



*Société Française de Biologie  
des Tissus Minéralisés*

## 21<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés

Chambre de Commerce et d'Industrie de  
Boulogne sur Mer  
5-7 Juin 2019, Boulogne sur Mer



Chers Collègues et Amis,

Nous sommes particulièrement heureux de vous accueillir à l'occasion des 21<sup>èmes</sup> JFBTMs qui ont lieu à Boulogne-sur-mer. Cette ville qui accueillit jadis Napoléon Bonaparte, accueille un des sites de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) aussi présente sur Dunkerque, Saint-Omer et Calais.

Boulogne sur Mer est la première plateforme européenne de transformation des produits de la pêche et possède une très ancienne activité de pêche en mer. La ville bénéficie aussi d'un environnement côtier remarquable avec à proximité des sites exceptionnels et des petits villages de pêcheurs qui ont su conserver leur authenticité et leur douceur de vivre. Dans la ville elle-même vous pourrez profiter du centre de la mer Nausicca, très récemment agrandi et qui offre aux yeux des visiteurs une diversité impressionnante d'espèces marines provenant des quatre coins du monde. Vous l'aurez compris, si vous avez prévu de prolonger votre séjour, Boulogne-sur-mer et ses environs offrent de très beaux lieux de visite. Nous vous conseillons d'aller visiter le Cap Gris-Nez et le Cap Blanc-Nez qui sont magnifiques en cette période et offrent une vue surprenante sur les côtes anglaises. Vous pourrez aussi simplement profiter de promenades les pieds dans l'eau le long de la côte. Les amateurs de pierres anciennes pourront aussi « monter à la vieille ville », en faire le tour sur ses remparts qui offrent un point de vue sur l'ensemble de la ville et la mer, et flâner dans ses ruelles chargées d'histoire.

Le congrès se déroule à la Chambre du Commerce et de l'Industrie de Boulogne sur Mer, en bordure de la Liane, la rivière qui longe la partie basse de la ville. La soirée de gala se déroule devant le plus grand aquarium d'Europe à Nausicca, lequel sera privatisé à cette occasion.

Grâce à vous, nous avons préparé un programme qui, nous l'espérons, sera à la hauteur de vos attentes. Ainsi, nous aurons le privilège d'accueillir 5 conférenciers prestigieux qui nous feront partager leurs connaissances et leurs dernières avancées dans leurs domaines d'expertise respectifs. Comme tous les ans, les jeunes chercheurs seront également mis en valeur en présentant leurs travaux sous forme de communications orales et affichées sélectionnées parmi les résumés soumis à notre conseil scientifique. Pendant le congrès, le Conseil Scientifique de la SFBTM et le jury de post-doctorants volontaires attribueront des prix aux meilleures des communications orales et affichées.

Nous vous souhaitons un excellent congrès et un très bon séjour à Boulogne-sur-mer.

Le comité d'organisation

Christophe Chauveau et Guillaume Penel

## REMERCIEMENTS

Le comité d'organisation adresse ses remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui nous ont aidés et soutenus dans l'organisation de cette 21<sup>ème</sup> édition des JFBTMs.

Nous remercions tout d'abord nos partenaires : L'université de Littoral Côte d'Opale, la Chambre du Commerce et de l'Industrie de Boulogne-sur-mer, la Communauté d'Agglomération du Boulonnais et Nausicaa.

Nous remercions pour leur contribution particulière et leur fidélité dans l'organisation de ces journées la Fondation ARTHRITIS, la société Peprotech, ainsi que l'association BioMat.

Nous remercions pour son soutien la société Dutscher.

Nous remercions très chaleureusement les Conférenciers Invités, venus d'Allemagne, du Danemark et d'Espagne, qui ont accepté de partager leurs connaissances, leur expérience et leur passion.

Nous remercions tous les membres du Conseil d'Administration qui nous ont aidés à organiser ces journées, les membres du Conseil Scientifique pour leur participation à l'évaluation des résumés et en association avec les membres du jury « post-doc » pour leur implication dans la sélection des communications primées.

Enfin, nous remercions également tous les membres du PMOI EA4490 qui nous ont aidés dans l'organisation de ces journées.

