

INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE ET MECANOTRANSDUCTION

M. Cruel, K. Pernelle, O. Pollet, P. Bequart, M. Bensidhoum, P. Jurdic, **T. Hoc**,

LTDS UMR 5513, Ecole Centrale de Lyon, 36 av Guy de Collongues, 69134 Ecully, : magali.cruel@ec-lyon.fr, kelig.pernelle@ec-lyon.fr, ophelie.pollet@ec-lyon.fr, thierry.hoc@ec-lyon.fr

B2OA UMR 7052 Université Paris Diderot, 10 avenue de Verdun, 75020 Paris, pierre.bequart@paris7.jussieu.fr , morad.bensidhoum@paris7.jussieu.fr

Mots clés : Ingénierie tissulaire, Mécanotransduction, Cellule souches, ostéoclastes, bioréacteur.

1. INTRODUCTION

L'ingénierie tissulaire est une très jeune discipline scientifique. Même si l'idée de maintenir des organes en culture ex vivo avait été évoquée dans un ouvrage intitulé « The culture of organs » écrit par Alexis Carrel et Charles A. Lindbergh en 1938, la notion d'ingénierie tissulaire en elle-même est apparue au début des années 1980, après un temps nécessaire d'accumulation de connaissances sur les cultures cellulaires et la biologie cellulaire et de développement des biomatériaux. Le principe général de l'ingénierie tissulaire a été établi par R. Langer et J.P. Vacanti (1993) dans une publication intitulée « Tissue Engineering »: développer in vitro au sein de bioréacteurs des greffons visant à remplacer partiellement ou entièrement des organes défaillants. Depuis, le développement de cette discipline et la recherche sur ce sujet ont connu une croissance exponentielle, Le concept de l'ingénierie tissulaire est basé sur une idée à la fois originale et durable : l'utilisation des cellules d'un patient pour créer le greffon dont il a besoin. L'implant est composé d'un biomatériau bio-inerte et biodégradable et de cellules autologues et constitue ainsi en quelque sorte l'autogreffe idéale, dans le sens où non seulement la greffe est autologue mais aussi aucun prélèvement, hormis celui des cellules, n'est nécessaire.

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire osseuse, les premiers bioréacteurs ont été développés dans les années 1990 en vue de créer des greffons capables de combler des défauts osseux de grande taille. Les greffons sont composés de cellules souches mésenchymateuses (CSM),ensemencées sur un biomatériau et cultivées dans un environnement tridimensionnel adapté. L'amélioration progressive des connaissances sur le sujet de la mécanotransduction, processus par lequel les cellules s'adaptent à leur environnement mécanique, a conduit à l'introduction de contraintes mécaniques au cours des cultures d'ingénierie tissulaire. En effet, les cellules osseuses, in vivo, sont sensibles aux contraintes mécaniques et s'y adaptent, via le phénomène de remodelage osseux. Cette sensibilité aux contraintes mécaniques représente une opportunité pour l'ingénierie tissulaire osseuse, de créer plus rapidement des greffons plus homogènes et mieux aptes à s'intégrer in vivo. Les pistes de recherche sont encore nombreuses dans ce domaine. La connaissance de la biologie cellulaire et du comportement des cellules face à des stimuli externes peut encore progresser. Cela permettra l'optimisation des bioréacteurs en termes de biomatériaux, de stimulation mécanique, de reproductibilité, ... Pour faciliter ces progrès expérimentaux, les simulations numériques sont de plus en plus répandues dans le but de modéliser les bioréacteurs et de caractériser les contraintes mécaniques appliquées aux cellules, voire même de simuler leur ensemencement, leur consommation de nutriments et leur production de matrice extracellulaire. L'objectif de cet exposé est double : i) Etudier la mécanosensibilité des cellules souches mesenchymateuses et des ostéoclastes qui entrent dans les mécanismes de formation et dégradation osseuse ii) Exploiter cette mécanosensibilité pour améliorer le design des bioréacteurs.

