

Article original

Mise au point d'un modèle tridimensionnel pour l'évaluation des biosubstituts osseux *in vitro*

Nora Alno^{1,3,*}, Franck Jegoux², Pascal Pellen-Mussi³, Sylvie Tricot-Doleux³, Guy Cathelineau³, Gilbert De Mello^{1†}

¹ Service de Chirurgie et Pathologie buccales, CHU de Rennes, France

² Service d'Otorhinolaryngologie et Chirurgie maxillo-faciale, CHU de Rennes, France

³ Equipe de Biomateriaux en Site osseux, UMR CNRS 6226, Université de Rennes, France

(Reçu le 11 juin 2010, accepté le 16 septembre 2010)

Mots clés :
sphéroïdes /
cultures 3D /
ostéoblaste /
hFOB 1.19 /
bioverre 45S5

Résumé – 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 correspondant à une culture tridimensionnelle (3D). Dans ce travail, l'adaptation d'une technique en gouttes suspendues a abouti à la génération de sphéroïdes à partir de la lignée standardisée hFOB1.19 (human Fetal OsteoBlast) et les tests ont porté sur l'étude de l'effet des produits ioniques de dissolution du bioverre 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 du bioverre. En effet, la prolifération cellulaire est augmentée en cultures 2D conditionnées conformément aux données de la littérature mais, si l'on conserve le même conditionnement, elle est significativement diminuée en cultures 3D sans modification de l'expression génique dans les deux cas. Ce ralentissement de la prolifération cellulaire, constatée au sein des sphéroïdes, 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. D'où l'intérêt du modèle sphéroïde qui pourrait être adapté à l'évaluation rapide de biomatériaux innovants, par des techniques de laboratoire couramment utilisées, et à l'étude de leurs effets bioactifs sur une période prolongée.

Key words:
spheroid /
3D culture /
osteoblast /
hFOB 1.19 /
45S5 bioglass

Abstract – Development of a three-dimensional model for *in vitro* evaluation of bone substitutes. The evaluation of innovative bone substitutes requires the development of an optimal model close to physiological conditions. An interesting alternative is the use of an immortalized cell line to construct multicellular spheroids, that is, three-dimensional (3D) cultures. In this study, a modified hanging drops method has resulted in the generation of spheroids with a well established human Fetal OsteoBlasts line (hFOB 1.19), and tests have been focused on the effect of 45S5 bioglass ionic dissolution products in comparison with two-dimensional (2D) cultures. Depending on cell culture type, quantitative analysis (cell proliferation, viability/cytotoxicity, cellular cycle) and qualitative analysis (electron microscopy, genes expression) showed a differential effect. Cell proliferation was enhanced in 2D conditioned cultures in accordance with literature data, but decreased in 3D cultures submitted to the same conditions, without change of gene expression patterns. The decrease of cell proliferation, observed in conditioned spheroids, appears to be in agreement with clinical observations showing the insufficiency of commercially available bioglasses for bone repairing within non bearing sites, such as periodontal defects or small bone filling in general. Therefore, we suggest that this model could be adapted to the screening of innovative bioactive materials by laboratory techniques already available and extended monitoring of their bioactivity. Also, it could be applied to the co-cultivation of mixed cell populations, for example, co-culture of endothelial and bone cells that would be a model of interest for the study of biomaterials implanted in bone site. Furthermore, it might be of interest to study the effect of biomaterials on stem cells or osteoblasts harvested from the patient and cultivated in 3D spheroids as a scaffold in tissue engineering applications.

* Correspondance : nora.alno@gmail.com

Glossaire

APH	phosphatase acide
BMIP	milieu de base avec des produits ioniques bioactifs
BPS	phosphate buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
HEMA	hydroxéthyl métacrylate
hFOB	human fetal osteoblast
ICP	inductively coupled plasma
MB	milieu de base
MEB	microscopie électronique à balayage
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PCR	polymerase chain reaction
RT	reverse transcription
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SRB	sulforhodamine B
SVF	serum veau foetal
UV	ultra-violet

Les sphéroïdes multicellulaires [cultures tridimensionnelles (3D)] sont très utilisés en cancérologie aussi bien en recherche fondamentale que pour la mise au point de médicaments anticancéreux. Ils apportent un supplément à l'utilisation des cultures bidimensionnelles (2D) car ils reproduisent plus fidèlement le microenvironnement tissulaire donnant un meilleur reflet de la réponse physiologique *in situ*, d'où une estimation plus précise des effets des molécules testées. Ils sont applicables à un grand nombre de lignées tumorales [1, 2], montrent peu ou pas de discordances avec les résultats observés lors des essais cliniques, et présentent des avantages éthiques et économiques du fait d'une sélection possible des molécules anticancéreuses avant essais sur l'animal [3].

Il s'agit d'une méthodologie dérivée des techniques de culture des cellules souches embryonnaires qui se différencient au sein de structures tridimensionnelles appelées corps embryoides [4]. Les premières méthodes [5-8] étaient techniquement compliquées et aboutissaient à des sphéroïdes de taille irrégulière. Par la suite, le formatage en gouttes suspendues au couvercle d'une plaque de microtitrage a donné des résultats reproductibles et permis d'envisager l'incorporation du modèle dans une plateforme automatisée [1] avec possibilité d'un screening à haut débit des médicaments anticancéreux [2, 3]. Plus récemment, d'autres techniques ont été décrites comme l'introduction des cellules dans des microcapsules d'alginate-poly-L-lysine-alginate [9], ou l'ensemencement sur puces de silicium équipées de microcanaux en élastomères autorisant un suivi prolongé de l'activité cellulaire [10].

Dans ce travail, l'objectif était la mise au point d'un modèle destiné à l'évaluation de substituts osseux innovants par des techniques d'utilisation courante. On a adapté la méthode de gouttes suspendues où une simple centrifugation fait que chaque sphéroïde tombe en goutte depuis le couvercle d'une plaque de microtitrage dans un puits rendu anti-adhésif [1, 2, 11]. Pour cette étude, on a travaillé avec deux

matériaux : la lignée commercialement disponible de cellules fœtales ostéoblastiques humaines hFOB 1.19 [12] capable de se différencier et de former de l'os, et les produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5 [13].