## PARTENAIRES ET SPONSORS



## INFORMATIONS PRATIQUES

### CONGRES

Le congrès se déroule dans la Chambre du Commerce et de l'Industrie (CCI) au 98 Boulevard Gambetta, 62200 Boulogne-sur-Mer. Les pauses repas auront lieu dans la salle de réception de la CCI. Le port du badge est obligatoire pendant toute la durée du congrès et pour accéder aux repas et à la soirée.

### ORAUX ET AFFICHES

Afin de faciliter l'organisation et le bon déroulement des sessions orales, les orateurs sont priés de déposer leurs fichiers au plus tard pendant la pause précédant leur session et de visualiser rapidement leurs diapositives à ce moment.

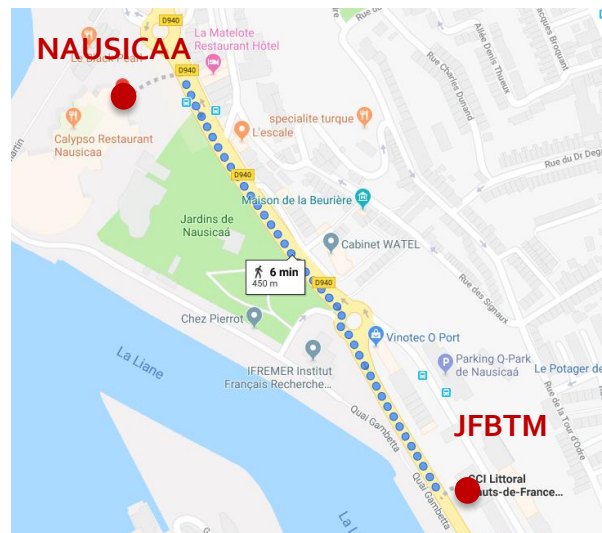
Afin de favoriser les échanges, les affiches devront être mises en place au plus tard le mercredi avant 15h45 et retirée à partir du vendredi 11h.

### DEJEUNERS « MENTORING »

La pause déjeuner de jeudi midi sera l'occasion pour les étudiants et post-doctorants de profiter de l'expérience et de la bienveillance des plus expérimentés, sur les thèmes plébicités par les intéressés.

### SOIREE DE GALA A NAUSICAA

La soirée de Gala a lieu le Jeudi 6 Juin à Nausicaà, Boulevard Sainte-Beuve 62200 Boulogne-sur-mer. Nausicaà est accessible à pieds (6 min) du site du congrès. Nausicaà a été privatisé pour une durée de 4h, de 19h30 à 23h30. Ne soyez pas en retard pour en profiter. Le port du badge est obligatoire pendant la soirée.



## COMITE D'ORGANISATION

Christophe CHAUVEAU  
Guillaume PENEL

### CONSEIL D'ADMINISTRATION

Jérôme GUICHEUX, président  
Sylvie TAMBUTTE, vice présidente  
Yohann WITTRANT, trésorier  
Catherine CHAUSSAIN, trésorier adjoint  
Claudine BLIN-WAKKACH, secrétaire  
Said KAMEL, secrétaire adjoint  
Laurent BECK, webmaster  
Georges CARLE  
Christophe CHAUVEAU  
Joël GAUTRON  
Hervé KEMPF

### CONSEIL SCIENTIFIQUE

Carole BOUGAULT, ICBMS, UMR5246 Lyon  
Marlène GALLET, MP3CV, UMR1088 Amiens  
PHILIPPE GANOT, CSM, MONACO  
Marjolaine GOSSET, EA2496, Montrouge  
Halima KERJOUJ, EA4691 BIOS, REIMS  
Delphine LOGEART, B2OA UMR7052, Paris  
Delphine MAUREL, BIOTIS, Bordeaux  
David MOULIN, IMOPA, Nancy  
OLIVIER PEYRUCHAUD, LYSBONE, INSERM UMR1033, LYON  
Valérie TRICHET, PHY-OS UMR1238 Nantes  
Claire VINATIER, RMES UMR1229, Nantes

### JURY POST-DOC

Caroline ANDRIQUE  
DIANA SILVA  
LUCIE HENAUT  
Pierre GUIHARD  
Volha ZHUKOUSKAYA

### SOUTIEN LOGISTIQUE PMOI

Hamanou BENACHOUR  
Odile BROUX  
Guillaume FALGAYRAC  
Anne GALET  
Véronique GAUTHIER  
Olfa GHALI  
Marie France LOUCHET  
Flore MIELLOT