2. ETAT DE L'ART

2.1 La mécanotransduction à plusieurs échelles du tissu osseux

L'adaptation de l'os à son environnement mécanique a été évoquée pour la première fois par Wolff en 1892, sous la forme de ce qu'on appelle la loi de Wolff : « L'os d'une personne ou d'un animal sain s'adapte aux chargements mécaniques auxquels il est soumis ». A l'échelle macroscopique, les effets de la mécanotransduction ont été observés depuis les années 1970. Les observations les plus marquantes concernent les astronautes de retour d'un séjour prolongé en apesanteur. La masse et la densité osseuses diminuent fortement, en raison d'une inhibition de la formation osseuse (Morey et al 2009). De tels effets sont également observés à moindre échelle sur des patients alités sur une longue période (Zerwekh et al. 1998). Inversement, les sportifs de haut niveau développent une masse osseuse plus importante (Basseyet al 1994, Haapasalo et al 2000). Ceci est la preuve que les sollicitations mécaniques des cellules osseuses modifient leur activité, avec des résultats visibles à l'échelle macroscopique. En revanche, les mécanismes de cette mécanotransduction à l'échelle microscopique sont encore en cours d'investigation.

La mécanotransduction concerne l'ensemble des cellules osseuses (CSM, Ostéoclastes, Ostéoblastes, ostéocytes). En ce qui concerne la perception d'un chargement mécanique, les ostéocytes semblent être les meilleurs candidats. Ceux-ci sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse. Le corps cellulaire se trouve dans une lacune ostéocytaire de la matrice osseuse. Ces cellules présentent également des prolongements dans les canalicules de cette même matrice. C'est via ces canalicules que les cellules sont en contact les unes avec les autres, formant ainsi un réseau tridimensionnel de mécano-perception et de communication (Burger et al 1999). Un chargement mécanique de l'os engendre une circulation du fluide interstitiel dans les canalicules au sein de la matrice osseuse. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les ostéocytes soumis à un chargement mécanique augmentent leur activité métabolique (Bonewald 2006). Les ostéocytes établissent ensuite probablement une communication moléculaire, engendrant un recrutement d'ostéoclastes puis une activité de résorption/apposition d'os. Cependant, les mécanismes réels de cette action mécanique transformée en signal moléculaire et cellulaire ne sont encore que partiellement élucidés.

Lorsqu'une cellule est soumise à des contraintes mécaniques, une chaîne de réactions biologiques est mise en action. Pour observer ces effets, les cellules sont cultivées *in vitro* en monocouche et soumises à des contraintes mécaniques, le plus souvent de cisaillement. Ces mécanismes de réaction à un stimulus mécanique sont extrêmement nombreux, variés et interdépendants, mais on peut tout de même présenter les phénomènes suivants, observés et décrits dans la littérature :

– Production de monoxyde d'azote (NO) immédiatement après un cisaillement, par les ostéoblastes (Smalt et al 1997) et les CSM (Bakker et al 2001, Rubin et al 2003).

– Production de prostaglandines. Le cisaillement induit par la circulation d'un fluide sur des cellules osseuses induit la production et le relargage de PGE2 *in vitro* (Smalt et al 1997, Bakker et al 2001, Bakker et al 2003). Les prostaglandines facilitent tous les processus de la formation osseuse lors du chargement mécanique de l'os (Vance et al 2005).

– Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'ostéogénèse. On distingue les gènes à réponse précoce (PTGS2, EGR1 et IER3) ; et les gènes à réponse plus tardive (HIF1, VEGF, ITGB1, PTGES, HIF, ALP, OPN) (Ajubi et al 1999, You et al 2001, Donahue et al 2003).

Si la mécanosensibilité des CSMs, ostéoblastes ou ostéocytes n'est plus à démontrer ce n'est que très récemment (Labernadie et al. 2014) que les podosomes qui sont les structures composant les ostéoclastes sont apparus comme mécanosensibles. De plus, la nature de la sollicitation mécanique (cisaillement, compression) est souvent peu étudiée.