Le bioverre 45S5, découvert par Hench *et al.*, est connu pour être le bioverre le plus actif des verres résorbables du système SiO₂-CaO-Na₂O, *in vitro*. Ces bioverres ont été mis au point au début des années 1970 et sont très couramment utilisés en médecine bucco-dentaire. Le bioverre original est un mélange d'oxydes caractérisé par une proportion de SiO₂ inférieure à 60 %, une forte proportion de Na₂O et de CaO et un rapport CaO/P2O5 élevé. Il aurait la capacité de se lier fortement à l'os et de promouvoir la croissance osseuse après implantation *in vivo* [14, 15]. De nombreux travaux suggèrent que la liaison à l'os s'établit selon un mécanisme en plusieurs étapes comportant celle de la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée [16] similaire à la phase minérale de l'os [17]. Mais ces données ne seraient valables qu'à l'interface implant/os receveur [18], ce qui explique probablement l'inefficacité des bioverres commercialement disponibles sous forme de granulés de 90 µm à 710 µm (Perioglas[®], Biogran[®]) pour la réparation de défauts crâniens [19, 20], et la mauvaise qualité mécanique de l'os observé lorsqu'il sont utilisés seuls pour le comblement de défauts parodontaux ou des alvéoles osseuses après extraction dentaire. Il est maintenant reconnu que les propriétés ostéoconductrices et ostéoinductives des bioverres 45S5 sont insuffisantes pour envisager de réaliser un comblement osseux en sites non porteurs (atteinte parodontale, chirurgie de l'oreille moyenne, défauts critiques en général) [21]. En revanche, ils peuvent parfaitement être utilisés pour le largage de facteurs ostéopromoteurs [22] ; de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ayant mis en évidence le potentiel de différentes biocéramiques 45S5 en tant que matrice synthétique régénératrice [23].

Matériel et méthodes

Le schéma suivant résume le protocole opératoire (Fig. 1).

Mise en culture des cellules hFOB 1.19 en milieu de base (MB)

Il s'agit d'une lignée cellulaire fœtale ostéoblastique humaine (hFOB 1.19 ; ATCC[®]), immortalisée par transfection d'un gène codant pour un mutant thermosensible (tsA58) de l'antigène T du SV40. Les cellules cultivées à la température permissive de 33,5 °C se divisent rapidement, alors qu'à la température restrictive de 39,5 °C, les divisions sont ralenties. Après décongélation, les cellules sont mises à proliférer à 34 °C, en atmosphère humide et sous 5 % de CO₂, MB composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) et de Ham's-F12 (v/v) additionné de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 100UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 1,5 % (v/v) de tampon HEPES, 1 % (v/v) de L-glutamine (réactifs BioWhittaker[®]). Les cellules atteignant 60-80 % de

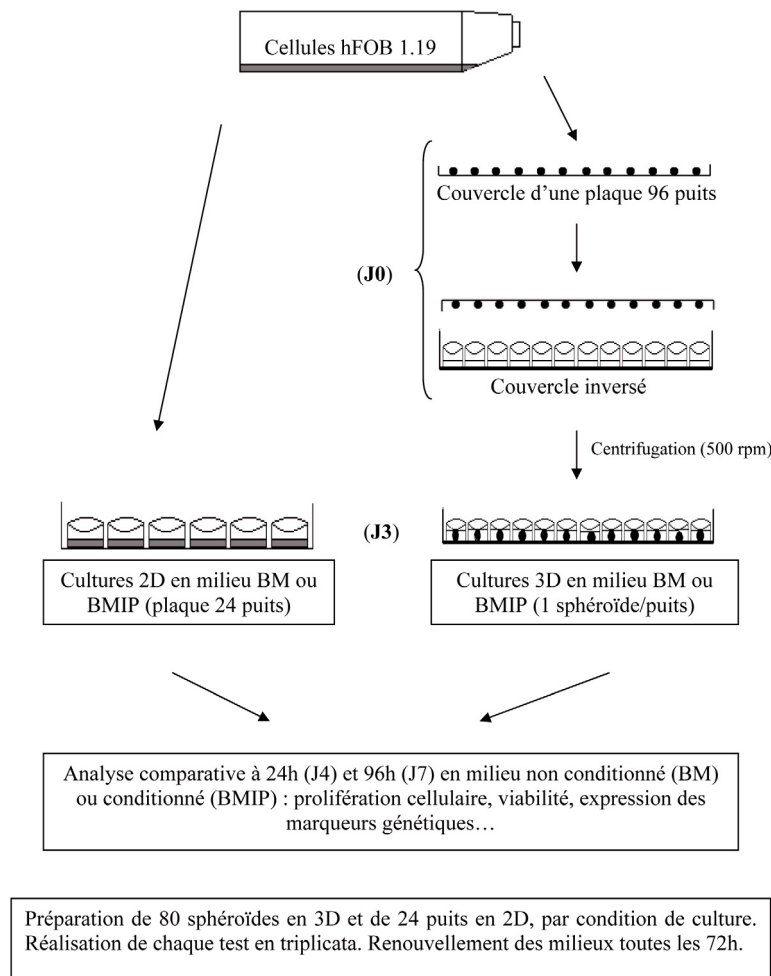


Fig. 1. Protocole opératoire.
Fig. 1. Operative protocol.

confluence sont repassées toutes les 72 h après dissociation enzymatique par une solution de trypsine-EDTA (0,05 %–0,02 %), puis mise en suspension rapide dans le milieu de culture.

