’incubateur d’origine et étaient reconnectés à la pompe péristaltique pour 20min, 1h, 14h ou 2 jours de culture supplémentaire. Les échantillons obtenus ont ensuite été étudiés du point de vue de leur expression génique

selon le protocole présenté dans l'article précédent (Partie B du 3<sup>ème</sup> chapitre, page 128-129). Les bioréacteurs « témoins » n'ont été soumis à aucune sollicitation mécanique.

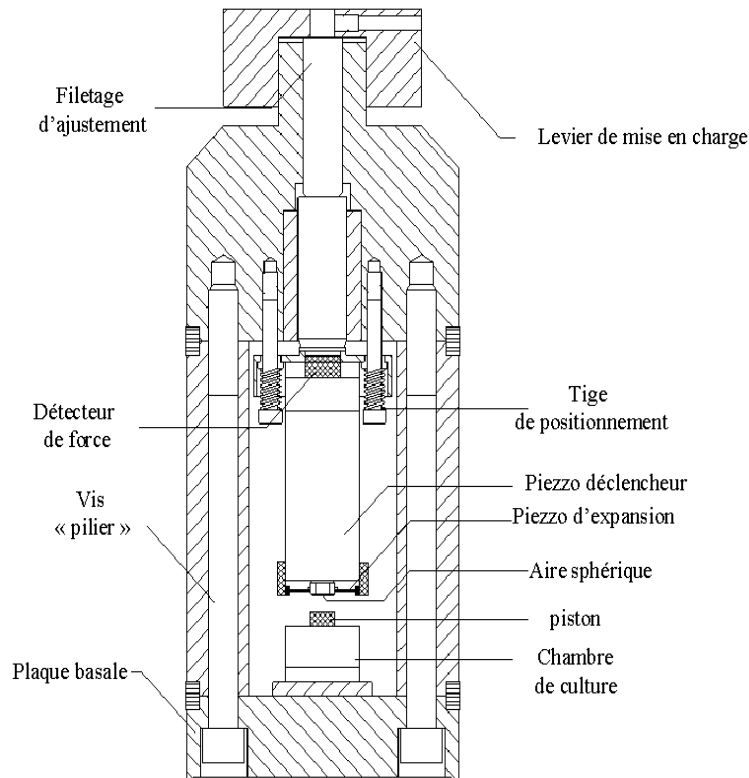


Figure 23. Schéma de l'appareil du ZetOs™.

Grâce à un mécanisme de senseurs et d'effecteurs piézo-électriques, une contrainte en déplacement est appliquée par l'aire sphérique sur le piston de la chambre de culture, renfermant un biomatériau. (Jones et al. 2003)

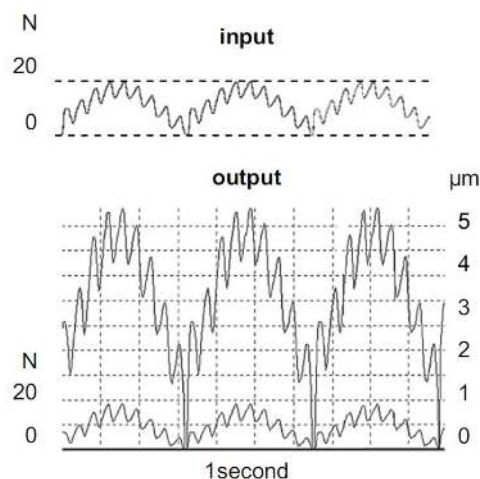


Figure 24 : Signal mécanique utilisé.

(A) graphique correspondant au signal entrant et (B) graphique correspondant au signal sortant. La courbe supérieure représente la déformation ( $\mu\text{m}$ ) et la courbe inférieure représente la force (N). (Dumas et al. 2009)

### C.2.3. Résultats et discussion

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression génique de c-fos, qui comme nous l'avons vu dans la [partie C.2.1.](#), est un gène de réponse très rapide à la contrainte mécanique. Nous avons également étudié l'expression de protéines matricielles : l'OPN et la BSP qui sont des gènes répondant à la contrainte mécanique (ainsi que des marqueurs de différenciation) comme nous l'avons évoqué dans le [1<sup>er</sup> chapitre](#). Et enfin nous avons évalué l'expression d'OSX qui est un marqueur pré-ostéoblastique (comme Coll1 et BSP) (Nakashima *et al.* 2002). Nous avons choisi d'étudier l'expression de ces 4 gènes selon le plan d'expérience présenté dans la *Figure 25A*. Plus précisément, nous avons tout d'abord regardé l'expression génique 20 min et 14h après la fin de la stimulation mécanique réalisée à J5 (*Figure 25B*). Ce choix a été motivé par les résultats obtenus précédemment au laboratoire : Corinne Granet a observé l'expression de c-fos 20 min après la fin de la stimulation et Virginie Dumas a observé une augmentation de l'expression de protéines matricielles (collagène et fibronectine) 14h après la fin de la stimulation.

A 20 min, nous observons une surexpression de c-fos dans la condition stimulée comparée au témoin, cependant cette différence n'est pas significative. En effet, nous avons une très forte variabilité (écart-types très importants) inter-échantillons dans ces conditions. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que seulement 20 min après la stimulation, le système n'a pas eu le temps de récupérer du stress subi lors de la contrainte. Il n'y a aucune différence d'expression d'OSX et OPN entre les 2 conditions testées. A 14h, la variabilité inter-échantillon est moins importante mais il n'y a toujours aucune différence entre les 2 conditions pour aucun gène. La BSP n'est exprimée à ce stade dans aucune condition.

Nous avons alors observé l'expression de ces gènes 1h après la stimulation mécanique, pour avoir une évaluation à court terme dans un système stabilisé (*Figure 25C*). Dans ces conditions, nous n'avons de nouveau observé aucune différence significative entre les cellules stimulées et les témoins, avec encore une variabilité inter-échantillon marquée, et toujours la même tendance à la hausse des valeurs de c-fos sous contrainte (*Figure 25C*).

Enfin, nous avons décidé d'observer 2 jours après la stimulation mécanique l'expression de ces gènes précoces ainsi que celle des gènes ostéoblastiques, Coll1a1 et OCN (*Figure 25D*). Après 2 jours de culture supplémentaire, tous les marqueurs étudiés sauf la BSP avaient des niveaux d'expression mesurables. Cependant, aucun effet de la stimulation mécanique sur l'expression d'aucun des gènes étudiés n'a été non plus observé à ce stade plus tardif (*Figure 25D*).

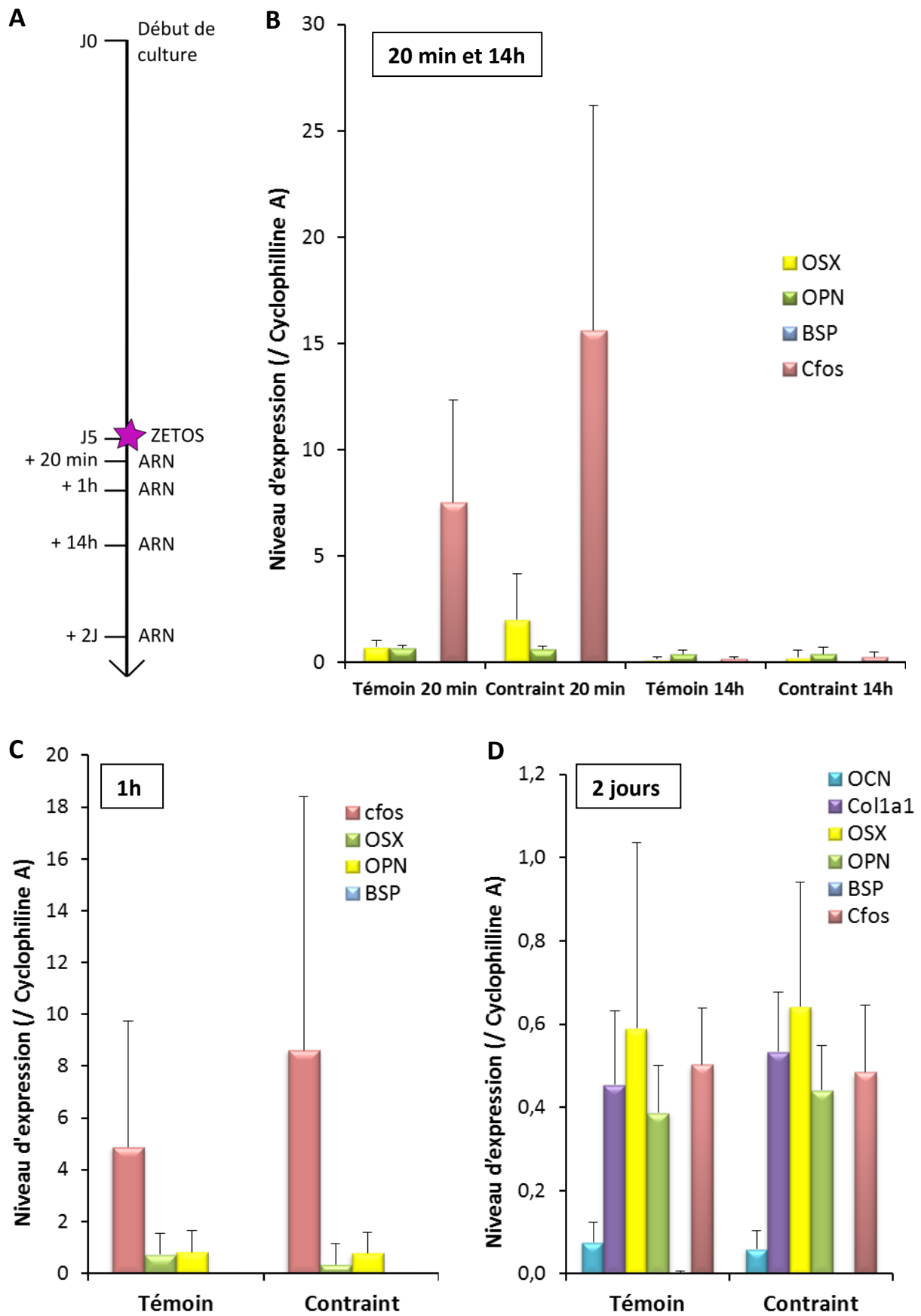


Figure 25 : Effet des contraintes mécanique (régime combiné pendant 15min) sur l'expression génique de cellules de calvaria, 20 min (B), 1h (C), 14h (B) ou 2 jours (D) après 15 min de stimulation mécanique à 5 jours de culture en 3D sous perfusion.

#### C.2.4. Conclusion

Nous avons étudié la réponse des cellules de souris sauvages à la contrainte mécanique dans un système de culture perfusé en 3D *in vitro* sur la base des travaux précédemment réalisés au laboratoire (thèses de Corinne Granet et Virginie Dumas).

Bien que la modélisation des contraintes mécaniques nous ait indiqué que le signal appliqué sur nos échantillons à l'aide du ZetOs™ était bien transmis au centre de celui-ci, c'est-à-dire où se situent les cellules, nous n'avons pas observé d'effet significatif de ce signal sur l'expression génique des cellules de calvaria cultivées dans les biocéramiques dans nos conditions expérimentales. Nous observons tout de même une tendance allant vers la surexpression de c-fos dans les échantillons contraints par rapport aux témoins, mais ces expériences nécessitent d'être répétées avec un nombre plus important d'échantillons. D'autre part, l'absence de régulation de l'expression des protéines de la matrice ou des marqueurs ostéoblastiques suite à la stimulation mécanique peut trouver diverses explications.

Tout d'abord, il n'est pas aberrant de ne pas retrouver les résultats de Virginie Dumas étant donné que les biomatériaux, les conditions de culture et même le type de cellules utilisés ne sont pas les mêmes. Ainsi, la cinétique d'expression de ces protéines peut être différente dans notre système comparé à celui utilisé dans l'étude de Virginie Dumas.

Il est également envisageable que les cellules de calvaria ne soient pas sensibles au signal précis auquel nous les avons soumis, ou qu'elles n'aient pas été soumises assez longtemps ou souvent à ce signal. En effet, de nombreux paramètres modulant la stimulation mécanique ont un potentiel ostéogénique comme la fréquence, l'amplitude, la durée ou encore le nombre de cycles (Kaspar *et al.* 2002, Tang *et al.* 2006, Scott *et al.* 2008). Par conséquent, la mise au point de la « combinaison » permettant d'optimiser l'ostéogénèse d'un système cellulaire donné peut se révéler complexe.