### SOUTIEN LOGISTIQUE SFBTM

Claudine BLIN  
Laurent BECK  
Yohann WITTRANT

## CONFERENCIERS INVITES

Aline BOZEC, Department of Rheumatology and Immunology, Erlangen, Germany  
Beatriz CARAMÉS, Cartilage Biology Group, Coruña, Spain  
Moustapha KASSEM, Molecular Endocrinology & Stem Cell Research Unit (KMEB), Odense, Denmark  
Adeline LE CABEC, Human Evolution, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany  
W.E.G. MÜLLER, ERC Advanced Investigator Grant Research Group at the Institute for Physiological Chemistry, Mainz, Germany

# PROGRAMME SCIENTIFIQUE

Mercredi 5 Juin 2019

12h30-13h30 Accueil des participants

13h45-14h00 Allocution de bienvenue (salle de conférences)

## Session I : salle de conférences

Modérateurs : Catherine CHAUSSAIN et Said KAMEL

14h-14h45 Conférence plénière 1 : Adeline LE CABEC (Human Evolution, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany)  
*Les tissus dentaires : archives de notre évolution. Développement dentaire, histoire de vie et techniques d'imagerie synchrotron*

14h45 O1 Lilian STAPANE (BOA, INRA, Université de Tours, Nouzilly)  
*Mise en évidence de vésicules extracellulaires impliquées dans la biominéralisation de la coquille d'oeuf de poule*

15h00 O2 Hawa CINAR (INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE St Etienne)  
*L'extinction génique (KO) de la sialoprotéine osseuse (BSP) entraîne une surexpression intestinale de la dentin matrix protein 1 (DMP1) et un profil de déficit d'absorption du phosphate*

15h15 O3 Robin CAIRE (INSERM U1059-SAINBIOSE, Université de Lyon, Saint-Etienne, France)  
*YAP/TAZ est actif dans l'arthrite et son inhibition dans les synoviocytes restaure un phénotype normal*

15h30 O4 David MAGNE (ICBMS, UMR CNRS 5246, Lyon)  
*Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory ectonucleotidase*

15h45-16h45 Pause café et session posters - N° impairs (salle de réception)

## Session II : salle de conférences

Modérateurs : Hervé KEMPF et Yohann WITTRANT

16h45 O5 Natalia ZAPATA-LINARES (Centre de Recherche Saint Antoine-UMRS 938, Paris)  
*Implication of bone marrow adipose tissue in bone homeostasis during osteoarthritis*

17h00 O6 Souvik DAS (MP3CV University Centre for Health Research, Amiens, France)  
*The calcium sensing receptor in breast cancer and bone metastasis: a new dawn for calcilytics*

17h15 O7 Sophie MAILLARD (EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge)  
*Impact de l'inhibition de la sclerostine sur la régénération osseuse crânio-faciale dans un modèle murin.*

17h30 O8 Caroline ANDRIQUE (EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge)  
*Vasorin modulates bone remodeling by regulating osteoclast activity*

18h00-19h30 Assemblée Générale (salle de conférences)