Préparation et contrôle du milieu de conditionnement (BMIP)

Le milieu de culture contenant les produits ioniques bio-actifs (BMIP) résulte de la dissolution de 1 g de bioverre 45S5 [SiO₂ (45 %), Na₂O (24,5 %), CaO (24,5 %) et P₂O₅ (6 %)], sous forme de particules régulières de 400 µm, dans 100 ml de MB additionné de 50 U/ml de pénicilline et de 50 µg/ml de streptomycine. Après 24 h d’incubation, le milieu est additionné de 10 % (v/v) de SVF et de 1 % (v/v) de glutamine, puis filtré sur pastilles de 0,20 µm (Sartorius). Les concentrations de cette solution à 1 % sont vérifiées par spectrométrie d’émission optique sur analyseur ICP (Inductively Coupled Plasma). Conformément à la méthodologie décrite par Xynos et al. [13] elles sont d’environ : 0,05 µg.ml⁻¹ pour le

silicium, 0,10 µg.ml⁻¹ pour le calcium, 0,20 µg.ml⁻¹ pour le phosphore et de 0,10 µg.ml⁻¹ pour le sodium. A chaque préparation de cette solution, le test à la sulforhodamine B (SRB) permet de vérifier qu’elle correspond bien à la concentration minimale ayant un effet bio-actif sur les cellules hFOB mises en cultures 2D [24]. Après les essais préliminaires destinés à la détermination du nombre de cellules à ensemercer pour éviter la confluence, les suspensions cellulaires sont distribuées en plaques 24 puits sous 1 ml de milieu BM ou BMIP. Les cellules sont ensuite fixées 1 h à froid par de l’acide trichloracétique à 10 % (p/v) puis, lavées, séchées et colorées par addition de 300 µl de SRB à 0,4 % (p/v dans de l’acide acétique à 1 %, 30 min, sous agitation mécanique). Le colorant non lié aux protéines cellulaires est éliminé par lavages successifs dans de l’acide acétique à 1 % ; le colorant lié aux résidus acides aminés est extrait par 200 µl de Tris base 10mM non tamponné (pH : 10,5, 5 min, agitation mécanique). Enfin, 100 µL de chaque puits sont distribués en plaque 96 puits avant lecture à 492 nm sur lecteur de microplaques Asys Expert 96.

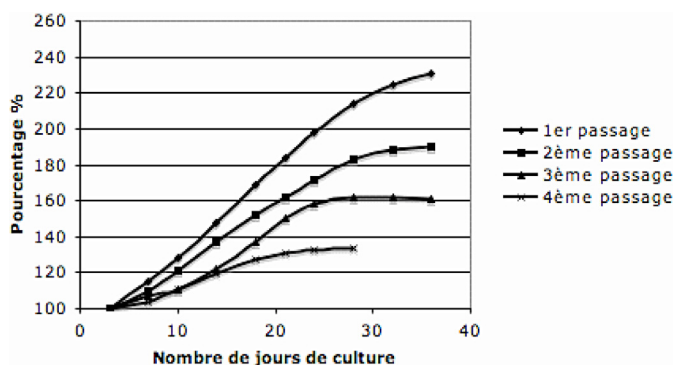


Fig. 2. Augmentation exponentielle du diamètre des sphéroïdes non conditionnés 3D-BM en fonction du temps, avec des valeurs plus faibles après chaque passage des cellules hFOB 1.19.

Fig. 2. Increase in diameter of 3D-BM unconditioned spheroids as a function of time, with lower values when the hFOB 1.19 cells have undergone more passages.

Préparation des sphéroïdes multicellulaires (cultures 3D)

Un coating anti-adhésif est réalisé sur chaque puits d'une microplaque 96 puits (Iwaki 3860-096) par addition de 50 μ l de poly-HEMA (2-hydroxyéthyl méthacrylate ; Sigma P3932-10G) dilué à 0,5 % dans de l'éthanol absolu filtré. Les plaques sont ensuite placées à l'étuve 18 h à 38 °C, puis lavées en PBS (phosphate buffered saline). Une suspension de cellules hFOB trypsinisées récoltées à partir de cultures 2D en milieu BM est ajustée à 50×10^3 cellules.ml⁻¹ en milieu BM filtré. Ensuite, 20 μ l de cette suspension (1000 cellules environ) sont déposés sur la face interne du couvercle d'une plaque 96 puits avec addition simultanée de PBS dans les puits correspondants pour éviter l'évaporation (Fig. 2). Le couvercle est immédiatement retourné et replacé sur la microplaque, puis l'ensemble est mis à 34 °C sous 5 % de CO₂ et agitation orbitale. Suite à l'inversion du couvercle, les gouttes suspendues tiennent sur place grâce aux pressions de surface et les cellules s'accumulent dans l'interface libre liquide-air. Au bout de 72 h (J3), le PBS de chaque puits est remplacé par 200 μ l de milieu BM ou BMIP. La centrifugation des microplaques, 1 mn à 500 rpm, permet le transfert des sphéroïdes du couvercle vers les micropuits (un seul sphéroïde par puits).

Validation de la prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes

Le diamètre des sphéroïdes non conditionnés par les produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5 (3D-BM) est mesuré sur une période de 36 jours (J3 à J36) en fonction du nombre de passages des cellules hFOB 1.19 après décongélation. Les mesures sont comparées à un étalon de taille (J3) obtenu dans les mêmes conditions et les moyennes sont calculées à partir de 60 à 80 sphéroïdes ayant eu les mêmes conditions de culture. Les résultats sont analysés à l'aide du

logiciel Photoshop® à partir des images capturées par un appareil photographique numérique fixé sur un microscope inversé (aus JENA TELAVAL 3).

Le dénombrement des cellules au sein des sphéroïdes est réalisé à partir de 20 sphéroïdes conditionnés (3D-BMIP) ou non (3D-BM) ayant eu les mêmes conditions de culture. Devant la persistance d'agrégats cellulaires microscopiques, plusieurs procédés de dissociation des sphéroïdes ont été évalués. Le protocole retenu a été l'addition séquentielle de 3 à 4 bains de trypsine-EDTA (respectivement 0,1 % et 0,04 % en PBS) complétée par une agitation mécanique. Après centrifugation, les culots sont repris dans 30 μ l de milieu filtré et les cellules sont comptées sur Cellometer™ Auto T4 Plus.

Viabilité et cytotoxicité

Le test à la phosphatase acide (APH) est applicable sans nécessiter la dissociation préalable des sphéroïdes [25]. Il repose sur le principe que les phosphatases acides cytoplasmiques des cellules vivantes hydrolysent le p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol d'où une absorbance à 405 nm directement proportionnelle au nombre de ces cellules. Les échantillons des cultures 2D en milieu BM ou BMIP sont délicatement lavés en PBS, puis repris sous 100 μ l de PBS. Les échantillons des cultures 3D, en milieu BM ou BMIP, sont préparés par l'assemblage de 5 sphéroïdes d'une même condition de culture sous 200 μ l de milieu BM en microplaque 96 puits à fond plat. Les plaques sont centrifugées 10 min à 1500 rpm, puis lavées en PBS et chaque puits est additionné de 100 μ l de PBS. Les deux types d'échantillons sont ensuite additionnés de 100 μ l d'une solution tamponnée [Immunopure p-nitrophénylphosphate 20 mg/10 ml, sodium acétate 0,1 M, Triton X100 0,1 % (Sigma)] et les plaques sont incubées 90 min à 34 °C. Enfin, chaque puits est additionné de 10 μ l de soude 1N avant lecture spectrophotométrique dans les 10 mn. L'équation de la droite de régression obtenue à partir des densités optiques du test APH réalisé sur une gamme étalon de cultures 2D permet de déterminer le nombre de cellules vivantes par puits à J4 et J7.