2.2 L'ingénierie tissulaire comme réponse à la problématique des grands défauts osseux

Lorsqu'un défaut osseux de petite taille apparaît au sein du tissu osseux, celui-ci est réparé naturellement et automatiquement par l'organisme. Lorsqu'un défaut osseux est de taille trop élevée, il n'y a pas de réparation. Ces défauts peuvent apparaître lors d'un traumatisme, ou bien consécutivement à un curetage pour enlever une tumeur ou un kyste. Dans ce cas, il y a nécessité d'intervention humaine pour combler le défaut. Le nombre annuel de greffes osseuses dans le monde s'élève à plus de 2 millions, faisant de l'os le deuxième tissu le plus transplanté après le sang. Actuellement, le traitement le plus utilisé dans ce cas-là est l'autogreffe. Un morceau d'os est prélevé, le plus souvent au niveau de la crête iliaque de l'os du bassin, puis réimplanté au niveau du défaut. Cela permet le comblement du défaut en prélevant du tissu à un endroit où le chargement mécanique est faible. Une telle greffe présente tous les éléments nécessaires à une bonne réparation osseuse : une matrice minéralisée et des cellules ostéocompétentes. Cette technique présente l'avantage évident d'éviter tout risque de rejet par le caractère autologue de la greffe. Ce traitement présente toutefois des inconvénients majeurs, qui motivent des recherches de techniques alternatives. En effet, la chirurgie est double donc plus longue, plus complexe et plus risquée. De plus, le nombre de sites où il est possible de prélever de l'os sans perte de fonctionnalité est limité et il est compliqué de faire une greffe efficace dans le cas d'un défaut à forme irrégulière. Enfin, les complications post-opératoires sont assez fréquentes (10% des cas) : infections, fractures, douleur, paresthésie, dommage nerveux et morbidité du site donneur (Mistry et al 2005). Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire peut être considérée comme une alternative prometteuse, permettant la création de matériaux ostéogènes à partir de biomatériaux ostéoconducteurs et de cellules ostéocompétentes.

Le principe est d'utiliser des cellules souches d'un patient, de les cultiver in vitro dans des conditions adéquates sur le plan de l'environnement tridimensionnel (support de la culture, apport en nutriments et en oxygène, évacuation des déchets et sollicitations mécaniques et électriques) pour en former un greffon de dimension, de composition et de structure maîtrisées, que l'on peut alors réimplanter sans risque de rejet. La majeure partie de ces cultures se déroulent dans un bioréacteur à perfusion, dispositif qui permet le contrôle des paramètres environnementaux cités ci-dessus et notamment l'environnement mécanique tridimensionnel.

Toutes les études ayant testé des environnements mécaniques différents à partir de flux différents au sein des bioréacteurs rapportent des effets bénéfiques du flux par rapport à une condition statique, et d'un flux plus élevé par rapport à un flux plus faible (Grayson et al 2008, Bancroft et al 2002, Sikavitsas et al 2003, McCoy et al 2012), jusqu'à un certain seuil où celui-ci devient délétère (Cartmell et al 2003). Une augmentation du flux à viscosité constante (en gardant le même milieu de culture), augmente nécessairement le transport de masse et les échanges nutriments/déchets, ce qui peut être la cause des effets positifs sur la prolifération et la minéralisation. Pour vérifier ce point, Sikavitsas et al. (2003) ont mis au point des expériences à flux constant (transport de masse constant) et à viscosité différente (cisaillement différent) en ajoutant au milieu une substance plus visqueuse mais inerte biologiquement parlant. Cette étude a révélé que c'était bien le stimulus mécanique de cisaillement qui avait des effets positifs sur l'activité des cellules. D'autres études se sont portées sur l'influence de la géométrie des pores ou de la géométrie des scaffolds utilisés. Les résultats montrent une forte dépendance du cisaillement et donc de la réponse cellulaire à la distribution des pores (Olivares et al 2009), la forme du scaffold (Guttierez et al 2008), la porosité et la taille des pores (McCoy et al 2012, Mastrogiacomo et al 2006, Voronov et al 2010) et même la courbure des pores (Rumpler et al 2008).