Enfin, notre protocole peut être une source de variabilité étant donné que chaque bioréacteur (chambre + tubulures) est débranché de la pompe péristaltique, transféré d'un incubateur à un autre, soumis à la stimulation mécanique avant d'être replacé dans l'incubateur de départ et rebranché à la pompe péristaltique. Toutes ces manipulations peuvent ainsi être une source de variabilité. En ce sens, le protocole ne peut être qu'amélioré.

Ainsi, des expériences complémentaires seront nécessaires avant de pouvoir étudier la réponse des cellules BSP-/- à la contrainte mécanique dans le bioréacteur que nous avons mis au point, et le temps nous a malheureusement manqué pour compléter cette partie de notre projet.

*4e Chapitre*    **Conclusions et perspectives  
générales**

---



L'objectif général de ma thèse était de mieux comprendre le rôle de la BSP dans la différenciation ostéoblastique et l'ostéogénèse *in vitro* à partir de cellules de calvaria de souris présentant une extinction génique de la BSP, cultivées dans un bioréacteur perfusé et soumis à des contraintes mécaniques. L'étude en bioréacteur avait pour but d'étudier ces paramètres dans un modèle en 3D, plus proche de l'environnement *in vivo* des cellules et surtout contrôlable.

Pour répondre à cet objectif, la première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier la BSP dans un système simple en 2D. Dans ces conditions, nous avons observé un nombre de CFU-F, CFU-PAL et CFU-OB réduit dans les cultures BSP-/- par rapport aux cellules sauvages. Les CFU-OB minéralisant peu ou pas du tout. Ceci suggère la présence parmi les MCC d'un plus faible nombre d'ostéoprogéniteurs, confirmé par leur plus faible taux de prolifération en début de culture par rapport aux sauvages. De façon intéressante, ces défauts sont observés à un stade de différenciation où la BSP n'est théoriquement pas exprimée. Cependant, l'absence de BSP affecte bien le phénotype à ce stade là. Dans des MCC repiquées à basse densité, les deux génotypes ne montrent aucune différence dans l'expression des marqueurs ostéoblastiques en début de culture. A partir de J14, quand les CFU-OB apparaissent, l'expression des marqueurs ostéoblastiques est fortement réduite chez les mutants. Au contraire, l'OPN et la Cathepsine B sont surexprimées suggérant l'implication de l'une au moins de ces protéines dans l'absence de minéralisation. A plus forte densité de repiquage, l'expression des marqueurs de différenciation augmente dans les MCC BSP-/-, qui montrent alors un début de minéralisation, reflétant la formation d'os hypominéralisé qui est observée *in vivo* au cours du développement des souris mutantes. Les MCC BSP-/- présentent donc un défaut de formation osseuse et de minéralisation dépendant de la densité cellulaire.

Il reste à éclaircir le ou les mécanismes expliquant ces observations. La BSP joue certainement un rôle à plusieurs niveaux. Nous avons commencé à exploiter la piste de l'OPN et de l'axe PHEX/FGF23. Comme nous l'avons vu, cette piste est en cours d'étude au laboratoire en bloquant la signalisation de FGF23.

La surexpression d'OPN et le défaut de minéralisation dans nos cultures peuvent être reliés aux travaux *in vivo* réalisés au laboratoire par Wafa Bouleftour. Ces travaux consistent à étudier le degré de spécificité et de redondance de la BSP et de l'OPN dans un modèle local (calvaria) de remodelage induit par la PTH et en bloquant l'expression de l'OPN à l'aide de siRNA (petits ARN interférents). Ces travaux montrent que l'expression à la fois de la BSP et de l'OPN est nécessaire pour l'effet anabolique de la PTH, au moins dans le modèle d'injection ectopique dans la calvaria (Bouleftour *et al.* en préparation). Les résultats suggèrent d'une part que l'OPN pourrait fonctionnellement compenser l'absence de la BSP en réponse à un défi hormonal. D'autre part, ils fournissent une preuve de la redondance de fonction entre ces deux protéines.

L'ablation médullaire chez les souris BSP-/- est suivie d'une recolonisation vasculaire et hématopoïétique beaucoup plus rapide que chez les souris sauvages, accompagnée d'une forte expression de l'OPN (Wade-Gueye *et al.* 2012), Granito *et al.* en préparation). Une fois encore, ces résultats suggèrent que la montée compensatoire d'OPN en absence de BSP pourrait être responsable d'une partie du phénotype observé chez les mutants. Ce travail nécessite d'être complété pour préciser la nature des interactions entre ces deux protéines, et ainsi de mieux comprendre le rôle de chaque SIBLING dans la formation osseuse et la minéralisation de la matrice. Dans ce but, le projet de double extinction des gènes de la BSP et de l'OPN (ANR Blanc Mouse-Kosto 2013) apportera sans aucun doute des réponses importantes.

Une autre piste exploitable est celle d'IGF1. En effet, le phénotype des souris KO pour la BSP, et en particulier le fait qu'elles soient plus petites, ressemble beaucoup au phénotype de souris KO pour IGF1, son récepteur, ou encore des protéines impliquées dans cette voie de signalisation. Il est bien connu (Tahimic *et al.* 2013) que l'activité de IGF1 est régulé par l'intégrine  $\alpha\beta3$  qui est le récepteur de la BSP. De plus, cette voie de signalisation est impliquée dans la réponse à la contrainte mécanique. En effet, la formation du complexe IGF1-R/intégrin  $\alpha\beta3$  est augmentée par la charge mécanique, ou encore diminué par la décharge, régulant ainsi la réponse à l'IGF1 (Long *et al.* 2011). Cette piste mérite donc d'être creusée et ce d'autant plus que les hypothèses que nous faisons concernant les mécanismes par lesquels la mutation affecte la différenciation pourraient être vérifiées dans le modèle de culture en 3D que nous avons développé. La phosphorylation des protéines en aval du récepteur IGF1 (FAK (« focal adhesion kinase »), AKT (protéine kinase B) ou encore ERK (« extracellular signal-regulated kinase »)) mériteraient tout particulièrement d'être étudiés.

La deuxième partie de mon travail a consisté à développer et valider un nouveau système de culture en 3D *in vitro*, dans le but d'améliorer le système pré-existant au laboratoire. Au final, nous avons pu démontrer que notre système de culture permet de contrôler la culture de cellules ostéoblastiques, jusqu'à l'obtention d'une matrice minéralisée dans un environnement tridimensionnel proche du milieu physiologique des cellules. Pour aboutir à cette preuve de concept, nous avons développé d'une part une biocéramique avec une architecture originale, parfaitement contrôlée, permettant d'améliorer les propriétés mécaniques et de perfusion de cette biocéramique et ainsi de réaliser des cultures reproductibles. D'autre part, nous avons développé un bioréacteur permettant de perfuser et stimuler mécaniquement la biocéramique, et par ce biais les cellules qu'elle contient. Les sollicitations mécaniques de compression, générées par le système Zetos™, sont transmises via un piston. Le système Zetos™ a l'avantage d'être modulable et de permettre par exemple la génération d'un régime imitant les caractéristiques d'une stimulation *in vivo*.

En théorie, la modélisation des contraintes mécaniques dans la biocéramique indique que la plupart des contraintes/déformations subies devraient s'exercer sur la partie poreuse centrale du biomatériau, donc au contact direct des cellules. De plus, ces

contraintes/déformations sont réparties de façon homogène dans cette zone. Cette homogénéité est certainement obtenue grâce à la partie dense de la biocéramique qui permet d'appliquer la stimulation mécanique sur une surface plane. L'architecture de la biocéramique permet à la fois à l'échantillon de résister à la stimulation grâce à cette partie dense mais aussi d'être sensiblement déformable grâce à la présence de fissures entre la zone dense et la zone poreuse (phénomène lié au frittage différentiel de ces deux parties).

En pratique, nos premiers résultats de stimulation mécanique des cellules de calvaria (sauvage) dans ce modèle n'ont montré aucun effet significatif d'un signal sinusoïdal combiné (25Hz + 3Hz) sur ces cellules.

Un premier commentaire est que nous n'avons peut-être pas utilisé le bon signal de stimulation. En effet, le système de culture que nous avons utilisé (*e.g.* type cellulaire, environnement de culture) est différent de celui déjà testé et validé au laboratoire sur ce même ZetOs™ (Dumas *et al.* 2009). De plus amples recherches sont donc nécessaires pour trouver le ou les signaux « efficaces » dans notre contexte expérimental.

Le problème majeur cependant est la grande variabilité de nos résultats. La source la plus importante de variabilité réside dans le système ZetOs™ lui-même. En effet, les tests mécaniques réalisés donnent des résultats erratiques et difficilement analysables. Parmi les nombreux problèmes techniques que nous avons recensés, il est apparu que le signal d'entrée n'est pas identique au signal de sortie. En effet, nous observons soit une absence totale de signal, soit une diminution des efforts maximaux appliqués au cours du temps sans suivre une enveloppe décroissante reproductible. La diminution de l'effort au cours du temps est d'autant plus faible que l'effort appliqué est élevé (200N). Cette observation peut refléter la « mauvaise » rugosité du matériau utilisé qu'il faudrait donc polir pour possiblement améliorer ce problème. Nous avons également remarqué que le premier effort donné à  $t=0$  par le ZetOs™ pouvait être très élevé (jusqu'à quelques centaines de newtons) alors que l'effort maximal programmé dans le logiciel était seulement de 25N, par exemple. Ceci explique que certains échantillons se soient cassés lors de tests mécaniques. Ce problème a été résolu en ajoutant un morceau de caoutchouc « para blond » (de 0,5mm d'épaisseur) entre le piston de la chambre et celui du ZetOs™. Il arrive aussi au ZetOs™ de ne plus fonctionner lorsque l'on réalise plusieurs stimulations à la suite et ce pour une raison totalement mystérieuse et donc incontrôlable. Il nous est donc apparu évident que sans amélioration notable (à définir par le fournisseur), ce système ZetOs™ n'est pas adapté à nos expériences.

La plate-forme de l'Equipex IVTV installée pour partie à la Faculté de Médecine de l'Université de St Etienne, s'est dotée d'un système de culture 3D sous perfusion ElectroForce 5270 de la société Bose (*Figure 26*). Ce système, bien plus fiable que le système ZetOs™, est au centre d'un nouveau projet au sein du laboratoire, et faisant suite à cette thèse. Il va consister à co-cultiver des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques dans une

biocéramique de phosphate de calcium avec une architecture différente de celle présentée dans ma thèse.

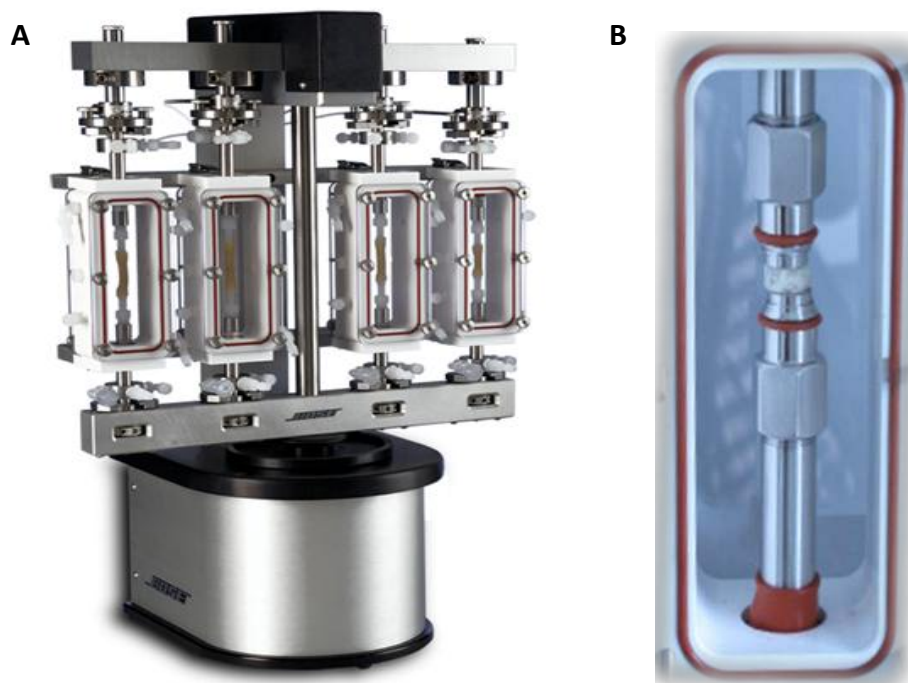


Figure 26. Système Bose ElectroForce 5270.  
(A) Vue générale de l'appareil. (B) Chambre de culture. (Clichés : Bose)

En effet, nous avons vu que cette dernière présentait des limitations pour réaliser des cultures à long terme ainsi que pour modéliser le flux dans les échantillons. Les nouvelles biocéramiques seront de forme cylindrique avec toujours une partie dense en périphérie qui forcera le flux dans des macro-canaux qui traverseront l'échantillon dans le sens de la perfusion et dans lesquels les cellules serontensemencées.