Cytométrie de flux

Elle est réalisée selon le protocole du Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences). Les échantillons sont préparés par assemblage de 6 puits de cultures 2D et environ 80 sphéroïdes ayant les mêmes conditions de culture. Les cellules sont centrifugées 5 mn à 2000 rpm, puis reprises sous 1 ml de solution tampon du kit. Cette étape est répétée une fois. Le protocole est ensuite identique mais les volumes réactionnels changent [solution A : 125 μ l en 2D (t° ambiante, 10 mn) contre 250 μ l en 3D (37 °C, 30 mn) ; solution B : 100 μ l en 2D contre 200 μ l en 3D (t° ambiante, 10 min) ; solution C : 100 μ l sont ajoutés à froid en 2D contre 200 μ l en 3D]. L'intensité de la fluorescence est analysée par passage des échantillons sur un cytomètre FACSCalibur. Les résultats sont interprétés à l'aide du logiciel CellQuest™ et le pourcentage de cellules en

Tableau I. Amorces utilisées pour la RT-PCR.

Table I. Primers used for RT-PCR.

Gènes	Séquence sens	Séquence anti-sens	Taille
Actine	5'-GTTGCTATCCAGGCTGTGC-3'	5'-CATAGTCCGCCTAGAAGC-3'	739 pb
Cbfa1	5'-CAGTGATTAGGGCGCATTTC-3'	5'-CTAGGCACATCGGTGATGG-3'	273 pb
Collagène 1	5'-GCAACATGGAGACTGGTGAG-3'	5'-GGATGGAGGGAGTTTACAGG-3'	537 pb
Ostéopontine	5'-CCAAGTAAGTCCAACGAAAG-3'	5'-GGTGATGTCCTCGTCTGTA-3'	349 pb
Ostéocalcine	5'-GCAGCGAGGTAGTGAAGAGA-3'	5'-GATGTGGTCAGCCAACCTCGT-3'	261 pb

phases G0G1, S, et G2M est calculé à l'aide du logiciel ModFit LT™.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Dix sphéroïdes ayant les mêmes conditions de culture sont transférés dans un tube conique anti-adhésif, rincés 2 fois en tampon PBS, puis fixés 24 h par du glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon PBS. Le fixateur est éliminé par deux lavages en PBS, puis les cellules fixées sont déshydratées par des bains successifs d'alcool (80°, 95°, 100°) et d'acétone. Après contournement du point critique et de la substitution progressive de l'acétone par du dioxyde de carbone (CPD 010, Balzers Union), les échantillons sont métallisés par vaporisation d'une fine couche d'or-palladium, puis examinés sur microscope JEOL JSM 6301-F.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Elle a été jugée nécessaire pour contrôler le maintien de l'expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique au sein des sphéroïdes hFOB 1.19. Les échantillons sont préparés par assemblage de 6 puits de culture 2D-BM ou 2D-BMIP et environ 80 sphéroïdes 3D-BM ou 3D-BMIP toujours dans les mêmes conditions de culture. L'ARN total est extrait selon le protocole du TRIzol® Reagent (Invitrogen), ensuite dosé par spectrophotométrie à 260 nm, et vérifié par mesure des densités optiques à 260 nm/280 nm et 230 nm/280 nm. Les solutions donnant des rapports compris respectivement entre 1,8-1,9 et 1,9-2,1 sont stockées à -20 °C. La reverse transcription (RT) est menée à partir de 1 µg de RNA total selon le protocole du Synthesis Kit Protoscript® (New England BioLabs) et son amplification par PCR utilise les amorces sens et anti-sens des gènes cbfa1, collagène 1, ostéocalcine 2, ostéopontine, et actine comme témoin interne de la réaction (Sigma-Proligo). Leur séquence et leur taille sont données dans le Tab. I. Après amplification, les fragments d'ADNc sont séparés par migration électrophorétique en gel d'agarose (1,5 %, 100 volts, 1 h) en tampon TAE (Tris- Acide borique-EDTA), puis révélés dans un bain de bromure d'éthidium sous lampe UV.

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différences entre les groupes ont été analysées par ANOVA et

Tableau II. Test SRB sur cultures 2D. Augmentation de la viabilité cellulaire sous l'effet des produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5 en cultures conditionnées comparativement aux cultures non conditionnées, prises comme contrôle 100 %.

Table II. SRB assay on 2D cultures. Increase of cell viability within 2D conditioned cultures (2D-BMIP) at D7 as an effect of 45S5 bioglass ionic products, in comparison with 2D unconditioned cultures (2D-BM) taken as control 100%.

Cultures 2D	J4		J7	
	DO	%	DO	%
2D-BM	1,7	100 ± 6,2	1,6	100 ± 5,8
2D-BMIP	1,7	101,05 ± 5,1	1,9	118,4 ± 2,9

le test de Fisher PLSD (milieux BM contre milieux BMIP, en cultures 2D et 3D, à J4 et J7), puis les résultats ont été calculés à l'aide du logiciel Statview v5.0; les valeurs de $p < 0,05$ étant considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Analyses quantitatives

En culture 2D, les résultats du test SRB en milieu de conditionnement (BMIP) sont exprimés par comparaison aux cultures en milieu non conditionné (BM) prises comme témoin 100 % (Tab. II). A J4, il n'y a pas de différence significative en terme de cytotoxicité entre cultures non conditionnées 2D-BM et cultures conditionnées 2D-BMIP (101,1 % ± 5,1 %). A J7, la viabilité est significativement augmentée pour les cultures conditionnées par rapport aux cultures non conditionnées (118,4 % ± 2,9 %; $p < 0,05$).