Récemment, un nouveau type de scaffold a commencé à être utilisé et étudié depuis 2006 : les scaffolds granulaires, parfois aussi appelés scaffolds modulaires. Il s'agit d'utiliser des particules de biomatériaux, de taille millimétrique, dont l'empilement forme un scaffold. L'ensemencement est facilité puisqu'il peut être réalisé au préalable de la culture en bioréacteur sans nécessiter une perfusion à travers des pores étroits. De plus, ce type de scaffolds présente l'avantage de pouvoir être modulé. Grâce à leur caractère granulaire, il est possible de combler des défauts de n'importe quelle forme et taille, sans avoir un besoin préalable de concevoir une géométrie précise du biomatériau. Ces nouvelles géométries de scaffolds ont déjà été utilisées avec l'ensemble des biomatériaux habituellement utilisés en ingénierie tissulaire osseuse : céramique synthétique (Janssen et al 2006), corail [David et al 2011, Viateau et al 2007], polymère (Orr et al 2008, Yeats et al 2011). Lors d'études d'implantation in vivo, de bons résultats ont été obtenus en termes de minéralisation et

d'ostéointégration (Janssen et al 2006, Viateau et al 2007) mais les contraintes mécaniques dans ce type d'empilement sont inconnues.

3. TRAVAUX PERSONNELS : AVANCEES

3.1 Mécanosensibilité des ostéoclastes humains

D'un point de vue biologique l'ostéoclaste est de mieux en mieux connu. Ces cellules dérivent de cellules souches hématopoïétiques qui une fois recrutées sur zone, sont capables de fusionner entre elles, pour finalement se différencier en cellules polarisées aptes à la résorption. Cependant l'ensemble des travaux menés in vitro sont réalisés sur des supports modèles comme la dentine ou le tissu osseux bovin dont la microstructure est assez éloignée de celle du tissu humain.

Dans ce contexte, pour la première fois nous avons étudié le rôle de la microstructure osseuse humaine sur l'activité ostéoclastique. Des ostéoclastes humains sont cultivés sur des tissus osseux humains et l'effet de l'hétérogénéité mécanique et chimique de l'os sur le volume de résorption est déterminé. La figure 1 montre une microstructure typique d'os cortical humain après résorption. Clairement, la résorption est corrélée avec le contour des ostéons qui définissent des propriétés matériaux différentes.

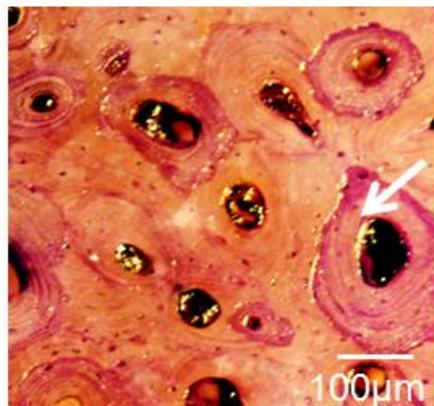


Figure 1. Effet de l'anisotropie biomécanique et biochimique de l'os humain sur la réponse des ostéoclastes. Image obtenue après résorption de la surface osseuse au bout de 72h de culture. Les échantillons sont colorés par du bleu de toluidine.

L'analyse des propriétés biomécaniques et biochimiques de ces ostéons par des analyses de nanoindentation, et micro spectroscopie Raman font ressortir des caractéristiques très spécifiques des zones résorbées.

3.2 Mécanotransduction des CSMs humaines

Afin de déterminer et de comparer les réponses précoces de CSM humaines (cultivées en monocouches sur des plaques planes en polystyrène) lorsque ces cellules sont exposées soit à un cisaillement soit à une compression hydrostatique un dispositif de compression hydrostatique a été développé. A partir du système commercial IBIDI permettant d'appliquer un stimulus de cisaillement la réponse de la protéine ERK1/2 a été étudiée. ERK1/2 est une protéine présente dans le cytoplasme qui s'active lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée à la cellule. Cette activation se traduit par une phosphorylation et participe à la mécanotransduction cellulaire,

spécifiquement à la traduction de signaux mécaniques en signaux biologiques intracellulaires qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire.