Cet échantillon sera ensuite placé dans le système Bose comme présenté dans la Figure 27.

Cette nouvelle architecture devrait permettre une culture plus homogène favorable à la différenciation cellulaire. Elle permettra également de modéliser plus facilement le flux et la répartition des forces de cisaillement dans les macropores. Cette étape de modélisation devrait faciliter l'optimisation des conditions de perfusion au sein de ce nouveau système (architecture, bioréacteur et système de perfusion différents) afin d'obtenir dans un premier temps une ostéogenèse puis dans un deuxième temps une résorption subséquente (par les ostéoclastes) de la matrice déposée par les ostéoblastes. Il sera par la suite intéressant d'étudier la réponse des cellules à différents types de perfusion modulant ainsi l'intensité et la fréquence des forces de cisaillement induites. Ce nouveau système 3D multi-cellulaire

permettra d'étudier les interactions entre les cellules et le remodelage osseux dans des conditions physiologiques et pathologiques.

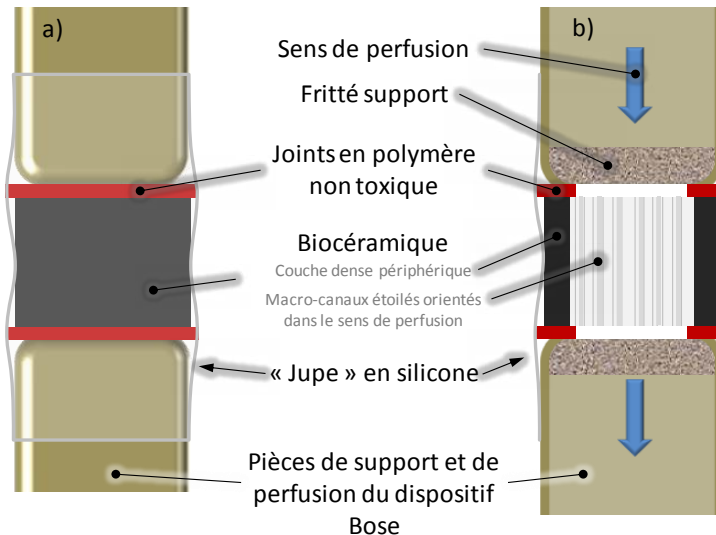


Figure 27. Perfusion des biocéramiques de forme cylindrique au sein du dispositif ElectroForce de Bose.

(a) vue générale, (b) vue en coupe.

Deux joints en polymère placés entre la biocéramique et les embouts de perfusion du système Bose permettent d'assurer l'étanchéité. Le tout est inséré dans une « jupe » en silicone. (Schéma : D. Marchat).

Nous avons montré que les cellules BSP-/- cultivées dans notre système de culture en 3D, se différenciaient en ostéoblastes, et nos premiers résultats obtenus en 3D semblent confirmer la surexpression génique de l'OPN par les cellules BSP-/- observées en 2D. Ces expériences restent à compléter afin de poursuivre l'étude de la BSP dans un environnement 3D. D'autant plus que, comme nous l'avons vu, la BSP est impliquée dans de nombreux processus et également dans la réparation osseuse (Malaval *et al.* 2009, Monfoulet *et al.* 2010) d'où l'utilité d'étudier cette protéine dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

Sur le long terme, les systèmes de culture en 3D devraient faciliter notre compréhension des phénomènes biologiques complexes, dans des modèles contrôlés et plus proche des conditions *in vivo*. De plus, ces modèles fournissent des outils pour tester de nouvelles substances chimiques ou des conditions environnementales (stimulations mécaniques) agissant sur la physiologie de l'os dans des études fondamentale ou pharmacologique par exemple. Ces approches permettent ainsi de limiter l'utilisation des modèles animaux, c'est-à-dire de s'affranchir des tâches administratives de plus en plus lourdes inhérentes aux nouvelles réglementations mais également de diminuer les coûts de ces études.

## RÉFÉRENCES

(Hors articles)

- Addison, W. N., F. Azari, E. S. Sorensen, M. T. Kaartinen and M. D. McKee (2007). "Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity." *J Biol Chem* **282**(21): 15872-15883.
- Addison, W. N., D. L. Masica, J. J. Gray and M. D. McKee (2010). "Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage." *J Bone Miner Res* **25**(4): 695-705.
- Addison, W. N., Y. Nakano, T. Loisel, P. Crine and M. D. McKee (2008). "MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM." *J Bone Miner Res* **23**(10): 1638-1649.
- Andersen, T. L., M. E. Abdelgawad, H. B. Kristensen, E. M. Hauge, L. Rolighed, J. Bollerslev, P. Kjaersgaard-Andersen and J. M. Delaisse (2013). "Understanding Coupling between Bone Resorption and Formation: Are Reversal Cells the Missing Link?" *Am J Pathol* **183**(1): 235-246.
- Anderson, H. C. (1995). "Molecular biology of matrix vesicles." *Clin Orthop Relat Res*(314): 266-280.
- Anderson, H. C. (2003). "Matrix vesicles and calcification." *Curr Rheumatol Rep* **5**(3): 222-226.
- Argiro, L., M. Desbarats, F. H. Glorieux and B. Ecarot (2001). "Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone." *Genomics* **74**(3): 342-351.
- Atkins, G. J., P. S. Rowe, H. P. Lim, K. J. Welldon, R. Ormsby, A. R. Wijenayaka, L. Zelenchuk, A. Evdokiou and D. M. Findlay (2011). "Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism." *J Bone Miner Res* **26**(7): 1425-1436.
- Aubin, J. E., F. Liu, L. Malaval and A. K. Gupta (1995). "Osteoblast and chondroblast differentiation." *Bone* **17**(2 Suppl): 77S-83S.
- Autefage, A. (2000). "The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture." *Injury* **31 Suppl 3**: C50-55.
- Baht, G. S., G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2008). "Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation." *Matrix Biol* **27**(7): 600-608.
- Barros, N. M., B. Hoac, R. L. Neves, W. N. Addison, D. M. Assis, M. Murshed, A. K. Carmona and M. D. McKee (2012). "Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia." *J Bone Miner Res* **28**(3): 688-699.
- Bellahcene, A., V. Albert, L. Pollina, F. Basolo, L. W. Fisher and V. Castronovo (1998). "Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer." *Thyroid* **8**(8): 637-641.
- Bellahcene, A., K. Bonjean, B. Fohr, N. S. Fedarko, F. A. Robey, M. F. Young, L. W. Fisher and V. Castronovo (2000). "Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis." *Circ Res* **86**(8): 885-891.
- Bellahcene, A., V. Castronovo, K. U. Ogbureke, L. W. Fisher and N. S. Fedarko (2008). "Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(3): 212-226.

- Bellahcene, A., N. Maloujahmoum, L. W. Fisher, H. Pastorino, E. Tagliabue, S. Menard and V. Castronovo (1997). "Expression of bone sialoprotein in human lung cancer." *Calcif Tissue Int* **61**(3): 183-188.
- Bellahcene, A., M. P. Merville and V. Castronovo (1994). "Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer." *Cancer Res* **54**(11): 2823-2826.
- Bianco, P., L. W. Fisher, M. F. Young, J. D. Termine and P. G. Robey (1991). "Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues." *Calcif Tissue Int* **49**(6): 421-426.
- Bianco, P., M. Riminucci, G. Silvestrini, E. Bonucci, J. D. Termine, L. W. Fisher and P. G. Robey (1993). "Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix." *J Histochem Cytochem* **41**(2): 193-203.
- Blair, H. C., M. Zaidi and P. H. Schlesinger (2002). "Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation." *Biochem J* **364**(Pt 2): 329-341.
- Boskey, A. L. (1989). "Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization." *Bone Miner* **6**(2): 111-123.
- Boskey, A. L. (1992). "Mineral-matrix interactions in bone and cartilage." *Clin Orthop Relat Res*(281): 244-274.
- Boskey, A. L., B. Christensen, H. Taleb and E. S. Sorensen (2012). "Post-translational modification of osteopontin: effects on in vitro hydroxyapatite formation and growth." *Biochem Biophys Res Commun* **419**(2): 333-338.
- Boskey, A. L., M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler and C. W. Prince (1993). "Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel." *Bone Miner* **22**(2): 147-159.
- Boskey, A. L., L. Spevak, E. Paschalis, S. B. Doty and M. D. McKee (2002). "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone." *Calcif Tissue Int* **71**(2): 145-154.
- Boudiffa, M., N. M. Wade-Gueye, A. Guignandon, A. Vanden-Bossche, O. Sabido, J. E. Aubin, P. Jurdic, L. Vico, M. H. Lafage-Proust and L. Malaval (2010). "Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro." *J Bone Miner Res* **25**(12): 2393-2403.
- Boyan, B. D., Z. Schwartz and L. D. Swain (1990). "Matrix vesicles as a marker of endochondral ossification." *Connect Tissue Res* **24**(1): 67-75.
- Boyden, L. M., J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M. A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna and R. P. Lifton (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." *N Engl J Med* **346**(20): 1513-1521.
- Burger, E. H., J. Klein-Nulend and T. H. Smit (2003). "Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal." *J Biomech* **36**(10): 1453-1459.
- Canalis, E. (2005). "Mechanisms of glucocorticoid action in bone." *Curr Osteoporos Rep* **3**(3): 98-102.
- Canalis, E., A. Giustina and J. P. Bilezikian (2007). "Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis." *N Engl J Med* **357**(9): 905-916.
- Carvalho, R. S., A. Bumann, J. L. Schaffer and L. C. Gerstenfeld (2002). "Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation." *J Cell Biochem* **84**(3): 497-508.
- Castellano, G., G. Malaponte, M. C. Mazzarino, M. Figini, F. Marchese, P. Gangemi, S. Travali, F. Stivala, S. Canevari and M. Libra (2008). "Activation of the osteopontin/matrix

- metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression." *Clin Cancer Res* **14**(22): 7470-7480.
- Chellaiah, M. A., R. S. Biswas, S. R. Rittling, D. T. Denhardt and K. A. Hruska (2003). "Rho-dependent Rho kinase activation increases CD44 surface expression and bone resorption in osteoclasts." *J Biol Chem* **278**(31): 29086-29097.
- Chen, J., C. A. McCulloch and J. Sodek (1993). "Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin." *Arch Oral Biol* **38**(3): 241-249.
- Chen, J., M. D. McKee, A. Nanci and J. Sodek (1994). "Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin." *Histochem J* **26**(1): 67-78.
- Chen, J., H. S. Shapiro and J. Sodek (1992). "Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues." *J Bone Miner Res* **7**(8): 987-997.
- Chen, J., Q. Zhang, C. A. McCulloch and J. Sodek (1991). "Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin)." *Histochem J* **23**(6): 281-289.
- Chen, Y. J., Y. Y. Wei, H. T. Chen, Y. C. Fong, C. J. Hsu, C. H. Tsai, H. C. Hsu, S. H. Liu and C. H. Tang (2009). "Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells." *J Cell Physiol* **221**(1): 98-108.
- Cooper, L. F., P. K. Yliheikkila, D. A. Felton and S. W. Whitson (1998). "Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation." *J Bone Miner Res* **13**(4): 620-632.
- Cukierman, E., R. Pankov, D. R. Stevens and K. M. Yamada (2001). "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension." *Science* **294**(5547): 1708-1712.
- Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." *Ann N Y Acad Sci* **1192**: 437-443.
- David, V., A. Guignandon, A. Martin, L. Malaval, M. H. Lafage-Proust, A. Rattner, V. Mann, B. Noble, D. B. Jones and L. Vico (2008). "Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain." *Tissue Eng Part A* **14**(1): 117-126.
- David, V., A. Martin, A. M. Hedge and P. S. Rowe (2009). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a new bone renal hormone and vascularization modulator." *Endocrinology* **150**(9): 4012-4023.
- David, V. and L. D. Quarles (2010). "ASARM mineralization hypothesis: a bridge too far?" *J Bone Miner Res* **25**(4): 692-694.
- Demiralp, B., H. L. Chen, A. J. Koh, E. T. Keller and L. K. McCauley (2002). "Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos." *Endocrinology* **143**(10): 4038-4047.
- Denhardt, D. T. and X. Guo (1993). "Osteopontin: a protein with diverse functions." *Faseb J* **7**(15): 1475-1482.
- Dobbie, H., R. J. Unwin, N. J. Faria and D. G. Shirley (2008). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein causes phosphaturia in rats by inhibiting tubular phosphate reabsorption." *Nephrol Dial Transplant* **23**(2): 730-733.