Les diamètres des sphéroïdes sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin J3 pris comme référence 100 %. Ils augmentent de façon exponentielle en fonction du temps, avec des valeurs plus faibles lorsque les cellules hFOB ont préalablement subi des passages plus nombreux après décongélation (Fig. 2). La Fig. 3 montre un sphéroïde homogène de 3 jours et de 211,05 µm de diamètre, généré par inoculation de 1000 cellules hFOB 1.19 (Fig. 3).

Le dénombrement cellulaire, réalisé sur une période de 28 jours à partir de 20 sphéroïdes ayant les mêmes conditions de culture, a donné des résultats non reproductibles du fait de la persistance d'agrégats cellulaires microscopiques malgré la mise en œuvre de nombreux procédés de dissociation. C'est pourquoi on a procédé à 3 dissociations séquentielles

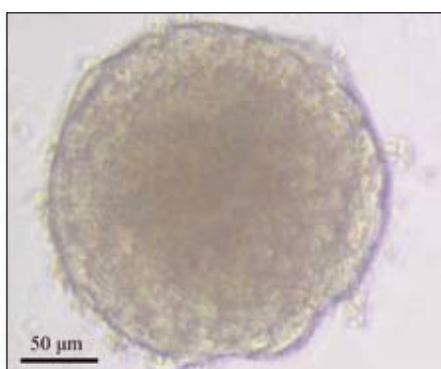


Fig. 3. Sphéroïde hFOB 1.19 non conditionné (3D-BM) de 211,05 μm de diamètre obtenu à J3 après inoculation initiale de 1000 cellules. *Fig. 3. hFOB spheroid of 3 days old and 211.05 μm in diameter, generated by inoculating 1000 hFOB 1.19 cells per drop in the hanging drop method.*

Tableau III. Prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes. Diminution de la prolifération cellulaire pour les sphéroïdes conditionnés (3D-BMIP) comparativement aux sphéroïdes non conditionnés (3D-BM), aussi bien à J4 qu'à J7.

Table III. Cell proliferation within spheroids. Decrease of cell number in conditioned spheroids (3D-BMIP), in comparison with unconditioned spheroids (3D-BM) at D4 as well at D7.

Cultures 3D (spheroids)	3D-BM	3D-BMIP
J4	15400 cells/ml	12600 cellules/ml
J7	52000 cells/ml	21000 cellules/ml

en triplicata et on a retenu, après examen microscopique, les suspensions les moins endommagées. Pour les sphéroïdes non conditionnés (3D-BM), les chiffres moyens augmentent de 3500 cellules à J3 à 27800 cellules à J28, avec un maximum de 36400 cellules à J12. Pour les sphéroïdes conditionnés, la prolifération cellulaire est nettement plus faible (J4/3D-BMIP : 12600 cellules/ml), (J7/3D-BMIP : 21000 cellules/ml) (Tab. III).

A J4, le test APH ne montre pas d'augmentation significative de la viabilité cellulaire en cultures 2D conditionnées (J4/2D-BMIP : 106,5 %) par comparaison aux cultures non conditionnées prises comme témoin 100 %. En revanche, il montre une diminution significative au sein des sphéroïdes conditionnés (J4/3D-BMIP : 64 %) par rapport aux sphéroïdes non conditionnés pris comme témoin 100 % (Tab. IV).

A J7, le nombre de cellules vivantes est plus élevé pour les deux types de culture mais la viabilité est augmentée en cultures 2D (J7/2D-BMIP : 111,1 % ; $p < 0,05$ %) et diminuée en cultures 3D conditionnées (J7/3D-BMIP : 79,4 %) par rapport aux cultures 2D et aux sphéroïdes non conditionnés (Tab. V).

La Fig. 4 donne la répartition des populations cellulaires en fonction de leur contenu en ADN étudié par cytométrie de flux. L'analyse comparative des cultures 2D et 3D montre un nombre plus élevé de cellules en phases S et G2M en cultures 2D et un nombre plus élevé de cellules en phase G0G1 en

Tableau IV. Viabilité cellulaire à J4/ test à l'APH. Diminution de la viabilité cellulaire pour les sphéroïdes 3D-BMIP sous l'effet des produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5, sans modification significative de la viabilité pour les cultures 2D soumises aux mêmes conditions.

Table IV. Cell viability at D4/ APH assay. Decrease in cell viability within 3D conditioned cultures (3D-BMIP spheroids) as an effect of 45S5 bioglass ionic dissolution products, without significant change in 2D cultures submitted to the same conditions (2D-BMIP).

J4	3D-BM	3D-BMIP	2D-BM	2D-BMIP
Dom	0,25	0,19	1,16	1,23
DS	0,01	0,01	0,13	0,20
Cellules/sphéroïde	8345	5345	53845	57345
%	100 %	64 %	100 %	106,5 %

Tableau V. Viabilité cellulaire à J7/ test à l'APH. Diminution plus modérée de la viabilité cellulaire pour les sphéroïdes conditionnés comparativement à J4/3D-BMIP (Tab. IV), mais augmentation significative de la viabilité en cultures 2D conditionnées (2D-BMIP) par rapport aux cultures 2D non conditionnées (2D-BM) prises comme contrôle 100 %.

Table V. Cell viability at D7/APH assay. Lower cytotoxic effect within 3D conditioned cultures (3D-BMIP spheroids) compared to D4 viability. Significant increase in cell viability in 2D conditioned cultures (2D-BMIP) in comparison with 2D unconditioned cultures (2D-BM).

J7	3D-BM	3D-BMIP	2D-BM	2D-BMIP
Dom	0,28	0,24	2,06	2,28
SD	0,03	0,03	0,13	0,40
Cellules/sphéroïde	19470	15470	197470	219470
%	100 %	79,4 %	100 %	111,1 %

cultures sphéroïdes (Fig. 4), mais la proportion de cellules en phase non multiplicative G0G1 est plus élevée pour les sphéroïdes conditionnés (J4/3D-BMIP : $45,16 \pm 0,03$; J7/3D-BMIP : $53,29 \pm 2,63$; $p < 0,05$) que pour les sphéroïdes non conditionnés (J4/3D-BM : $32,16 \pm 1,58$; J7/3DBM : $48,44 \pm 2,43$; $p < 0,05$).

