

## Mise au point d'un modèle de culture tridimensionnelle pour l'évaluation de substituts osseux in vitro

Alno N<sup>1</sup>, Clipet F<sup>1</sup>, Pellen-Mussi P<sup>2</sup>, Cathelineau G<sup>2</sup>, De Mello G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Service de Chirurgie et Pathologie buccales, CHU, Rennes, France*

<sup>2</sup>*Laboratoire de Biomatériaux en Site Osseux, UMR CNRS 6226, Université, Rennes 1, France  
nora.alno@gmail.com*

L'évaluation des substituts osseux nécessite la mise au point d'un modèle de culture le plus proche possible du modèle physiologique. Une alternative intéressante consiste en l'utilisation d'une lignée osseuse immortalisée pour la préparation de sphéroïdes multicellulaires, ou cultures tridimensionnelles (3D). Dans cette optique, notre protocole a emprunté 2 voies. La première a visé la mise au point du modèle 3D sur une lignée humaine fœtale ostéoblastique standardisée et immortalisée par transfection de l'antigène T du SV40 (SV40T). La deuxième a visé l'immortalisation d'ostéoblastes d'adultes sains, issus de primocultures, par transfection successive des gènes codant pour SV40T et pour la partie catalytique de la télomérase (hTert). Finalement, les 2 voies devaient se rejoindre pour créer une nouvelle lignée humaine standardisée permettant l'évaluation de substituts osseux innovants.

Dans un premier temps, l'adaptation d'une technique en gouttes suspendues a abouti à la génération de sphéroïdes à partir de la lignée hFOB1.19 (human Fetal OsteoBlast) et à l'étude de l'effet des produits ioniques de dissolution du bioverre de référence 45S5, en comparaison avec des cultures bidimensionnelles (2D). Selon le type de culture, les analyses quantitatives (prolifération cellulaire, viabilité/cytotoxicité, cycles cellulaires) et qualitatives (microscopie électronique, expression des marqueurs génétiques) ont montré un effet différentiel de ce bioverre. La prolifération cellulaire est augmentée en cultures 2D conditionnées conformément aux données de la littérature, mais significativement diminuée en cultures sphéroïdes de même conditionnement, sans modification de l'expression génique dans les deux cas. Ce ralentissement de la prolifération cellulaire, constaté en cultures 3D, paraît être en accord avec l'inefficacité clinique des bioverres commercialement disponibles pour la réparation osseuse en sites non porteurs, tels que les défauts parodontaux et les comblements de défauts critiques en général.

Dans un deuxième temps, nous avons transfecté par électroporation des cellules d'emballage PT67 par les gènes codant pour SV40T et la résistance à la Néomycine ou pour hTert et la résistance à l'Hygromycine ; ces gènes étant intégrés dans des plasmides dérivés du vecteur rétroviral pBabe. Les particules virales des surnageants de culture ayant intégré les gènes SV40T et hTert devront servir à immortaliser des ostéoblastes prélevés sur adulte sain.

Par conséquent, ce protocole pourrait être adapté à l'évaluation rapide de biomatériaux innovants et à l'étude de leurs effets bioactifs sur une période prolongée, par des techniques de laboratoire couramment utilisées. D'autre part, il pourrait s'appliquer aux co-cultures cellulaires comme, par exemple, la co-culture de cellules endothéliales et de cellules osseuses constituant un modèle d'intérêt pour l'étude de biomatériaux implantés en site osseux. Enfin, il pourrait être intéressant pour l'étude de l'effet de différents biomatériaux sur des cellules souches ou des ostéoblastes prélevés sur patient puis cultivées en 3D pour différentes applications en ingénierie tissulaire.