- Dobnig, H. and R. T. Turner (1995). "Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells." *Endocrinology* **136**(8): 3632-3638.
- Dodds, R. A., J. R. Connor, I. E. James, E. L. Rykaczewski, E. Appelbaum, E. Dul and M. Gowen (1995). "Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone." *J Bone Miner Res* **10**(11): 1666-1680.
- Domon, S., H. Shimokawa, S. Yamaguchi and K. Soma (2001). "Temporal and spatial mRNA expression of bone sialoprotein and type I collagen during rodent tooth movement." *Eur J Orthod* **23**(4): 339-348.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall and G. Karsenty (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." *Cell* **89**(5): 747-754.
- Dufour, C., X. Holy and P. J. Marie (2007). "Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets alpha5beta1-PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone." *Exp Cell Res* **313**(2): 394-403.
- Dumas, V., A. Perrier, L. Malaval, N. Laroche, A. Guignandon, L. Vico and A. Rattner (2009). "The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression." *Biomaterials* **30**(19): 3279-3288.
- Ehrlich, P. J., B. S. Noble, H. L. Jessop, H. Y. Stevens, J. R. Mosley and L. E. Lanyon (2002). "The effect of in vivo mechanical loading on estrogen receptor alpha expression in rat ulnar osteocytes." *J Bone Miner Res* **17**(9): 1646-1655.
- Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard and G. Andersson (1994). "Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro." *J Biol Chem* **269**(21): 14853-14856.
- el Haj, A. J., S. L. Minter, S. C. Rawlinson, R. Suswillo and L. E. Lanyon (1990). "Cellular responses to mechanical loading in vitro." *J Bone Miner Res* **5**(9): 923-932.
- Farrow, E. G., S. I. Davis, L. M. Ward, L. J. Summers, J. S. Bubbear, R. Keen, T. C. Stamp, L. R. Baker, L. F. Bonewald and K. E. White (2009). "Molecular analysis of DMP1 mutants causing autosomal recessive hypophosphatemic rickets." *Bone* **44**(2): 287-294.
- Fedarko, N. S., B. Fohr, P. G. Robey, M. F. Young and L. W. Fisher (2000). "Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack." *J Biol Chem* **275**(22): 16666-16672.
- Fedarko, N. S., A. Jain, A. Karadag and L. W. Fisher (2004). "Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases." *Faseb J* **18**(6): 734-736.
- Fen, J. Q., J. Zhang, S. L. Dallas, Y. Lu, S. Chen, X. Tan, M. Owen, S. E. Harris and M. MacDougall (2002). "Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene." *J Bone Miner Res* **17**(10): 1822-1831.
- Feng, J. Q., H. Huang, Y. Lu, L. Ye, Y. Xie, T. W. Tsutsui, T. Kunieda, T. Castranio, G. Scott, L. B. Bonewald and Y. Mishina (2003). "The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development." *J Dent Res* **82**(10): 776-780.
- Feng, J. Q., L. M. Ward, S. Liu, Y. Lu, Y. Xie, B. Yuan, X. Yu, F. Rauch, S. I. Davis, S. Zhang, H. Rios, M. K. Drezner, L. D. Quarles, L. F. Bonewald and K. E. White (2006). "Loss of DMP1

- causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." *Nat Genet* **38**(11): 1310-1315.
- Fisher, L. W. and N. S. Fedarko (2003). "Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 33-40.
- Fisher, L. W., G. R. Hawkins, N. Tuross and J. D. Termine (1987). "Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone." *J Biol Chem* **262**(20): 9702-9708.
- Fisher, L. W., O. W. McBride, J. D. Termine and M. F. Young (1990). "Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization." *J Biol Chem* **265**(4): 2347-2351.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, B. Fohr, M. F. Young and N. S. Fedarko (2001). "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(2): 460-465.
- Fisher, L. W., S. W. Whitson, L. V. Avioli and J. D. Termine (1983). "Matrix sialoprotein of developing bone." *J Biol Chem* **258**(20): 12723-12727.
- Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall and P. E. Witten (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." *Dev Dyn* **235**(1): 176-190.
- Fritton, S. P., K. J. McLeod and C. T. Rubin (2000). "Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains." *J Biomech* **33**(3): 317-325.
- Fromigue, O., P. J. Marie and A. Lomri (1997). "Differential effects of transforming growth factor beta2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells." *Cytokine* **9**(8): 613-623.
- Frost, H. M. (1990). "Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem." *Anat Rec* **226**(4): 414-422.
- Fujisawa, R. and Y. Kuboki (1992). "Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils." *Calcif Tissue Int* **51**(6): 438-442.
- Fujisawa, R., Y. Nodasaka and Y. Kuboki (1995). "Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen." *Calcif Tissue Int* **56**(2): 140-144.
- Fukamoto, S. and T. J. Martin (2009). "Bone as an endocrine organ." *Trends Endocrinol Metab* **20**(5): 230-236.
- Furger, K. A., A. L. Allan, S. M. Wilson, C. Hota, S. A. Vantghem, C. O. Postenka, W. Al-Katib, A. F. Chambers and A. B. Tuck (2003). "Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin." *Mol Cancer Res* **1**(11): 810-819.
- Ganss, B., R. H. Kim and J. Sodek (1999). "Bone sialoprotein." *Crit Rev Oral Biol Med* **10**(1): 79-98.
- George, A., B. Sabsay, P. A. Simonian and A. Veis (1993). "Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization." *J Biol Chem* **268**(17): 12624-12630.
- Gericke, A., C. Qin, Y. Sun, R. Redfern, D. Redfern, Y. Fujimoto, H. Taleb, W. T. Butler and A. L. Boskey (2010). "Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization." *J Dent Res* **89**(4): 355-359.
- Glimcher, M. J. (1987). "The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification." *Instr Course Lect* **36**: 49-69.

- Glimcher, M. J. (2006). "Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation." *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **64**: 223-282.
- Globus, R. K., S. B. Doty, J. C. Lull, E. Holmuhamedov, M. J. Humphries and C. H. Damsky (1998). "Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts." *J Cell Sci* **111 ( Pt 10)**: 1385-1393.
- Gluhak-Heinrich, J., D. Pavlin, W. Yang, M. MacDougall and S. E. Harris (2007). "MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement." *Arch Oral Biol* **52(7)**: 684-690.
- Gluhak-Heinrich, J., L. Ye, L. F. Bonewald, J. Q. Feng, M. MacDougall, S. E. Harris and D. Pavlin (2003). "Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo." *J Bone Miner Res* **18(5)**: 807-817.
- Goldberg, H. A., K. J. Warner, M. C. Li and G. K. Hunter (2001). "Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite." *Connect Tissue Res* **42(1)**: 25-37.
- Gong, Y., R. B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A. M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F. H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W. N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J. A. Batch, P. Beighton, G. C. Black, R. G. Boles, L. M. Boon, C. Borrone, H. G. Brunner, G. F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M. L. Halhidi, B. Hall, R. C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Juppner, C. A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T. Letteboer, L. Peltonen, R. S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M. J. van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B. R. Olsen and M. L. Warman (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." *Cell* **107(4)**: 513-523.
- Gordon, J. A., J. Sodek, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2009). "Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: role in migration and survival of breast and prostate cancer cells." *J Cell Biochem* **107(6)**: 1118-1128.
- Gordon, J. A., C. E. Tye, A. V. Sampaio, T. M. Underhill, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." *Bone* **41(3)**: 462-473.
- Gowen, L. C., D. N. Petersen, A. L. Mansolf, H. Qi, J. L. Stock, G. T. Tkalcevic, H. A. Simmons, D. T. Crawford, K. L. Chidsey-Frink, H. Z. Ke, J. D. McNeish and T. A. Brown (2003). "Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass." *J Biol Chem* **278(3)**: 1998-2007.
- Granet, C., A. G. Vico, C. Alexandre and M. H. Lafage-Proust (2002). "MAP and src kinases control the induction of AP-1 members in response to changes in mechanical environment in osteoblastic cells." *Cell Signal* **14(8)**: 679-688.
- Grigoriadis, A. E., Z. Q. Wang, M. G. Cecchini, W. Hofstetter, R. Felix, H. A. Fleisch and E. F. Wagner (1994). "c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling." *Science* **266(5184)**: 443-448.
- Guo, R., P. S. Rowe, S. Liu, L. G. Simpson, Z. S. Xiao and L. D. Quarles (2002). "Inhibition of MEPE cleavage by Phex." *Biochem Biophys Res Commun* **297(1)**: 38-45.
- Hakim, F. T., R. Cranley, K. S. Brown, E. D. Eanes, L. Harne and J. J. Oppenheim (1984). "Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of

- calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy." *Arthritis Rheum* **27**(12): 1411-1420.
- Hansma, P. K., G. E. Fantner, J. H. Kindt, P. J. Thurner, G. Schitter, P. J. Turner, S. F. Udwin and M. M. Finch (2005). "Sacrificial bonds in the interfibrillar matrix of bone." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **5**(4): 313-315.
- Harada, S., S. B. Rodan and G. A. Rodan (1995). "Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts." *Clin Orthop Relat Res*(313): 76-80.
- Harmey, D., K. A. Johnson, J. Zelken, N. P. Camacho, M. F. Hoylaerts, M. Noda, R. Terkeltaub and J. L. Millan (2006). "Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2(-/-)* mice." *J Bone Miner Res* **21**(9): 1377-1386.
- Harris, N. L., K. R. Rattray, C. E. Tye, T. M. Underhill, M. J. Somerman, J. A. D'Errico, A. F. Chambers, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2000). "Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis." *Bone* **27**(6): 795-802.
- Harris, S. E., J. Gluhak-Heinrich, M. A. Harris, W. Yang, L. F. Bonewald, D. Riha, P. S. Rowe, A. G. Robling, C. H. Turner, J. Q. Feng, M. D. McKee and D. Nicollela (2007). "DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **7**(4): 313-315.
- Hauge, E. M., D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde and F. Melsen (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers." *J Bone Miner Res* **16**(9): 1575-1582.
- He, G., T. Dahl, A. Veis and A. George (2003). "Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 240-245.
- Herring, S. W. (1972). "Sutures--a tool in functional cranial analysis." *Acta Anat (Basel)* **83**(2): 222-247.
- Hessle, L., K. A. Johnson, H. C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. W. Goding, R. Terkeltaub and J. L. Millan (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9445-9449.
- Ho, A. M., M. D. Johnson and D. M. Kingsley (2000). "Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis." *Science* **289**(5477): 265-270.
- Horton, M. A. (1995). "Interactions of connective tissue cells with the extracellular matrix." *Bone* **17**(2 Suppl): 51S-53S.
- Houston, B., I. R. Paton, D. W. Burt and C. Farquharson (2002). "Chromosomal localization of the chicken and mammalian orthologues of the orphan phosphatase *PHOSPHO1* gene." *Anim Genet* **33**(6): 451-454.
- Huang, B., I. Maciejewska, Y. Sun, T. Peng, D. Qin, Y. Lu, L. Bonewald, W. T. Butler, J. Feng and C. Qin (2008). "Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone." *Calcif Tissue Int* **82**(5): 401-410.
- Huang, L., X. Y. Teng, Y. Y. Cheng, K. M. Lee and S. M. Kumta (2004). "Expression of preosteoblast markers and *Cbfa-1* and *Osterix* gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone." *Bone* **34**(3): 393-401.
- Huang, W., B. Carlsen, G. Rudkin, M. Berry, K. Ishida, D. T. Yamaguchi and T. A. Miller (2004). "Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells." *Bone* **34**(5): 799-808.