Analyses qualitatives

La microscopie électronique à balayage (Fig. 5) confirme l'augmentation du diamètre des sphéroïdes non conditionnés de J4 à J7 (A et C). Les sphéroïdes exhibent une structure extrêmement compactée, les cellules sont à peine distinguées, très étalées et recouvrantes, ce qui suggère des jonctions intercellulaires très serrées. Une morphologie similaire est observée pour le sphéroïde conditionné à J4 (C), mais à J7 son diamètre a diminué et ses contours sont devenus très irréguliers (D). A plus fort grossissement (Fig. 6), le sphéroïde non conditionné (A₁) exhibe de nombreuses microvillosités ou microfilaments enchevêtrés et le sphéroïde conditionné (D₁) suggère des phénomènes d'extrusion membranaire ou cellulaire qui semblent avoir commencé après 24 h (C₁) et qui sont devenus plus importants avec des dépôts minéraux restés en surface.

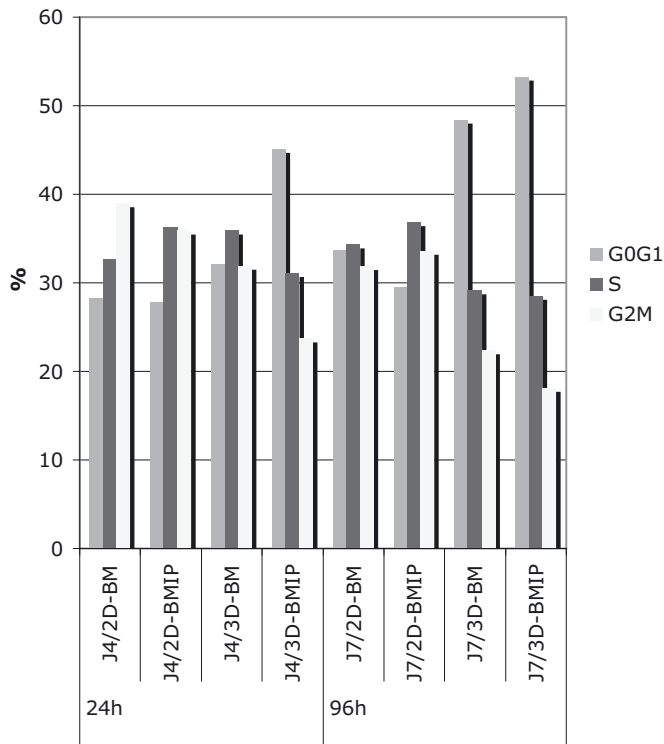


Fig. 4. La population cellulaire en phase non-multiplicative G0G1 est plus importante au sein des sphéroïdes conditionnés (3D-BMIP) par rapport aux sphéroïdes non conditionnés (3D-BM), aussi bien à J4 qu'à J7.

Fig. 4. Cell population in non cycling G0G1-phase cells is greater in conditioned spheroids (3D-BMIP) when compared to unconditioned spheroids (3D-BM) at D4 as well as at D7, whereas cell populations in S and G2M phases of the cell cycle are greater in 2D cultures.

Enfin, l'analyse de l'expression génique des marqueurs de la différenciation ostéoblastique montre que tous les marqueurs étudiés sont exprimés à J4 et à J7, en cultures 2D et 3D, conditionnées ou non conditionnées (Fig. 7).

Discussion

Cette étude met en évidence un effet différentiel des produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5 sur la prolifération des cellules hFOB 1.19 selon leur mise en culture bi-dimensionnelle ou tri-dimensionnelle. A 96 h de conditionnement, la prolifération cellulaire est augmentée en cultures 2D conformément aux données de la littérature, mais elle est significativement diminuée en cultures 3D ayant le même conditionnement. Il semble que le modèle sphéroïde n'ait jamais encore été utilisé en matière de substituts osseux.

Partant du principe que l'effet bioactif du Bioverre 45S5® passe par le largage d'ions calcium et silicates et que la taille des particules joue un rôle dans le processus de la prolifération osseuse [15, 26], on a choisi de travailler sur des granules homogènes de 400 µm, censés assurer une libération

constante des produits ioniques, et donc un effet expérimentalement reproductible. En effet, Xynos et al. ont démontré par l'étude du cycle cellulaire de cultures primaires d'ostéoblastes humains obtenus à partir de têtes fémorales de patients adultes, que le substrat total n'est pas nécessaire pour l'obtention de l'effet bioactif. Les milieux conditionnés par le bioverre, autrement dit les produits ioniques issus de sa dissolution, suffisent pour produire le même effet, puisque les jonctions inter-cellulaires et les jonctions d'ancrage sont plus nombreuses dès la 48^{ème} h, et la prolifération cellulaire significativement augmentée à la 96^{ème} h [13]. Depuis, l'utilisation de ces milieux conditionnés a été généralisée [27-30]. Cependant, le mécanisme par lequel le bioverre 45S5 modifie la physiologie cellulaire n'est pas complètement élucidé. La cinétique de libération, le pH, la synergie entre les différentes entités chimiques, et le rôle d'éléments traces représentent autant d'éléments servant de base aux hypothèses proposées. Une attention particulière a été portée sur le largage de silice, absente des liquides biologiques et considérée comme l'élément majeur jouant un rôle clé à l'origine de la bioactivité. Elle aurait un rôle double, indirect en favorisant l'adhérence des ostéoblastes à la couche d'hydroxyapatite [31], et direct en stimulant l'ostéogenèse à travers la voie Erk et l'expression de Runx2 dans les cellules pré-ostéoblastiques [32] ou en favorisant l'expression de 3 gènes clés : Collα1, Collα2, et Runx2 [33]. De plus, une étude récente a montré que les silicates en solution sont capables de promouvoir la prolifération, puis la différenciation des cellules MG63 osteoblast-like par activation de la voie Smad et du facteur de croissance BMP2 [34].