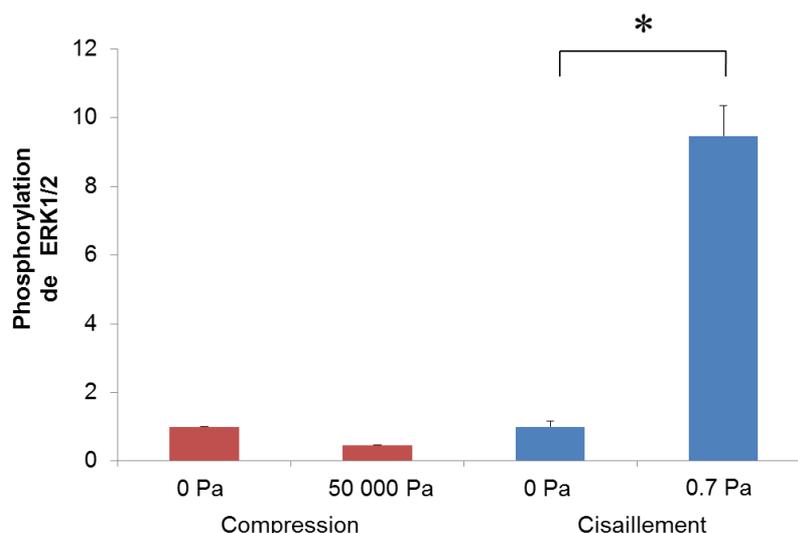


Figure 2. Comparaison de la réponse des CSM humaines à une sollicitation de compression ou de cisaillement de niveau caractéristique de l'in-vivo

La figure 2 montre une modification significative du niveau de phosphorylation de ERK1/2 lorsque les cellules sont soumises à un cisaillement de 0.7 Pa pendant 30 min. Le niveau de phosphorylation de ERK1/2 phosphorylé n'a pas été modifié par l'application d'une pression de 50 000 Pa pendant 30 minutes.

3.3 Apport de la mécanique dans le développement de bioréacteurs granulaires

Afin d'exploiter au maximum l'effet du cisaillement, une modélisation éléments finis d'un bioréacteur granulaires a été effectuée pour deux flux de stimulation. Les bioréacteurs sont des cylindres de Plexiglas et sont remplis de particules de corail sur lesquelles les CSM sontensemencées. Un système de réservoirs de milieu de culture, tubulures et pompes péristaltiques permet la circulation du milieu de culture de bas en haut à travers les empilements de particules, apportant ainsi aux cellules une stimulation mécanique.

La figure 3a montre le cisaillement aux parois obtenu pour un empilement de billes à 50 mL/min et à 150 mL/min (Cruel et al 2015). On constate clairement une augmentation des contraintes avec le flux et un niveau de contrainte de cisaillement proche du Pa pour un flux de 150mL/min.

Afin de quantifier expérimentalement l'effet bénéfique potentiel d'un tel flux, l'expression du gène PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2) a été évaluée et apparaît très fortement augmentée par l'application du flux de 150 mL/min. (figure 3b). Ce gène est impliqué de manière critique dans la réparation de fracture osseuse in vivo (Tjabringa et al 2006) et il a été montré que son expression par des CSM issues de pulpe dentaire humaine est régulée par du cisaillement (Kraft et al 2010).