- Huesa, C., M. C. Yadav, M. A. Finnila, S. R. Goodyear, S. P. Robins, K. E. Tanner, R. M. Aspden, J. L. Millan and C. Farquharson (2011). "PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures." *Bone* **48**(5): 1066-1074.
- Huffman, N. T., J. A. Keightley, C. Chaoying, R. J. Midura, D. Lovitch, P. A. Veno, S. L. Dallas and J. P. Gorski (2007). "Association of specific proteolytic processing of bone sialoprotein and bone acidic glycoprotein-75 with mineralization within biomineralization foci." *J Biol Chem* **282**(36): 26002-26013.
- Hultenby, K., F. P. Reinholt, A. Oldberg and D. Heinegard (1991). "Ultrastructural immunolocalization of osteopontin in metaphyseal and cortical bone." *Matrix* **11**(3): 206-213.
- Hunter, G. K. and H. A. Goldberg (1993). "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8562-8565.
- Hunter, G. K., P. V. Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg and H. A. Goldberg (1996). "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins." *Biochem J* **317** ( Pt 1): 59-64.
- Hunter, G. K., C. L. Kyle and H. A. Goldberg (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.
- Hunter, G. K., K. S. Wong and J. J. Kim (1988). "Binding of calcium to glycosaminoglycans: an equilibrium dialysis study." *Arch Biochem Biophys* **260**(1): 161-167.
- Huq, N. L., K. J. Cross, M. Ung and E. C. Reynolds (2005). "A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4." *Arch Oral Biol* **50**(7): 599-609.
- Hwang, Q., S. Cheifetz, C. M. Overall, C. A. McCulloch and J. Sodek (2009). "Bone sialoprotein does not interact with pro-gelatinase A (MMP-2) or mediate MMP-2 activation." *BMC Cancer* **9**: 121.
- Ibaraki, K., J. D. Termine, S. W. Whitson and M. F. Young (1992). "Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts." *J Bone Miner Res* **7**(7): 743-754.
- Ichida, F., R. Nishimura, K. Hata, T. Matsubara, F. Ikeda, K. Hisada, H. Yatani, X. Cao, T. Komori, A. Yamaguchi and T. Yoneda (2004). "Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **279**(32): 34015-34022.
- Ingram, R. T., B. L. Clarke, L. W. Fisher and L. A. Fitzpatrick (1993). "Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity." *J Bone Miner Res* **8**(9): 1019-1029.
- Inoue, K., Y. Mikuni-Takagaki, K. Oikawa, T. Itoh, M. Inada, T. Noguchi, J. S. Park, T. Onodera, S. M. Krane, M. Noda and S. Itohara (2006). "A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism." *J Biol Chem* **281**(44): 33814-33824.
- Ishijima, M., S. R. Rittling, T. Yamashita, K. Tsuji, H. Kurosawa, A. Nifuji, D. T. Denhardt and M. Noda (2001). "Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin." *J Exp Med* **193**(3): 399-404.
- Ishijima, M., K. Tsuji, S. R. Rittling, T. Yamashita, H. Kurosawa, D. T. Denhardt, A. Nifuji and M. Noda (2002). "Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice." *J Bone Miner Res* **17**(4): 661-667.

- Jones, D. B., E. Broeckmann, T. Pohl and E. L. Smith (2003). "Development of a mechanical testing and loading system for trabecular bone studies for long term culture." *Eur Cell Mater* **5**: 48-59; discussion 59-60.
- Jono, S., C. Peinado and C. M. Giachelli (2000). "Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification." *J Biol Chem* **275**(26): 20197-20203.
- Judex, S., S. Boyd, Y. X. Qin, S. Turner, K. Ye, R. Muller and C. Rubin (2003). "Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load." *Ann Biomed Eng* **31**(1): 12-20.
- Karadag, A. and L. W. Fisher (2006). "Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin." *J Bone Miner Res* **21**(10): 1627-1636.
- Karadag, A., K. U. Ogbureke, N. S. Fedarko and L. W. Fisher (2004). "Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion." *J Natl Cancer Inst* **96**(12): 956-965.
- Kartsogiannis, V. and K. W. Ng (2004). "Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology." *Mol Cell Endocrinol* **228**(1-2): 79-102.
- Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Beck, L. Claes and A. Ignatius (2002). "Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain." *J Biomech* **35**(7): 873-880.
- Kasugai, S., T. Nagata and J. Sodek (1992). "Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro." *J Cell Physiol* **152**(3): 467-477.
- Kawasaki, K., A. V. Buchanan and K. M. Weiss (2007). "Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization." *Cells Tissues Organs* **186**(1): 7-24.
- Kawasaki, K., T. Suzuki and K. M. Weiss (2004). "Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11356-11361.
- Kawasaki, K. and K. M. Weiss (2006). "Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **306**(3): 295-316.
- Kemoun, P., S. Laurencin-Dalicieux, J. Rue, F. Vaysse, A. Romeas, H. Arzate, F. Conte-Auriol, J. C. Farges, J. P. Salles and G. Brunel (2007). "Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium." *Tissue Cell* **39**(4): 257-266.
- King, K. B., C. F. Opel and D. M. Rempel (2005). "Cyclical articular joint loading leads to cartilage thinning and osteopontin production in a novel in vivo rabbit model of repetitive finger flexion." *Osteoarthritis Cartilage* **13**(11): 971-978.
- Klein-Nulend, J., J. Roelofsens, C. M. Semeins, A. L. Bronckers and E. H. Burger (1997). "Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures." *J Cell Physiol* **170**(2): 174-181.
- Kojima, H., T. Uede and T. Uemura (2004). "In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector." *J Biochem* **136**(3): 377-386.
- Komori, T. (2010). "Regulation of osteoblast differentiation by Runx2." *Adv Exp Med Biol* **658**: 43-49.
- Komori, T. and T. Kishimoto (1998). "Cbfa1 in bone development." *Curr Opin Genet Dev* **8**(4): 494-499.

- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki and T. Kishimoto (1997). "Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." *Cell* **89**(5): 755-764.
- Kousteni, S., M. Almeida, L. Han, T. Bellido, R. L. Jilka and S. C. Manolagas (2007). "Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor." *Mol Cell Biol* **27**(4): 1516-1530.
- Krishnan, V., H. U. Bryant and O. A. Macdougald (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *J Clin Invest* **116**(5): 1202-1209.
- Kulkarni, R. N., A. D. Bakker, V. Everts and J. Klein-Nulend (2010). "Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE." *Calcif Tissue Int* **87**(5): 461-468.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* **93**(2): 165-176.
- Landis, W. J., R. Jacquet, J. Hillyer and J. Zhang (2003). "Analysis of osteopontin in mouse growth plate cartilage by application of laser capture microdissection and RT-PCR." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 28-32.
- Lean, J. M., A. G. Mackay, J. W. Chow and T. J. Chambers (1996). "Osteocytic expression of mRNA for *c-fos* and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus." *Am J Physiol* **270**(6 Pt 1): E937-945.
- Lee, N. K., H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J. D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P. J. Mee, M. D. McKee, D. Y. Jung, Z. Zhang, J. K. Kim, F. Mauvais-Jarvis, P. Ducy and G. Karsenty (2007). "Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton." *Cell* **130**(3): 456-469.
- Legros, R., N. Balmain and G. Bonel (1987). "Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone." *Calcif Tissue Int* **41**(3): 137-144.
- Liaw, L., V. Lindner, S. M. Schwartz, A. F. Chambers and C. M. Giachelli (1995). "Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro." *Circ Res* **77**(4): 665-672.
- Ling, Y., H. F. Rios, E. R. Myers, Y. Lu, J. Q. Feng and A. L. Boskey (2005). "DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis." *J Bone Miner Res* **20**(12): 2169-2177.
- Liu, F., L. Malaval and J. E. Aubin (2003). "Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation." *J Cell Sci* **116**(Pt 9): 1787-1796.
- Liu, S., T. A. Brown, J. Zhou, Z. S. Xiao, H. Awad, F. Guilak and L. D. Quarles (2005). "Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia." *J Am Soc Nephrol* **16**(6): 1645-1653.
- Liu, S., P. S. Rowe, L. Vierthaler, J. Zhou and L. D. Quarles (2007). "Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity." *J Endocrinol* **192**(1): 261-267.

- Liu, S., J. Zhou, W. Tang, X. Jiang, D. W. Rowe and L. D. Quarles (2006). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(1): E38-49.
- Long, R. K., S. Nishida, T. Kubota, Y. Wang, T. Sakata, H. Z. Elalieh, B. P. Halloran and D. D. Bikle (2011). "Skeletal unloading-induced insulin-like growth factor 1 (IGF-1) nonresponsiveness is not shared by platelet-derived growth factor: the selective role of integrins in IGF-1 signaling." *J Bone Miner Res* **26**(12): 2948-2958.
- Lorenz-Depiereux, B., M. Bastepe, A. Benet-Pages, M. Amyere, J. Wagenstaller, U. Muller-Barth, K. Badenhop, S. M. Kaiser, R. S. Rittmaster, A. H. Shlossberg, J. L. Olivares, C. Loris, F. J. Ramos, F. Glorieux, M. Vikkula, H. Juppner and T. M. Strom (2006). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nat Genet* **38**(11): 1248-1250.
- Lu, Y., B. Yuan, C. Qin, Z. Cao, Y. Xie, S. L. Dallas, M. D. McKee, M. K. Drezner, L. F. Bonewald and J. Q. Feng (2011). "The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment." *J Bone Miner Res* **26**(2): 331-340.
- MacDougall, M., T. T. Gu, X. Luan, D. Simmons and J. Chen (1998). "Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues." *J Bone Miner Res* **13**(3): 422-431.
- MacDougall, M., D. Simmons, T. T. Gu and J. Dong (2002). "MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21." *Connect Tissue Res* **43**(2-3): 320-330.
- Maciejewska, I., D. Qin, B. Huang, Y. Sun, G. Mues, K. Svoboda, L. Bonewald, W. T. Butler, J. Q. Feng and C. Qin (2009). "Distinct compartmentalization of dentin matrix protein 1 fragments in mineralized tissues and cells." *Cells Tissues Organs* **189**(1-4): 186-191.
- Macrae, V. E., M. G. Davey, L. McTeir, S. Narisawa, M. C. Yadav, J. L. Millan and C. Farquharson (2010). "Inhibition of PHOSPHO1 activity results in impaired skeletal mineralization during limb development of the chick." *Bone* **46**(4): 1146-1155.
- Majeska, R. J. and R. E. Wuthier (1975). "Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase." *Biochim Biophys Acta* **391**(1): 51-60.
- Malaval, L., F. Liu, P. Roche and J. E. Aubin (1999). "Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro." *J Cell Biochem* **74**(4): 616-627.
- Malaval, L., N. M. Wade-Gueye, M. Boudiffa, J. Fei, R. Zirngibl, F. Chen, N. Laroche, J. P. Roux, B. Burt-Pichat, F. Duboeuf, G. Boivin, P. Jurdic, M. H. Lafage-Proust, J. Amedee, L. Vico, J. Rossant and J. E. Aubin (2008). "Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis." *J Exp Med* **205**(5): 1145-1153.
- Malaval, L., L. Monfoulet, T. Fabre, L. Pothuaud, R. Bareille, S. Miraux, E. Thiaudiere, G. Raffard, J. M. Franconi, M. H. Lafage-Proust, J. E. Aubin, L. Vico and J. Amedee (2009). "Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone." *Bone* **45**(5): 853-861.
- Manolagas, S. C. (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis." *Endocr Rev* **21**(2): 115-137.
- Marie, P. (2001). "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste." *médecine / sciences* **17**(12): 1252-1259.
- Marie, P. J. (2008). "Transcription factors controlling osteoblastogenesis." *Arch Biochem Biophys* **473**(2): 98-105.



- Marks, J., L. J. Churchill, E. S. Debnam and R. J. Unwin (2008). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate transport." *J Am Soc Nephrol* **19**(12): 2313-2320.
- Martin, A., V. David, J. S. Laurence, P. M. Schwarz, E. M. Lafer, A. M. Hedge and P. S. Rowe (2008). "Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP." *Endocrinology* **149**(4): 1757-1772.
- Martin, A., S. Liu, V. David, H. Li, A. Karydis, J. Q. Feng and L. D. Quarles (2011). "Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling." *Faseb J* **25**(8): 2551-2562.
- Matsui, Y., N. Iwasaki, S. Kon, D. Takahashi, J. Morimoto, Y. Matsui, D. T. Denhardt, S. Rittling, A. Minami and T. Uede (2009). "Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice." *Arthritis Rheum* **60**(8): 2362-2371.
- Matsuo, K. (2009). "Cross-talk among bone cells." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**(4): 292-297.
- Mbalaviele, G., C. S. Shin and R. Civitelli (2006). "Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment." *J Bone Miner Res* **21**(12): 1821-1827.
- McHugh, K. P., K. Hodivala-Dilke, M. H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, X. Feng, F. P. Ross, R. O. Hynes and S. L. Teitelbaum (2000). "Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts." *J Clin Invest* **105**(4): 433-440.
- McKee, M. D., M. C. Farach-Carson, W. T. Butler, P. V. Hauschka and A. Nanci (1993). "Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HS-glycoprotein) proteins in rat bone." *J Bone Miner Res* **8**(4): 485-496.
- McKee, M. D. and A. Nanci (1995). "Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein." *Ann N Y Acad Sci* **760**: 177-189.
- Meyer, J. L. and H. Fleisch (1984). "Determination of calcium phosphate inhibitor activity. Critical assessment of the methodology." *Miner Electrolyte Metab* **10**(4): 249-258.
- Midura, R. J., A. Wang, D. Lovitch, D. Law, K. Powell and J. P. Gorski (2004). "Bone acidic glycoprotein-75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and apatite nucleation in osteoblastic cultures." *J Biol Chem* **279**(24): 25464-25473.
- Mikuni-Takagaki, Y., Y. Suzuki, T. Kawase and S. Saito (1996). "Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress." *Endocrinology* **137**(5): 2028-2035.
- Milgrom, C., A. Finestone, A. Simkin, I. Ekenman, S. Mendelson, M. Millgram, M. Nyska, E. Larsson and D. Burr (2000). "In-vivo strain measurements to evaluate the strengthening potential of exercises on the tibial bone." *J Bone Joint Surg Br* **82**(4): 591-594.
- Mitsui, N., N. Suzuki, M. Maeno, K. Mayahara, M. Yanagisawa, K. Otsuka and N. Shimizu (2005). "Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E(2) production appropriately." *Life Sci* **77**(25): 3168-3182.