On a démontré la croissance cellulaire, au sein des sphéroïdes, par la mesure du diamètre des sphéroïdes non conditionnés (3D-BM) sur une période de 36 jours en fonction du nombre de passages des cellules hFOB 1.19. Le diamètre augmente de façon exponentielle avec des valeurs significativement plus faibles lorsque les cellules ont préalablement subi des passages plus nombreux, après décongélation. Par conséquent, seules les cellules des 2 premiers passages ont été utilisées pour l'ensemble des tests. Une des hypothèses pour expliquer cet épuisement, après chaque passage, tient sans doute à la qualité même des cellules hFOB 1.19, puisqu'il a été démontré sur des pré-ostéoblastes humains, obtenus à partir de périoste de fémur, que leur transfection isolée par l'antigène T du SV40 mène à des cellules dont la prolifération s'arrête au bout de 12 à 15 passages, et que leur co-transfection avec le gène hTert permet de passer ce point critique aboutissant à des lignées véritablement immortelles tout en conservant un phénotype d'ostéoblaste [34].

Quant au dénombrement des cellules réalisé sur 20 sphéroïdes ayant les mêmes conditions de culture, on s'est heurté à la persistance d'agrégats cellulaires microscopiques. En effet, la formation des sphéroïdes est complètement achevée en 24 h, sans désintégration observable lors des pipetages ou des lavages successifs, et leur dissociation devient de plus en plus difficile, même après 3 dissociations séquentielles en solution de trypsine-EDTA. C'est pourquoi les chiffres ne peuvent être ramenés à un seul sphéroïde et sont exprimés

en nombre absolu.ml⁻¹. Ces résultats manquent donc de précision. Il n'en demeure pas moins que cette méthode a objectivé que le nombre total de cellules au sein des sphéroïdes non conditionnés (3D-BM) est significativement plus élevé au terme de la période de culture (3500 cellules.ml⁻¹ à 27800 cellules.ml⁻¹), ce qui implique une augmentation de la prolifération cellulaire sans toutefois permettre l'interprétation du pic de croissance observé à J12 (36400 cellules.ml⁻¹). Ce pic pourrait précéder une nécrose secondaire fonction du diamètre et du temps de culture, décrite par Friedrich [36], mais des investigations supplémentaires et une technique de dissociation moins agressive sont requises pour écarter la possibilité d'un artefact. En ce qui concerne les sphéroïdes conditionnés 3D-BMIP, le nombre de cellules est significativement plus faible par rapport aux sphéroïdes non conditionnés, aussi bien à J4 qu'à J7 mais, dans tous les cas, il n'y a pas de corrélation linéaire entre diamètre et dénombrement cellulaire.

Toujours du fait de la persistance des agrégats cellulaires, on a obtenu des résultats discordants lorsque on a voulu évaluer la viabilité cellulaire au sein des sphéroïdes par des tests couramment utilisés, tels que le test SRB ou le MTT (diMethylThiazol-diphenylTetrazolium bromide). C'est pourquoi on a opté pour le test à l'APH qui permet d'évaluer la prolifération cellulaire au sein d'un sphéroïde donné sans dissociation préalable, est applicable en microplaques 96 puits, et s'est révélé hautement sensible et directement proportionnel dans les limites de 80000 cellules/sphéroïde et d'un diamètre ≤ 900 μm [25]. Comme attendu, la viabilité des cellules est augmentée en culture 2D conditionnées. En revanche, elle est diminuée en culture 3D par rapport aux cultures 2D ; le pourcentage de cellules vivantes dans les sphéroïdes conditionnés étant de 64 % à J4 et de 79,4 % à J7. Curieusement, la cytotoxicité est donc plus importante à J4 qu'à J7 alors qu'on devrait observer l'inverse. Ceci pourrait s'expliquer, comme on le verra plus loin, par la forte

compaction des cellules hFOB ; les cellules étant de plus en plus compactées, elles limiteraient la pénétration des produits ioniques à l'intérieur des sphéroïdes.

Par ailleurs, dans le but de confirmer ce ralentissement de la prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes par rapport aux cultures 2D, on a analysé les cycles cellulaires par cytométrie de flux à J4 et J7. Là aussi, comme attendu, la proportion de cellules en phase S (synthèse d'ADN) et G2M (mitoses) est plus importante en cultures 2D conditionnées par rapport aux cultures 2D non conditionnées et aux cultures 3D en général, tandis que la proportion de cellules en phase non multiplicative G0G1 est plus importante pour les sphéroïdes conditionnés par rapport aux sphéroïdes non conditionnés, aussi bien à J4 qu'à J7.

Les images observées par microscopie électronique à balayage amènent un nouvel éclairage en révélant la compaction extrême des sphéroïdes conditionnés ou non, vraisemblablement à l'origine des difficultés rencontrées lors de la dissociation. La comparaison avec des sphéroïdes construits à partir d'autres lignées cellulaires, cultivées au laboratoire, amène à penser que dans notre protocole les cellules hFOB sont particulièrement difficiles à dissocier lorsqu'elles sont cultivées en

3D du fait de leur forte propension à s'organiser dans les trois dimensions. Par ailleurs, ces images confirment l'augmentation du diamètre des sphéroïdes non conditionnés de J4 à J7, et révèlent que le sphéroïde conditionné par les produits de dissolution du bioverre 45S5 montre des signes témoignant d'un ralentissement significatif de la prolifération cellulaire à J7.

Un tel effet différentiel de molécules externes sur les cultures 3D par rapport aux cultures 2D a déjà été rapporté en recherche anti-cancéreuse. Le PX-866, inhibiteur de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ralentit la prolifération des cellules cultivées en 3D, mais il ne parvient pas à ralentir la prolifération des cellules cultivées en 2D. Cet effet serait cytotatique et passerait par l'inhibition prolongée de la PI3K [39]. L'effet opposé a aussi été décrit, puisque certains auteurs rapportent un effet cytotoxique moindre en cultures 3D et l'expliquent par le fait que seules les cellules de l'anneau périphérique sont au contact des milieux conditionnés par les molécules anti-cancéreuses [9, 40]. Dans cette étude, les résultats montrent que les produits ioniques de dissolution du bioverre 45S5 induisent un effet cytotoxique au sein des sphéroïdes. Cet effet pourrait être dû à l'altération des jonctions intercellulaires, suite à la modification brutale des concentrations ioniques intracellulaires associée à une stimulation dans les trois dimensions.