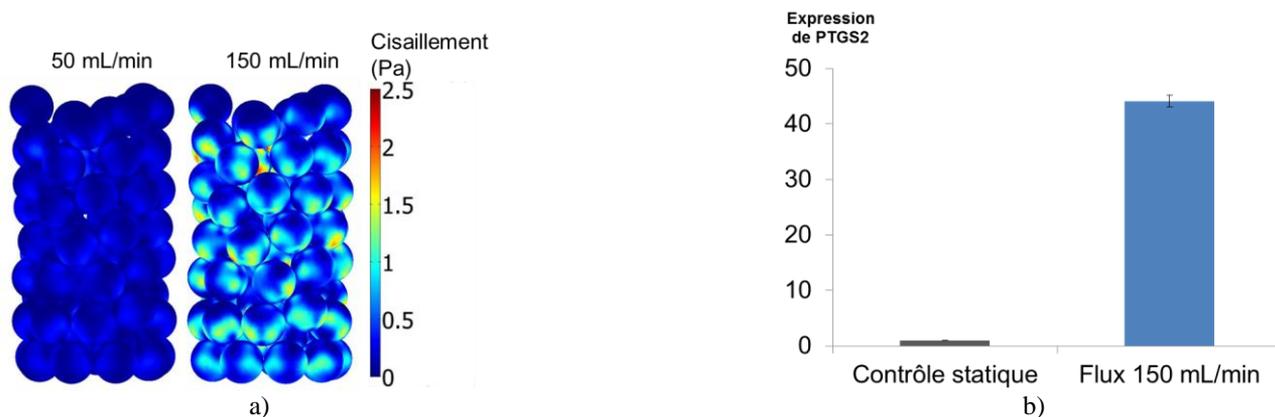


Figure 3. a) Modélisation numérique d'un bioréacteur granulaire à perfusion. : Cisaillement aux parois obtenu pour un empilement de billes à 50 mL/min et à 150 mL/min. Le fluide circule de bas en haut à travers l'empilement. b) Expression relative du gène *PTGS2* en statique (contrôle normalisé à 1) et avec un flux de 150 mL/min appliqué 3 fois pendant 30 minutes, par les CSM cultivées en bioréacteur sur des billes, mesurée par une technique de RT-PCR.

4. CONCLUSIONS PERSPECTIVES

En conclusion, la mécanosensibilité des cellules osseuses est un enjeu important dans le développement de l'ingénierie tissulaire. Une meilleure intégration de ces phénomènes dans la conception des bioréacteurs devrait permettre une meilleure reproductibilité et accélérer les processus de reconstruction. De plus, l'interaction cellule/environnement et notamment la prise en compte de l'hétérogénéité osseuse est certainement un élément clé dans les futurs développements. La difficulté majeure réside dans la faculté de fournir un microenvironnement le plus bio fidèle possible. Dans ce contexte, les perspectives de co-cultures (CSM, ostéoclastes) qu'elles soient directes ou à travers des actions séquentielles portées par les milieux de cultures, sont des perspectives innovantes qui permettront de s'approcher au mieux des conditions in-vivo.

REFERENCES

- Ajubi, N.E., Klein-Nulend, J., Alblas, M.J., Burger, E.H., Nijweide, P.J. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE(2) production by cultured osteocytes. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* 276, E171, 1999.
- Bakker, A.D., Soejima, K., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent. *Journal of biomechanics* 34, 671, 2001.
- Bakker, A.D., Joldersma, M., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. Interactive effects of PTH and mechanical stress on nitric oxide and PGE(2) production by primary mouse osteoblastic cells. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* 285, E608, 2003.
- Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., van den Dolder, J., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., Mikos, A.G. 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* 99, 12600, 2002.
- Bassey, E.J., Ramsdale, S.J. Increase in femoral bone-density in young-women following high-impact exercise. *Osteoporosis international* 4, 72, 1994.
- Bonewald, L.F. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey osteovision* 3, 7, 2006.
- Burger, E.H., Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone – role of the lacunocanalicular network. *The FASEB journal* 13, S101, 1999.
- Cartmell, S.H., Porter, B.D., Garcia, A.J., Guldborg, R.E. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Engineering* 9, 1197, 2003.