- Mizuno, M., T. Imai, R. Fujisawa, H. Tani and Y. Kuboki (2000). "Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix." *Calcif Tissue Int* **66**(5): 388-396.
- Moalli, M. R., N. J. Caldwell, P. V. Patil and S. A. Goldstein (2000). "An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone." *J Bone Miner Res* **15**(7): 1346-1353.
- Monfoulet, L., L. Malaval, J. E. Aubin, S. R. Rittling, A. P. Gadeau, J. C. Fricain and O. Chassande (2010). "Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing." *Bone* **46**(2): 447-452.
- Morinobu, M., M. Ishijima, S. R. Rittling, K. Tsuji, H. Yamamoto, A. Nifuji, D. T. Denhardt and M. Noda (2003). "Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo." *J Bone Miner Res* **18**(9): 1706-1715.
- Moss, M. L. and S. N. Greenberg (1967). "Functional cranial analysis of the human maxillary bone: I, Basal bone." *Angle Orthod* **37**(3): 151-164.
- Mullender, M. G. and R. Huiskes (1995). "Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law." *J Orthop Res* **13**(4): 503-512.
- Murphy-Ullrich, J. E. (2001). "The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?" *J Clin Invest* **107**(7): 785-790.
- Nahar, N. N., L. R. Missana, R. Garimella, S. E. Tague and H. C. Anderson (2008). "Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins." *J Bone Miner Metab* **26**(5): 514-519.
- Nakamura, H. (2007). "Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells." *Journal of Hard Tissue Biology* **16**(1): 15-22.
- Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer and B. de Crombrughe (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." *Cell* **108**(1): 17-29.
- Nampej, A., J. Hashimoto, K. Hayashida, H. Tsuboi, K. Shi, I. Tsuji, H. Miyashita, T. Yamada, N. Matsukawa, M. Matsumoto, S. Morimoto, T. Ogihara, T. Ochi and H. Yoshikawa (2004). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone." *J Bone Miner Metab* **22**(3): 176-184.
- Narayanan, K., A. Ramachandran, J. Hao, G. He, K. W. Park, M. Cho and A. George (2003). "Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca<sup>2+</sup> store." *J Biol Chem* **278**(19): 17500-17508.
- Narayanan, K., R. Srinivas, A. Ramachandran, J. Hao, B. Quinn and A. George (2001). "Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4516-4521.
- Noble, B. S. (2008). "The osteocyte lineage." *Arch Biochem Biophys* **473**(2): 106-111.
- Ogata, Y. (2008). "Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism." *J Periodontal Res* **43**(2): 127-135.
- Ogbureke, K. U. and L. W. Fisher (2004). "Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands." *J Dent Res* **83**(9): 664-670.
- Ogbureke, K. U. and L. W. Fisher (2005). "Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs)." *Kidney Int* **68**(1): 155-166.

- Ohta, S., T. Yamamuro, K. Lee, H. Okumura, R. Kasai, Y. Hiraki, T. Ikeda, R. Iwasaki, H. Kikuchi, J. Konishi and et al. (1991). "Fracture healing induces expression of the proto-oncogene *c-fos* in vivo. Possible involvement of the Fos protein in osteoblastic differentiation." *FEBS Lett* **284**(1): 42-45.
- Oldberg, A., A. Franzen and D. Heinegard (1986). "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 8819-8823.
- Oldberg, A., A. Franzen and D. Heinegard (1988). "The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein." *J Biol Chem* **263**(36): 19430-19432.
- Owan, I., D. B. Burr, C. H. Turner, J. Qiu, Y. Tu, J. E. Onyia and R. L. Duncan (1997). "Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain." *Am J Physiol* **273**(3 Pt 1): C810-815.
- Petersen, D. N., G. T. Tkalcevic, A. L. Mansolf, R. Rivera-Gonzalez and T. A. Brown (2000). "Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes." *J Biol Chem* **275**(46): 36172-36180.
- Pirotte, S., V. Lamour, V. Lambert, M. L. Alvarez Gonzalez, S. Ormenese, A. Noel, D. Mottet, V. Castronovo and A. Bellahcene (2011). "Dentin matrix protein 1 induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and inhibits VEGF-induced angiogenesis by blocking VEGFR-2 phosphorylation." *Blood* **117**(8): 2515-2526.
- Qin, C., O. Baba and W. T. Butler (2004). "Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis." *Crit Rev Oral Biol Med* **15**(3): 126-136.
- Qin, C., J. C. Brunn, R. G. Cook, R. S. Orkiszewski, J. P. Malone, A. Veis and W. T. Butler (2003). "Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites." *J Biol Chem* **278**(36): 34700-34708.
- Qin, C., R. D'Souza and J. Q. Feng (2007). "Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis." *J Dent Res* **86**(12): 1134-1141.
- Qin, C., B. Huang, J. N. Wygant, B. W. McIntyre, C. H. McDonald, R. G. Cook and W. T. Butler (2006). "A chondroitin sulfate chain attached to the bone dentin matrix protein 1 NH2-terminal fragment." *J Biol Chem* **281**(12): 8034-8040.
- Qiu, P., L. Qin, R. P. Sorrentino, J. R. Greene, L. Wang and N. C. Partridge (2003). "Comparative promoter analysis and its application in analysis of PTH-regulated gene expression." *J Mol Biol* **326**(5): 1327-1336.
- Rath, B., J. Nam, T. J. Knobloch, J. J. Lannutti and S. Agarwal (2008). "Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts." *J Biomech* **41**(5): 1095-1103.
- Razzaque, M. S. (2009). "The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis." *Nat Rev Endocrinol* **5**(11): 611-619.
- Razzouk, S., J. C. Brunn, C. Qin, C. E. Tye, H. A. Goldberg and W. T. Butler (2002). "Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion." *Bone* **30**(1): 40-47.
- Reinholt, F. P., K. Hultenby, A. Oldberg and D. Heinegard (1990). "Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4473-4475.

- Rho, J. Y., L. Kuhn-Spearing and P. Zioupos (1998). "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone." *Med Eng Phys* **20**(2): 92-102.
- Rho, J. Y., T. Y. Tsui and G. M. Pharr (1997). "Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation." *Biomaterials* **18**(20): 1325-1330.
- Rickard, D. J., F. L. Wang, A. M. Rodriguez-Rojas, Z. Wu, W. J. Trice, S. J. Hoffman, B. Votta, G. B. Stroup, S. Kumar and M. E. Nuttall (2006). "Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells." *Bone* **39**(6): 1361-1372.
- Roach, H. I. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption." *Cell Biol Int* **18**(6): 617-628.
- Roberts, S., S. Narisawa, D. Harmey, J. L. Millan and C. Farquharson (2007). "Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization." *J Bone Miner Res* **22**(4): 617-627.
- Roberts, S. J., H. C. Owen and C. Farquharson (2008). "Identification of a novel splice variant of the haloacid dehalogenase: PHOSPHO1." *Biochem Biophys Res Commun* **371**(4): 872-876.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldrige, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris and C. H. Turner (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin." *J Biol Chem* **283**(9): 5866-5875.
- Robling, A. G. and C. H. Turner (2002). "Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice." *Bone* **31**(5): 562-569.
- Roche, P., H. A. Goldberg, P. D. Delmas and L. Malaval (1999). "Selective attachment of osteoprogenitors to laminin." *Bone* **24**(4): 329-336.
- Ross, F. P. (2006). "M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors." *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 110-116.
- Rowe, P. S. (2004). "The wrickkened pathways of FGF23, MEPE and PHEX." *Crit Rev Oral Biol Med* **15**(5): 264-281.
- Rowe, P. S. (2012). "The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled." *Cell Biochem Funct* **30**(5): 355-375.
- Rowe, P. S. (2012). "Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: the PHEX, FGF23, DMP1, MEPE ASARM pathway." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **22**(1): 61-86.
- Rowe, P. S., P. A. de Zoysa, R. Dong, H. R. Wang, K. E. White, M. J. Econs and C. L. Oudet (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." *Genomics* **67**(1): 54-68.
- Rowe, P. S., I. R. Garrett, P. M. Schwarz, D. L. Carnes, E. M. Lafer, G. R. Mundy and G. E. Gutierrez (2005). "Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP)." *Bone* **36**(1): 33-46.
- Rowe, P. S., N. Matsumoto, O. D. Jo, R. N. Shih, J. Oconnor, M. P. Roudier, S. Bain, S. Liu, J. Harrison and N. Yanagawa (2006). "Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin." *Bone* **39**(4): 773-786.

- Rubin, C., G. Xu and S. Judex (2001). "The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli." *FASEB J* **15**(12): 2225-2229.
- Salaszyk, R. M., W. A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky and G. E. Plopper (2004). "Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *J Biomed Biotechnol* **2004**(1): 24-34.
- Salgado, A. J., O. P. Coutinho and R. L. Reis (2004). "Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression." *Tissue Eng* **10**(3-4): 465-474.
- Saltel, F., A. Chabadel, E. Bonnelye and P. Jurdic (2008). "Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation." *Eur J Cell Biol* **87**(8-9): 459-468.
- Schneider, G. B., S. W. Whitson and L. F. Cooper (1999). "Restricted and coordinated expression of beta3-integrin and bone sialoprotein during cultured osteoblast differentiation." *Bone* **24**(4): 321-327.
- Scott, A., K. M. Khan, V. Duronio and D. A. Hart (2008). "Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise." *Sports Med* **38**(2): 139-160.
- Shirley, D. G., N. J. Faria, R. J. Unwin and H. Dobbie (2010). "Direct micropuncture evidence that matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits proximal tubular phosphate reabsorption." *Nephrol Dial Transplant* **25**(10): 3191-3195.
- Sire, J. Y., S. Delgado, D. Fromentin and M. Girondot (2005). "Amelogenin: lessons from evolution." *Arch Oral Biol* **50**(2): 205-212.
- Sire, J. Y., P. C. Donoghue and M. K. Vickaryous (2009). "Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates." *J Anat* **214**(4): 409-440.
- Sodek, J., J. Chen, T. Nagata, S. Kasugai, R. Todescan, Jr., I. W. Li and R. H. Kim (1995). "Regulation of osteopontin expression in osteoblasts." *Ann N Y Acad Sci* **760**: 223-241.
- Sodek, J., B. Ganss and M. D. McKee (2000). "Osteopontin." *Crit Rev Oral Biol Med* **11**(3): 279-303.
- Sottile, J. and D. C. Hocking (2002). "Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions." *Mol Biol Cell* **13**(10): 3546-3559.
- Speer, M. Y., Y. C. Chien, M. Quan, H. Y. Yang, H. Vali, M. D. McKee and C. M. Giachelli (2005). "Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro." *Cardiovasc Res* **66**(2): 324-333.
- Sprowson, A. P., A. W. McCaskie and M. A. Birch (2008). "ASARM-truncated MEPE and AC-100 enhance osteogenesis by promoting osteoprogenitor adhesion." *J Orthop Res* **26**(9): 1256-1262.
- Staines, K. A., V. E. MacRae and C. Farquharson (2012). "The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling." *J Endocrinol* **214**(3): 241-255.
- Steiglitz, B. M., M. Ayala, K. Narayanan, A. George and D. S. Greenspan (2004). "Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1." *J Biol Chem* **279**(2): 980-986.
- Stein, G. S., J. B. Lian, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S. K. Zaidi, D. W. Young, J. Y. Choi and S. M. Pockwinse (2004). "Runx2 control of organization, assembly