Jeudi 6 Juin 2019

## Session III : salle de conférences

Modérateurs : Claire BARDET et Claudine BLIN

8h30-9h15		Conférence plénière 2 : Aline BOZEC (Department of Rheumatology and Immunology, Erlangen, Germany) <i>High fat diet and microbiota control the bone marrow niche and hematopoietic stem cell differentiation</i>
9h15	O9	Dorothée GIRARD (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, INSERM UMRS-MD 1197, Clamart, France) <i>Macrophage-derived inflammation promotes heterotopic ossification in polytrauma patients by driving muscle stem cells towards osteoblastic differentiation</i>
9h30	O10	Mélanie DHAYER (INSERM U1059 LBTO St Etienne) <i>La memoire mecanique des cellules souches squelettiques humaines (hcss) conditionne leur réponse aux signaux adipogeniques lors de la mission spatiale invitrobone</i>
9h45	O11	Sandy RIBES (EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge) <i>The absence of claudin-10 in ameloblasts impairs amelogenesis</i>
10h00	O12	Xavier COUTEL (PMOI – EA 4490, Lille) <i>Mandibular bone is protected against microarchitectural alterations and bone marrow adipose conversion in ovariectomized rats</i>
10h15-11h15		Pause café et session posters - N° impairs (salle de réception)
Session IV : salle de conférences		
Modérateurs : Florence APPARAILLY et Laurence LEGEAI-MALLET		
11h15	O13	Philippe GANOT (Centre Scientifique de Monaco, Monaco) <i>Comparative biomineralization in anthozoans: the red coral is not a reef coral</i>
11h30	O14	Mathieu MAALOUF (INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE St Etienne) <i>Impact de l'extinction genique de la sialoprotéine osseuse et/ou l'ostéopontine sur la réponse du squelette à la vibration corps entier</i>
11h45	O15	Joël GAUTRON (BOA, INRA, Université de Tours, Nouzilly) <i>Guinea fowl eggshell structural organization and particular organic matrix protein patterns to decipher its exceptional biomechanical properties</i>
12h00	O16	Emilie DAMBROISE (INSERM UMR1163, Paris) <i>FGFR3: a key regulator of zebrafish cranial vault development</i>
12h15	O17	Laura PEURIERE (INSERM, U1059, Université de Lyon, Saint-Etienne) <i>L'immobilisation partielle en condition de neutralité thermique induit une perte osseuse sans modification de l'adiposité médullaire ou des marqueurs de sénescence et d'apoptose ostéocytaire</i>
12h30-13h30		Pause déjeuner - déjeuner mentoring (salle de réception)
13h30-14h30		Session posters - N° pairs (salle de réception)



**Session V : salle de conférences**

Modérateurs : Éric HAY et Jérôme LAFONT

14h30-15h15 Conférence plénière 3: Beatriz CARAMÉS (Cartilage Biology Group, Coruña, Spain)  
*Emerging mechanisms of disease and therapeutic targets for cartilage Aging and OA*

15h15 O18 Mylène ZARKA (Inserm UMR1132, Hôpital Lariboisière and Paris Diderot University, Paris)  
*Implication de la signalisation yap/taz dans la mecanotransduction osteocytaire*

15h30 O19 Giulia FRANGI (Inserm U1229-RMeS, Nantes)  
*Altered bone marrow adiposity in pit2-deficient mice*

15h45 O20 Yohan JOUAN (Inserm UMR1132, Hôpital Lariboisière and Paris Diderot University, Paris)  
*Reprogrammation du chondrocyte par lin28a : application a l'arthrose*

16h00-16h45 Pause café et Session Posters - N° pairs (salle de réception)

**Session VI : salle de conférences**

Modérateurs : Morad BENSIDHOUM et Frédéric VÉLAR

16h45-17h30 Conférence plénière 4: W.E.G. Müller (ERC Advanced Investigator Grant Research Group at the Institute for Physiological Chemistry, Mainz, Germany)  
*Amorphous polyphosphate: A novel intelligent biomaterial, appropriate for the fabrication of orthopedic implants and for the encapsulation of mesenchymal stem cells*

17h30 O21 Marthe ROUSSEAU (INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE St Etienne)  
*Une supplémentation nutritionnelle en poudre de nacre accroît la masse trabéculaire osseuse chez des souris âgées*

17h45 O22 Mamadou TIDIANE DIALLO (EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge)  
*Impaired claudin-16 tight junction protein alters enamel formation through acid transcellular pathway*

18h00 O23 Jorune SAKALAUŠKAITE (University of Turin, Italy & UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Dijon)  
*"PALAEOSHELLOMICS": biomolecular identification of prehistoric pearl shell ornaments*

19h30-23h30 Soirée de gala (Nausicaa)

**Vendredi 7 Juin 2019****Session VII : salle de conférences**

Modérateurs : Laurent BECK et Sylvie TAMBUTTÉ

8h30-9h15 Conférence plénière 5 : Moustapha KASSEM (Molecular Endocrinology & Stem Cell Research Unit (KMEB), Odense, Denmark)  
*Marrow adipose tissue (MAT): lineage commitment and regulatory role in whole body energy metabolism*