Quoiqu'il en soit, on obtient une différenciation avec les cultures sur sphéroïdes qui permet la conservation des capacités morphogéniques, de la réorganisation histotypique, des activités fonctionnelles et du mode d'expression génotypique [1]. Ainsi, nous n'avons pas constaté de modifications qualitatives de l'expression génique des cellules hFOB 1.19 par RT-PCR ; l'étude de leur différenciation ne faisait pas partie des objectifs de cette étude, de nombreux auteurs ayant déjà largement traité ce sujet. En effet, une étude exhaustive a démontré leur capacité à former de l'os *in vivo* sans entrer en transformation et à former une matrice extracellulaire *in vitro* [37]. De plus, une étude récente menée sur cultures 2D de cellules fœtales ostéoblastiques humaines, obtenues à partir d'os longs après digestion enzymatique, a démontré que les produits ioniques du Bioverre 45S5® créent un environnement extracellulaire qui induit la différenciation des ostéoblastes fœtaux et augmentent significativement la formation et la minéralisation de la matrice extracellulaire [18]. D'autre part, l'expression génique du collagène, marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique, est modifiée dès la 24^{ème} h de conditionnement [37], et la plupart des autres marqueurs voient leur expression modulée dans les 96 premières heures [38], ce qui correspond à J4 et J7 dans notre protocole. Un autre avantage est que des sphéroïdes de géométrie similaire peuvent être générés en seulement 24 h de culture ; leur taille peut être ajustée en fonction des besoins expérimentaux par modification du nombre de cellulesensemencées avant centrifugation ; leur cinétique peut être aisément étudiée *in situ*, et ils peuvent être facilement récoltés pour des analyses histologiques ou des études par différentes méthodes microscopiques [11]. Reste à définir les cellules osseuses humaines prélevées chez l'adulte, idéale pour la construction de

sphéroïdes standardisés permettant la comparaison des résultats des équipes travaillant sur ce sujet.

Conclusion

Les résultats de cette étude sont conformes aux données de la littérature en ce qui concerne l'effet stimulant du bio-verre 45S5 sur les ostéoblastes mis en cultures 2D, et paraissent en accord avec les observations cliniques générales en ce qui concerne la diminution de la prolifération cellulaire en culture 3D. Par conséquent, le protocole de cette étude pourrait constituer une contribution au développement de systèmes 3D en matière de substituts osseux. En effet, il pourrait se révéler utile pour l'évaluation rapide de biomatériaux innovants destinés à la réparation osseuse, par des techniques de laboratoire couramment utilisées. Ainsi, il pourrait servir à définir et à contrôler les concentrations ioniques menant à une meilleure ostéoinduction. 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 le patient, puis cultivés en 3D pour différentes applications en ingénierie tissulaire [41].

Conflits d'intérêt : aucun

Références

- Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 2006;11:922-32.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173-80.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 2004;9:273-85.
- Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85:645-51.
- Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 1984;95:1-23.
- Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 1999;67:148-57.
- Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240:177-84.
- Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res* 1984;95:24-49.
- Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang Y, Ma X. Development of an *in vitro* multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol Prog* 2005;21:1289-96.
- Torisawa YS, Takagi A, Nashimoto Y, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials* 2007;28:559-66.
- Timmins NE, Nielsen LK. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med* 2007;140:141-51.
- Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995;10:178-86.
- Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:461-65.
- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp* 1971;5:117-41.
- Wheeler DL, Eschbach EJ, Hoellrich RG, Montfort MJ, Chamberland DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *J Orthop Res* 2000;18:140-48.
- Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:543-62.
- Cerruti M, Bianchi C, Bonino F, Damin A, Perardi A, Morterra C. Surface modifications of bioglass immersed in TRIS-buffered Solution. A multitechnical spectroscopic study. *J Phys Chem B* 2005;109:14496-505.
- Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* 2009;30:3542-50.
- Cardoso AK, Barbosa Ade A Jr, Miguel FB, Marcantonio E Jr, Farina M, Soares GD, Rosa FP. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs* 2006;184:128-37.
- Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, Andrus L, Bradford M, Gilsdorf M, Jackson IT. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *J Craniofac Surg* 2005;16:63-70.
- Arcos D, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Promising trends of bioceramics in the biomaterials field. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:447-55.
- Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Bioactive glass three decades on. *J Long Term Eff Med implants* 2005;15:585-97.
- Bielby RC, Christodoulou IS, Pryce RS, Radford WJ, Hench LL, Polak JM. Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Eng* 2004;10:1018-26.
- Voiqt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005;110:39-48.

25. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen* 2007;12:925-37.
26. Yamamoto A, Honma R, Sumita M, Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:244-56.
27. Christodoulou I, Buttery LD, Saravanapavan P, Tai G, Hench LL, Polak JM. Dose-and time-dependant effect of bioactive glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:529-37.
28. Jell G, Notingher I, Tsigkou O, Notingher P, Polak JM, Hench LL, Stevens MM. Bioactive glass- induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A* 2008;86:31-40.
29. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:837-51.
30. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;55:151-57.
31. Anderson SI, Downes S, Perry CC, Caballero AM. Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:731-35.
32. Kang YM, Kim KH, Seol YJ, Rhee SH. Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method. *Acta Biomater* 2009;5:462-69.
33. Varanasi VG, Saiz E, Loomer PM, Ancheta B, Uritani N, Ho SP, Tomsia AP, Marshall SJ, Marshall GW. Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass (SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO-K₂O-Na₂O system) ions. *Acta Biomater* 2009;5:3536-47.
34. Sun J, Wei L, Liu X, Li J, Li B, Wang G, Meng F. Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate coating on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression. *Acta Biomater* 2009;5:1284-93.
35. Darimont C, Avanti O, Tromvoukis Y, Vautravers-Leone P, Kurihara N, Roodman GD, Colgin LM, Tullberg-Reinert H, Pfeifer AM, Offord EA, Mace K. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype. *Cell Growth Differ* 2002;13:59-67.
36. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids-old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol* 2007;83:849-71.
37. Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, Harris SA, Bolander ME, Spelsberg TC. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation *in vivo* and karyotype analysis using multicolour fluorescent in situ hybridization. *J Cell Biochem* 2002;87:9-15.
38. Bombonato-Prado KF, Bellesini LS, Junta CM, Marques MM, Passos GA, Rosa AL. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:401-08.
39. Howes AL, Chiang GG, Lang ES, Ho CB, Powis G, Vuori K, Abraham RT. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2505-14.
40. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008;3:1172-84.
41. Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* 2007;28:1653-63.