- and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression." *Oncogene* **23**(24): 4315-4329.
- Stewart, A. J., S. J. Roberts, E. Seawright, M. G. Davey, R. H. Fleming and C. Farquharson (2006). "The presence of PHOSPHO1 in matrix vesicles and its developmental expression prior to skeletal mineralization." *Bone* **39**(5): 1000-1007.
- Stubbs, J. T., 3rd, K. P. Mintz, E. D. Eanes, D. A. Torchia and L. W. Fisher (1997). "Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain." *J Bone Miner Res* **12**(8): 1210-1222.
- Sun, Y., L. Chen, S. Ma, J. Zhou, H. Zhang, J. Q. Feng and C. Qin (2011). "Roles of DMP1 processing in osteogenesis, dentinogenesis and chondrogenesis." *Cells Tissues Organs* **194**(2-4): 199-204.
- Sunters, A., J. McCluskey and A. E. Grigoriadis (1998). "Control of cell cycle gene expression in bone development and during c-Fos-induced osteosarcoma formation." *Dev Genet* **22**(4): 386-397.
- Suzawa, M., Y. Tamura, S. Fukumoto, K. Miyazono, T. Fujita, S. Kato and Y. Takeuchi (2002). "Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation." *J Bone Miner Res* **17**(2): 240-248.
- Tahimic, C. G., Y. Wang and D. D. Bikle (2013). "Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 6.
- Tanaka, S. M., J. Li, R. L. Duncan, H. Yokota, D. B. Burr and C. H. Turner (2003). "Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts." *J Biomech* **36**(1): 73-80.
- Tang, C. H., R. S. Yang, T. H. Huang, D. Y. Lu, W. J. Chuang, T. F. Huang and W. M. Fu (2006). "Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts." *Mol Pharmacol* **69**(6): 2047-2057.
- Tartaix, P. H., M. Doulaverakis, A. George, L. W. Fisher, W. T. Butler, C. Qin, E. Salih, M. Tan, Y. Fujimoto, L. Spevak and A. L. Boskey (2004). "In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions." *J Biol Chem* **279**(18): 18115-18120.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." *Science* **289**(5484): 1504-1508.
- Terai, K., T. Takano-Yamamoto, Y. Ohba, K. Hiura, M. Sugimoto, M. Sato, H. Kawahata, N. Inaguma, Y. Kitamura and S. Nomura (1999). "Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress." *J Bone Miner Res* **14**(6): 839-849.
- Teramoto, H., M. D. Castellone, R. L. Malek, N. Letwin, B. Frank, J. S. Gutkind and N. H. Lee (2005). "Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12." *Oncogene* **24**(3): 489-501.
- Terkeltaub, R., M. Rosenbach, F. Fong and J. Goding (1994). "Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1. Relevance to calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease." *Arthritis Rheum* **37**(6): 934-941.
- Tilli, T. M., V. F. Franco, B. K. Robbs, J. L. Wanderley, F. R. da Silva, K. D. de Mello, J. P. Viola, G. F. Weber and E. R. Gimba (2011). "Osteopontin-c splicing isoform contributes to ovarian cancer progression." *Mol Cancer Res* **9**(3): 280-293.

- Tortora, G. J., Grabowski, S.R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie. Principes d'anatomie et de physiologie*. D. B. Université. Québec. **2**: 156-157.
- Toyosawa, S., S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin and T. Komori (2001). "Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts." *J Bone Miner Res* **16**(11): 2017-2026.
- Turner, C. H. (1998). "Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli." *Bone* **23**(5): 399-407.
- Tye, C. E., G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2005). "Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction." *J Biol Chem* **280**(14): 13487-13492.
- Tye, C. E., K. R. Rattray, K. J. Warner, J. A. Gordon, J. Sodek, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2003). "Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein." *J Biol Chem* **278**(10): 7949-7955.
- Udagawa, N., N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T. J. Martin and T. Suda (1990). "Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7260-7264.
- Valverde, P., J. Zhang, A. Fix, J. Zhu, W. Ma, Q. Tu and J. Chen (2008). "Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice." *J Bone Miner Res* **23**(11): 1775-1788.
- van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, P. ten Dijke and C. W. Lowik (2004). "Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist." *J Exp Med* **199**(6): 805-814.
- van Driel, M., H. A. Pols and J. P. van Leeuwen (2004). "Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites." *Curr Pharm Des* **10**(21): 2535-2555.
- Vico, L., P. Collet, A. Guignandon, M. H. Lafage-Proust, T. Thomas, M. Rehaillia and C. Alexandre (2000). "Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts." *Lancet* **355**(9215): 1607-1611.
- Wade-Gueye, N. M., M. Boudiffa, N. Laroche, A. Vanden-Bossche, C. Fournier, J. E. Aubin, L. Vico, M. H. Lafage-Proust and L. Malaval (2010). "Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment." *Endocrinology* **151**(11): 5103-5113.
- Wade-Gueye, N. M., M. Boudiffa, A. Vanden-Bossche, N. Laroche, J. E. Aubin, L. Vico, M. H. Lafage-Proust and L. Malaval (2012). "Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge." *Bone* **50**(5): 1064-1073.
- Waldo, C. M. and J. M. Rothblatt (1954). "Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations." *J Dent Res* **33**(4): 481-486.
- Waltregny, D., A. Bellahcene, I. Van Riet, L. W. Fisher, M. Young, P. Fernandez, W. Dewe, J. de Leval and V. Castronovo (1998). "Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **90**(13): 1000-1008.
- Wang, B. L., C. L. Dai, J. X. Quan, Z. F. Zhu, F. Zheng, H. X. Zhang, S. Y. Guo, G. Guo, J. Y. Zhang and M. C. Qiu (2006). "Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells." *J Endocrinol Invest* **29**(2): 101-108.

- Wang, J., H. Y. Zhou, E. Salih, L. Xu, L. Wunderlich, X. Gu, J. G. Hofstaetter, M. Torres and M. J. Glimcher (2006). "Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein." *Calcif Tissue Int* **79**(3): 179-189.
- Wang, Z., Z. Ying, A. Bosy-Westphal, J. Zhang, B. Schautz, W. Later, S. B. Heymsfield and M. J. Muller (2010). "Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure." *Am J Clin Nutr* **92**(6): 1369-1377.
- Wang, Z. Q., J. Liang, K. Schellander, E. F. Wagner and A. E. Grigoriadis (1995). "c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos." *Cancer Res* **55**(24): 6244-6251.
- Weber, G. F., S. Ashkar, M. J. Glimcher and H. Cantor (1996). "Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)." *Science* **271**(5248): 509-512.
- Wuthier, R. E. (1989). "Mechanism of de novo mineral formation by matrix vesicles." *Connect Tissue Res* **22**(1-4): 27-33; discussion 53-61.
- Wuttke, M., S. Muller, D. P. Nitsche, M. Paulsson, F. G. Hanisch and P. Maurer (2001). "Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding." *J Biol Chem* **276**(39): 36839-36848.
- Xiao, G., D. Jiang, P. Thomas, M. D. Benson, K. Guan, G. Karsenty and R. T. Franceschi (2000). "MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1." *J Biol Chem* **275**(6): 4453-4459.
- Xiao, G., D. Wang, M. D. Benson, G. Karsenty and R. T. Franceschi (1998). "Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor." *J Biol Chem* **273**(49): 32988-32994.
- Xu, L., A. L. Anderson, Q. Lu and J. Wang (2007). "Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation." *Biomaterials* **28**(4): 750-761.
- Yadav, M. C., A. M. Simao, S. Narisawa, C. Huesa, M. D. McKee, C. Farquharson and J. L. Millan (2011). "Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of *PHOSPHO1* and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification." *J Bone Miner Res* **26**(2): 286-297.
- Yao, K. L., R. Todescan, Jr. and J. Sodek (1994). "Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture." *J Bone Miner Res* **9**(2): 231-240.
- Ye, L., M. MacDougall, S. Zhang, Y. Xie, J. Zhang, Z. Li, Y. Lu, Y. Mishina and J. Q. Feng (2004). "Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development." *J Biol Chem* **279**(18): 19141-19148.
- Ye, L., Y. Mishina, D. Chen, H. Huang, S. L. Dallas, M. R. Dallas, P. Sivakumar, T. Kunieda, T. W. Tsutsui, A. Boskey, L. F. Bonewald and J. Q. Feng (2005). "Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype." *J Biol Chem* **280**(7): 6197-6203.
- Yoshitake, H., S. R. Rittling, D. T. Denhardt and M. Noda (1999). "Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8156-8160.
- You, J., G. C. Reilly, X. Zhen, C. E. Yellowley, Q. Chen, H. J. Donahue and C. R. Jacobs (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**(16): 13365-13371.
- Zhang, J., Q. Tu and J. Chen (2009). "Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein." *J Cell Physiol* **220**(1): 30-34.
- Zhou, H. Y., H. Takita, R. Fujisawa, M. Mizuno and Y. Kuboki (1995). "Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells." *Calcif Tissue Int* **56**(5): 403-407.
- Zhu, X. L., B. Ganss, H. A. Goldberg and J. Sodek (2001). "Synthesis and processing of bone sialoproteins during de novo bone formation in vitro." *Biochem Cell Biol* **79**(6): 737-746.
- Zohar, R., W. Lee, P. Arora, S. Cheifetz, C. McCulloch and J. Sodek (1997). "Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells." *J Cell Physiol* **170**(1): 88-100.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Publications et Communications

#### *Publications issues du travail de thèse*

**Bouët G.**, Marchat D., Malaval L., Vico L. ***Tissue engineering strategy for experimental approaches - The bone tissue in vitro.*** (soumis à *Tissue Engineering*)

**Bouët G.**, Marchat D., Cruel M., Laurent C. , Molimard J., Navarro L., Louis F., Laroche N., Linossier MT., Vico L., Malaval L. ***Validation of a new engineered 3D cell culture system in vitro for bone tissue engineering under mechanical stimulation.*** (soumis à *Biomaterials*)

**Bouët G.**, Boulefour W., Thomas M., Vanden Bossche A., Aubin JE., Vico L., Marchat D., Malaval L. ***The impairment of osteogenesis in BSP knockout bone cell cultures is cell density dependent.*** (en preparation)

#### *Publications issues de collaboration au cours de la thèse*

D. Marchat, **G. Bouët**, A. Lueckgen, M. Zymelka, L. Malaval, S. Szenknect, N. Dacheux, D. Bernache-Assollant, J.Chevalier. ***Physico-chemical characterization and in vitro biological evaluation of pure SiHa for bone tissue engineering application.*** *Key Engineering Materials*. 2013, Vols. 529-530, pp 351-356.

D. Marchat, M. Zymelka, **G. Bouët**, A. Lueckgen, L. Malaval, D. Bernache-Assollant, J.Chevalier. ***Silicon-substituted hydroxyapatite: solubility product and 2D in vitro biological evaluation.*** (en préparation pour *Biomaterials*)

Boulefour W, Boudiffa M., Wade-Gueye N.M., **Bouët G.**, Cardelli M., Laroche N., Vanden-Bossche A., Bonnelye E., Aubin J.E., Laurence Vico L., LafageProust M.H., Malaval L. ***Impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass in mice lacking bone sialoprotein (BSP).*** (en preparation)

Boulefour W., **G. Bouët**, Granito R., Thomas M., Linossier M., Vanden Bossche A., Aubin J.E., Vico L., Malaval L. ***Expression of both bone sialoprotein and osteopontin is necessary to the anabolic action of PTH on mouse calvaria bone*** (en préparation)

Merle B., Rousseau JC., **Bouët G.**, Bertholon C., Garnerio P. ***Periostin and Transforming Growth factor- $\beta$  induced protein (TGF $\beta$ 1p) are both expressed by osteoblasts and osteoclasts.*** (soumis à *Cell Biology International*)

## Communications orales

15 <sup>th</sup> JFBTM 30 mai-1 <sup>er</sup> juin 2013 Poitiers, France
Belgium Symposium on Tissue Engineering 17-18 septembre 2012 Louvain, Belgique
14 <sup>th</sup> JFBTM 29-31 mai 2012 Bordeaux, France

*Développement et validation d'un modèle de culture en 3D pour l'ostéogenèse in vitro.*

**Bouët G.**, Cruel M., Vico L, Malaval L., Marchat D

*Development and validation of a bioreactor for mechanical stimulation of in vitro engineered 3D bone tissue.*

**G. Bouët**, N. Curt, L. Vico, D. Marchat, L. Malaval

*Effect of bone sialoprotein knockout on in vitro osteogenesis by mouse calvaria cells.*

**Bouët G**, Marchat D, Merle B, Linossier M, Thomas M, Bouleftour W, Vico L, Malaval L.

## Communications affichées

ECTS annual meeting 18-21 may 2013 Lisbon, Portugal
---

*Calvaria cells from bone sialoprotein knockout mice contain less osteoprogenitors and display a cell density dependent impairment of bone formation and mineralization in vitro.*

**Bouët G**, Marchat D, Merle B, Linossier M, Thomas M, Bouleftour W, Vico L, Malaval L.

Journée Scientifique ifresis 15 novembre 2012 Saint-Etienne, France
---

*Development and validation of a bioreactor for mechanical stimulation of in vitro engineered 3D bone tissue.*