- 9h15 O24 Maria-Bernadette MADEL (CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de Médecine, Nice, France)  
*Heterogeneity in inflammatory osteoclasts provokes alterations in their inflammatory phenotype and bone resorption capacity*
- 9h30 O25 Yetki ASLAN (Inserm UMR1132, Hôpital Lariboisière and Paris Diderot University, Paris)  
*PTH-induced bone anabolism promotes systemic breast cancer growth and metastasis*
- 9h45 O26 Volha ZHUKOUSKAYA (EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge)  
*Pathobiology of osteoarticular lesions and effects of conventional treatment in the murine model of x-linked hypophosphatemia*
- 10h00 O27 Alice LEROUX (Bioingénierie Tissulaire (BioTis), INSERM U1026, Université de Bordeaux, Bordeaux)  
*Évaluation of the cellular communication between the vascular and the sensory nervous systems*
- 10h15 O28 Adrienne ANGINOT (Bioingénierie Tissulaire (BioTis), INSERM U1026, Université de Bordeaux, Bordeaux)  
*Role autocrine de cxcl12 dans l'auto-renouvellement et la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses squelettiques*
- 10h30-11h00 Pause café (salle de réception)
- 11h00-11h30 Synthèse et discussion (salle de conférences)
- 11h30-11h45 Discours de clôture (salle de conférences)
- 11h45-12h30 Remise des Prix (salle de conférences)
- 12h30 Clôture du Congrès

# CONFÉRENCES PLÉNIÈRES

## **CP1 Dental tissues: archives of our evolution. Dental development, life history and synchrotron imaging techniques**

Adeline Le Cabec

Department of Human Evolution, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Deutscher Platz 6, D-04103 Leipzig, Germany

In paleoanthropology, primate fossil bones and teeth serve to reconstruct and understand the evolution, development, lifeways ("life history", e.g., age at weaning) and morphology of extinct species. Because of their high degree of mineralization, teeth preserve best in the fossil record. Even though bones and teeth grow incrementally, dental hard tissues (i.e. enamel and dentine) do not remodel. Together with cementum, they thus record their own development from birth to death, in the form of incremental growth lines. This also involves retaining chemical information about the physiology and health status over the lifetime of an individual.

Juvenile specimens are most informative as they died before completing their development and thus record the time of their death in their teeth. In enamel, two growth rhythms exist and can contribute to determine their age at death: the first has an infradian periodicity (long-period lines called "Retzius lines"), and the second has a daily periodicity ("cross-striations"). This developmental information has been long accessed using tooth thin sections (which is destructive by nature) and microscopy. When imaged on fossils, this information provides a temporal framework to recover the chronology of dental development, and by extension a broader pattern of overall growth and development, and life history of the specimen.

Yet, physical sectioning of the teeth is increasingly being avoided, to preserve unique and precious fossils. Over the last few years, the development of non-destructive X-ray synchrotron microtomography using propagation phase contrast has revealed internal tooth structure with high fidelity, including dental microstructure. The European Synchrotron (ESRF, Grenoble, France), and especially the beamline ID19, has pioneered the technical developments in this emerging field. Based on a multiscale approach, this technique can reveal incremental features in fossil teeth, including circadian increments and developmental stresses. This *non-destructive* approach considerably increases the number of fossils available for studying the dental development of extinct taxa. Virtual dental histology was first solely relying on 2D slices, but it now also fully integrates 3D aspects of the outer and inner surfaces of the teeth. This suite of 2D and 3D techniques expands the level of detail retrieved from those fossils, yielding high-profile publications on fossil hominins. These recent innovative approaches facilitate the study of large specimens (including sub-adults) with complex fossilization (diagenetic) patterns.

In addition to retrieving the temporal frame of growth, dental tissues capture a biochemical signature during their formation. This can be revealed by mapping the distribution of chemical elements of interest using synchrotron X-Ray fluorescence (SXRF). This is successfully being performed on the Po6 beamline, at the Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg, Germany). Calcium, zinc, and strontium are among the most informative elements showing variations following the growth lines and certainly reflecting the physiology and stress level of the individual during more or less traumatic events of life, such as birth, weaning, pregnancies, or changes in diet.

This is paving the way for a level of precision never reached before on exceptional fossils, which would not be possible using classical destructive histological techniques.

## CP2 High fat diet and microbiota control the bone marrow niche and hematopoietic stem cell differentiation

Yubin Luo<sup>1</sup>, Guang-Liang Chen<sup>1</sup>, Nicole Hannemann<sup>1</sup>, Natacha Ipseiz<sup>1</sup>, Gerhard Krönke<sup>1</sup>, Tobias Bäuerle<sup>2</sup>, Luis Munos<sup>1</sup>, Stefan Wirtz<sup>3</sup>, Georg Schett<sup>1</sup>, **Aline Bozec<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine 3, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany; <sup>2</sup>Department of Radiology, Preclinical Imaging, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine 1, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

The gut microbiome consists of trillions of bacteria which play an important role in human metabolism. A distortion in the normal microbial balances obesity and metabolic syndrome. Recent studies have also demonstrated that the gut microbiome affects immune response and systemic disease. However, its effect on the bone marrow microenvironment is poorly defined.