- Cruel, M. Bensidhoum, M., Nouguiet-Lehon, C., Dessombz, O, Becquart, P., Petite, H., Hoc, T. Numerical Study of Granular Scaffold Efficiency to Convert Fluid Flow into Mechanical Stimulation in Bone Tissue Engineering part C Methods 21, 863, 2015.
- David, B., Bonnefont-Rousselot, D., Oudina, K., Degat, M.C., Deschepper, M., Viateau, V., Bensidhoum, M., Oddou, C., Petite, H. A perfusion bioreactor for engineering bone constructs: an in vitro and in vivo study. Tissue Eng Part C Methods 17, 505, 2011.
- Donahue, T.L.H., Haut, T.R., Yellowley, C.E., Donahue, H.J., Jacobs, C.R. Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport. J of Biomech 36, 1363, 2003.
- Grayson, W.L., Bhumiratana, S., Cannizzaro, C., Grace Chao P.H., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Vunjak-Novakovic G. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. Tissue Engineering : part A 14, 1809, 2008.
- Gutierrez, R.A., Crumpler, E.T. Potential effect of geometry on wall shear stress distribution across scaffold surfaces. Annals of biomedical engineering 36, 77, 2008.
- Haapasalo, H., Kontulainen, S., Sievanen, H., Kannus, P., Jarvinen, M., Vuori, I. Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change of volumetric bone density : A peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players. Bone 27, 351, 2000.
- Janssen, F.W., Oostra, J., van Oorschot, A., van Blitterswijk, C.A. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone : In vivo bone formation showing proof of concept. Biomaterials 27, 315, 2006.
- Kraft, D.C.E., Bindsvlev, D.A., Melsen, B., Abdallah, B.M., Kassem, M., Klein-Nulend, J. Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity. European Journal of Oral Sciences 118, 29, 2010.
- Labernadie A, Bouissou A, Delobelle P, Balor S, Voituriez R, Proag A, Fourquaux I, Thibault C, Vieu C, Poincloux R, Charrière GM and Maridonneau-Parini I. Protrusion Force Microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. Nature Communications (2014)
- Langer, R., Vacanti, J.P. Tissue Engineering. Science 260, 920, 1993.
- McCoy, R.J., Jungreuthmayer, C., O'Brien, F.J. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. Biotechnol Bioeng 109, 1583, 2012.
- Mastrogiacomo, M., Scaglione, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Beltrame, F., Cancedda, R., Quarto, R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. Biomaterials 27, 3230, 2006.
- Mistry, A.S., Mikos, A.G. Tissue engineering strategies for bone regeneration. Adv Biochem Engin/Biotechnol 34, 1, 2005.
- Morey, E.J., Baylink, D.J. Inhibition of bone formation during space flight. Science 201, 1138, 1978.
- Olivares, A.L., Marshal, E., Planell, J.A., Lacroix, D. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. Biomaterials 30, 6142, 2009.
- Orr, D.E. and Burg, K.J.L. Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications. Ann Biomed Eng 36, 1228, 2008
- Rubin, J., Murphy, T.C., Zhu, L.P., Roy, E., Nanes, M.S., Fan, X. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. Journal of biological chemistry 278, 34018, 2003.
- Rumpler, M., Woesz, A., Dunlop, J.W.C., van Dongen, J.T., Fratzl, P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. Journal of the royal society Interface 5, 1173, 2008.
- Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Holtorf, H.L., Jansen, J.A., Mikos, A.G. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 14683, 2003.
- Smalt, R., Mitchell, F.T., Howard, R.L., Chambers, T.J. Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. Am J Physiol Endocrinol Metab 273, E751, 1997.
- Tjabringa, G.S., Vezeridis, P.S., Zandieh-Doulabi, B., Helder, M.N., Wuisman, P.I.J.M., Klein-Nulend, J. Polyamines modulate nitric oxide production and COX-2 gene expression in response to mechanical loading in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 24, 2262, 2006.
- Vance, J., Galley, S., Liu, D.F., Donahue, S.W. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. Tissue Engineering 11, 1832, 2005.

- Viateau, V., Guillemin, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avromoglou, D., Petite, H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts : A study on sheep. *Journal of orthopaedic research* 25, 741, 2007.
- Voronov, R., VanGordon, S., Sikavitsas, V.I., Papavassiliou, D.V. Computational modeling of flow-induced shear stresses within 3D salt-leached porous scaffolds imaged via micro-CT. *Journal of biomechanics* 43, 1279, 2010.
- Wolff, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1892. Traduction anglaise : Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1986.
- Yeatts, A.B. and Fisher, J.P. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 337, 2011.
- You, J., Reilly, G.C., Zhen, X.C., Yellowley, C.E., Chen, Q., Donahue, H.J., Jacobs, C.R. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of biological chemistry* 276, 13365, 2001.
- Zerwekh, J.E., Ruml, L.A., Gottschalk, F., Pak, C.Y.C. The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *Journal of bone and mineral research* 13, 1594, 1998.
- Gens A., Alonso E. E. et Hight D. W., "Special problem soils: general review", *Int. J. of Something*, **35**, 2, (2004), pp. 152-859.
- Wu Y. & Zhong X., "The mathematics of telephone numbers", *Annals of Improbable Research*, **1**, 5, (1995), pp. 162-163.