**G. Bouët**, N. Curt, L. Vico, D. Marchat, L. Malaval

ASBMR annual meeting 12-15 octobre 2012 Minneapolis, USA
--

*Calvaria cells from bone sialoprotein knockout mice contain less osteoprogenitors and display a cell density dependent impairment of bone formation and mineralization in vitro.*

**Bouët G**, Marchat D, Merle B, Linossier M, Thomas M, Bouleftour W, Vico L, Malaval L.

Belgium Symposium on Tissue Engineering 17-18 septembre 2012 Louvain, Belgique
---

*Development and validation of a bioreactor for mechanical stimulation of in vitro engineered 3D bone tissue.*

**G. Bouët**, N. Curt, L. Vico, D. Marchat, L. Malaval

Journée de la Recherche 14 juin 2012 Saint-Etienne, France
--

*Development of 3D cell culture model for osteogenesis.*

**Bouët G**, Marchat D, Curt N, Vico L, Malaval L.

Gordon Research Seminars 18-19 juin 2011 Les Diablerets, Suisse
---

*Effect of bone sialoprotein knockout on in vitro osteogenesis by mouse calvaria cells.*

**Bouët G**, Bouleftour W, Aubin JE, Vico L, Malaval L.

Annexe 2 : Curriculum vitae

## Guénaëlle Bouët

8 chemin des Noyers  
42160 ANDREZIEUX BOUTHEON  
☎ : 06 83 83 52 76  
@ : [guenaelle.bouet@gmail.com](mailto:guenaelle.bouet@gmail.com)

Nationalité Française  
26 ans (07/04/1987)  
Permis B  
Célibataire

**FORMATION**

- 2009/2013**     **Doctorat de Sciences Ingénierie Santé** (bourse ministérielle) – Université Jean Monnet – Saint-Etienne
- 2012**            **Diplôme Universitaire d'ouverture professionnelle aux bio-industries** – BiotechCompétences/Université Claude Bernard – Lyon : formation permettant de mieux appréhender le monde des bio-industries afin de réaliser des collaborations public/privé
- 2010**            **Diplôme Inter-Universitaire Modèles animaux conventionnels et transgéniques pour la recherche biologique et médicale (Expérimentation de niveau 1)** – Ecole Normale Supérieure et Université Claude Bernard, Lyon
- 2009**            Formation **Conduite d'autoclaves** – Saint-Etienne
- 2008/2009**     **Master 2 Recherche Génétique Fonctionnelle et Pathologie Cellulaire** - Université Claude Bernard – Lyon
- 2007/2008**     **Master 1 Biochimie Cellulaire et Physiologie** - Université de Bourgogne – Dijon
- 2004/2007**     **Licence Biologie Cellulaire et Physiologie** - Université de Bourgogne - Dijon

**ACTIVITES DE RECHERCHE**

- 2009/2013**     **Doctorat**, INSERM U1059 - Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, en collaboration avec le Centre Ingénierie Santé de l'Ecole Nationale des Mines de Saint-Etienne – Saint-Etienne
- *Projet de recherche s'inscrivant dans un projet européen financé par l'Agence Spatiale Européenne (ESA) : « optimisation des conditions environnementales de culture 3D pour l'ostéogenèse »*
  - *Tuteur : Dr. Luc Malaval*
  - *Encadrement de 5 stagiaires :*
    - ✓ *2 élèves ingénieur en 3<sup>ème</sup> année à l'Ecole Nationale des Mines de Saint-Etienne*
    - ✓ *2 étudiants en équivalent 3<sup>ème</sup> année de Licence de Bio-ingénierie à l'Université Rice, Houston (USA)*
    - ✓ *1 étudiant en 1<sup>ère</sup> année de Licence de Biologie à l'Université Jean Monnet, Saint-Etienne*
- 2008 / 2009**     **Stage de Master 2 Recherche**, UMR5242 CNRS/ENS Lyon/INRA/UCBL - Lyon
- *Projet de recherche : « implication de CD72, récepteur de la Sema4D, dans l'ostéoclastogenèse »*
  - *Tuteur : Dr. Pierre Jurdic*
- Juil./Oct. 2007**     **Stage de Master 1**, Vanderbilt University Medical Center (VUMC) – Nashville (TN) – USA
- *Projet de recherche : « effet du stress sur le comportement des métastases dans le cancer du sein »*
  - *Tuteur : Dr. Florent Elefteriou*
- Juin 2006**            **Stage de Licence 2**, UMR5561 CNRS-uB, équipe Ecologie évolutive - Université Bourgogne – Dijon
- *Projet de recherche : « effet de l'intensité lumineuse sur le comportement de Gammarus pulex parasité par Pomphorhynchus laevis »*
  - *Tuteur : Dr. Loïc Bollache*
- Janv. 2006**         **Stage de Licence 2**, INSERM U517 - Université Bourgogne – Dijon
- *Apprentissage et réalisation de la technique de western blotting*
  - *Tuteur : Dr. Pierre-Emmanuel Puig*

## ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

2009 / 2012

« **Monitorat** », **64h/an soit 192h au total**, à la Faculté de Sciences et Techniques de l'Université Jean Monnet – Saint-Etienne

- *Surveillance d'examens de Licence, rédaction de sujets de TD, correction de comptes-rendus de TP*
- *TD Biologie Moléculaire L1 Biologie (58h), groupes de 30 étudiants*
- *TP Biologie Moléculaire L1 Biologie (8h), groupes de 10 étudiants*
- *TD Biochimie L2 Biologie (48h), groupes de 30 étudiants*
- *TP Génétique L3 Biologie (24h), groupes de 20 étudiants*
- *TP Biochimie L3 Biologie (54h), groupes de 10 étudiants*

Tutrice : Dr. Sandrine Moja

## COMPETENCES

- **Techniques**

Culture de cellules primaires murines et de lignées cellulaires (MC3T3-E1, C3H10 T1/2, MBA-231), infection shRNA, culture dans des modèles tridimensionnels

Culture cellulaire

Amplification et préparation d'ADN plasmidique, extraction et dosage d'ARN et de protéines, électrophorèse sur gel d'agarose, western blot, dosage ELISA, RT-PCR, PCR, transformation bactérienne, immunofluorescence

Biologie moléculaire  
Biochimie

Inclusion de tissus en parafine, coupe au microtome, montage et coloration des coupes

Histomorphométrie

Vidéomicroscopie (time-lapse, mosaïque)

Imagerie

Reproduction, euthanasie et dissection de tissus osseux de souris

Expé. animale

- **Informatique** Pack Microsoft Office 2003 et 2010, Image J, EndNote, Statistica
- **Linguistique** Anglais (lu, parlé, écrit – 3 mois aux USA), Allemand et Espagnol (niveau scolaire)

## BOURSES ET PRIX

- 2013** Prix SFBTM pour une présentation orale lors des 15<sup>ème</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés  
**2012** Prix poster à la Journée de la Recherche de l'Université Jean Monnet  
**2009** Allocation de Recherche (MENRT) du Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie  
**2007** Bourse de mobilité international du Conseil Régional de Bourgogne

## ACTIVITES PARALLELES

Vice-présidente de l'**ASEC** (Association Stéphanoise des JEunes Chercheurs), 2012-2013  
 Membre du conseil d'administration de l'**ASEC**, 2010-2013  
 Webmaster de l'**ASEC**, 2010-2011

Activités associatives

Membre du staff du programme **BioVision.Nxt** pour le forum international BioVision 2013  
 Membre de l'organisation du **Forum BIOTechno 2012**  
 Membre du staff du programme **BioVision.Nxt** pour le forum international BioVision 2011

Organisation de  
manifestations  
scientifiques

Plongée sous-marine (niveau 1), ski, natation, salsa  
 Guitare, voyages (membre de la communauté *Couchsurfing*)

Sports et loisirs

**Résumé :**

La culture cellulaire traditionnelle en deux dimensions n'est pas à même de reproduire les propriétés des tissus observées dans des organes en trois dimensions (3D). Ces tissus, en particulier les tissus de soutien comme l'os, sont soumis à des contraintes mécaniques, facteurs majeurs de régulation des interactions cellulaires et cellules/matrices. Il y a donc un intérêt croissant pour les modèles 3D, afin de mieux comprendre les différents aspects du fonctionnement cellulaire et du remodelage osseux, dans des systèmes de moindre complexité que les modèles *in vivo*. Nous nous sommes intéressés ici aux cellules ostéoblastiques et à une de leur protéine matricielle, la sialoprotéine osseuse (BSP). La BSP appartient à la famille des "small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins" (SIBLING), impliquées dans le développement, le remodelage et la minéralisation de l'os et de la dentine, et répondant rapidement à la contrainte mécanique. Notre objectif dans ce travail était d'analyser l'impact de l'absence de cette protéine sur la différenciation ostéoblastique et l'ostéogénèse *in vitro* à partir de cellules de calvaria (MCC) de souris présentant une extinction génique de la BSP (BSP<sup>-/-</sup>) cultivées dans un bioréacteur perfusé et soumis à des contraintes mécaniques via le système ZetOs<sup>TM</sup> précédemment validé au laboratoire.

En cultures 2D de MCC BSP<sup>-/-</sup>, le nombre des colonies fibroblastiques, pré-ostéoblastiques (exprimant la phosphatase alcaline), et ostéoblastiques/minéralisantes (CFU-OB = nodules osseux) est réduit par rapport aux cellules sauvages (BSP<sup>+/+</sup>). Les CFU-OB minéralisent peu ou pas du tout. Ceci suggère la présence parmi les MCC d'un plus faible nombre d'ostéoprogéniteurs, confirmé par leur plus faible taux de prolifération en début de culture par rapport aux BSP<sup>+/+</sup>. Dans des MCC repiquées à basse densité (5000cellules/cm<sup>2</sup>), les deux génotypes ne montrent aucune différence dans l'expression des marqueurs ostéoblastiques en début de culture. A partir de J14, quand les CFU-OB apparaissent, l'expression des marqueurs ostéoblastiques est fortement réduite chez les mutants. Au contraire, la SIBLING ostéopontine (OPN) et la Cathepsine B sont surexprimées suggérant l'implication de l'une au moins de ces protéines dans l'absence de minéralisation. A plus forte densité de repiquage (25000 cellules/cm<sup>2</sup>), l'expression des marqueurs de différenciation augmente dans les MCC BSP<sup>-/-</sup>, qui montrent alors un début de minéralisation, reflétant la formation d'os hypominéralisé qui est observé *in vivo* au cours du développement des souris mutantes. Les MCC BSP<sup>-/-</sup> présentent donc un défaut de formation osseuse et de minéralisation dépendant de la densité cellulaire.

Afin d'évaluer l'impact sur le phénotype observé de la géométrie du substrat, nous avons développé des chambres de culture pour supports 3D adaptées au système ZetOs<sup>TM</sup>, et mis au point des substituts osseux avec une macro/microarchitecture permettant à la fois le flux de milieu de culture dans les macropores interconnectés et l'application de contraintes mécaniques en compression. Cette biocéramique cubique comprend une partie interne macroporeuse entourée d'une zone dense sur les faces non perfusées, structure proche d'un os. La modélisation des propriétés mécaniques de la biocéramique montre que la plupart des contraintes/déformations subies devraient s'exercer sur la partie poreuse centrale, donc au contact direct des cellules. Nous avons mis au point des systèmes d'ensemencement et de perfusion latérale permettant une distribution homogène des cellules dans le support. Un système de senseur « en ligne » permet le contrôle du taux d'oxygène dans le milieu de culture en amont et en aval de la chambre. Notre système de culture permet une croissance des MCC jusqu'à 3 semaines, avec une consommation constante d'oxygène et un taux d'oxygène similaire à celui d'une culture en 2D. Les cellules en culture forment de l'os primaire dont elles expriment tous les marqueurs, et déposent une matrice minéralisée, dont la distribution est cependant inhomogène dans la structure 3D. Les MCC BSP<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup> cultivées dans le bioréacteur se différencient en ostéoblastes, et nos premiers résultats confirment en 3D la surexpression génique de l'OPN par les cellules BSP<sup>-/-</sup> observées en 2D. Ces travaux restent à compléter, en particulier pour analyser l'effet des contraintes mécaniques dans le bioréacteur et afin de remplir nos objectifs initiaux. Nous avons d'ores et déjà posé les bases d'un modèle d'ostéogénèse en 3D dans un environnement contrôlé et stimuable mécaniquement, qui servira la recherche fondamentale, l'ingénierie tissulaire et constituera un banc-test pour des molécules actives ciblant les cellules osseuses.

**Mots Clés :** Ostéoblaste primaire de souris, BSP, ostéogénèse, minéralisation, ingénierie tissulaire osseuse, bioréacteur, biomatériaux