We found that microbiome shaped by high fat diet (HFD) intake can also regulate the bone marrow niche. In fact, HFD decreased long-term hematopoietic stem cell (Lin-Sca-1+c-Kit+ stem cells) and shifted lymphoid to myeloid cell differentiation. The haematopoiesis defect was due to an enhancement of bone marrow adipogenesis at the expense of osteoblastogenesis through the activation of PPAR $\gamma$ 2. At the same time expression of genes, such as Jag-1, SDF-1 and IL-7, forming the bone marrow niche was highly suppressed after HFD.

Mechanistically, we showed that structural changes of microbiota were associated to HFD-induced bone marrow changes in a pathway dependent of TLR<sub>4</sub> and Myd88. By targeting gram positive bacteria, through Vancomycin antibiotic treatment, we could rescue the HFD-mediated bone marrow niche alteration, while transplantation of stools from HFD mice could transfer the effect to normal mice.

These findings showed that microbiome balanced by food intake affects the bone marrow niche and osteoblast-adipocyte balance.

Mots clés : Microbiota, bone marrow niche, obesity

Fundings: Deutsche Forschungsgemeinschaft (CRC1181, SPP1468, IMMUNOBONE; BO3811/1-1, Emmy Noether; SPP1556, Intestinal Microbiota)

## **CP3 Emerging mechanisms of disease and therapeutic targets for cartilage**

### **Aging and OA**

Beatriz CARAMÉS

Cartilage Biology Group, Coruña, Spain

In recent years, progress has been made in understanding the molecular mechanisms of ageing. Increasing evidence suggest that many chronic diseases such as osteoarthritis (OA) are associated with hallmarks of aging, including epigenetic alterations, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, altered autophagy and intercellular communication. OA is the most prevalent joint disease, and has major global health impact in the ageing population, but neither preventive measures nor disease-modifying treatments are yet available.

Autophagy, an essential homeostasis mechanism, is defective in Aging and Osteoarthritis (OA), and its pharmacological activation protects against joint damage. We aim to identify targets regulating autophagy with potential relevance in aging and OA disease. The identification of nodal points of control regulating chondrocyte homeostasis may create opportunities of pharmacological interventions to prevent cartilage damage and OA initiation.

## **CP<sub>4</sub> Amorphous polyphosphate: A novel intelligent biomaterial, appropriate for the fabrication of orthopedic implants and for the encapsulation of mesenchymal stem cells**

Werner E. G. Müller and Xiaohong Wang

ERC Advanced Investigator Grant Research Group at the Institute for Physiological Chemistry University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Duesbergweg 6, D-55128 Mainz, Germany;

Recent developments in the field of biomaterials for tissue engineering open up new opportunities for regenerative therapy and prevention of progression of osteo-articular damage/impairment. A key advancement was the discovery of the regenerative activity of a group of physiologically occurring high-energy polymers, inorganic polyphosphates (polyP). These bio-polymers, in suitable bioinspired formulations, turned out to be capable of inducing proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic or chondrogenic lineages through differential gene expression (morphogenetic activity). Unprecedented is the property of these biopolymers to deliver high-energy phosphate in the extracellular space to promote anabolic processes including extracellular matrix synthesis in bradytrophic tissues such as cartilage and mineralized bone.

If polyphosphate is encapsulated into nano/micro-particles these inert material undergoes a change into a coacervate phase if added to cells or proteins. Interestingly the polyP coacervate allows the mesenchymal stem cells to invade the material which then show an enhanced growth/proliferation, suggesting that the polyP can act as an adaptable framework that mimics a niche and provides metabolic energy in bone/cartilage engineering.

Finally, we summarize the biological effects of these unique bio-polymers, not yet met by other biomaterials and depending on their specific formulation as smart amorphous nanoparticles/microparticles with different counterions. In addition, polyP in combination with other, hydrogel-forming polymers provides the basis for the fabrication of hardenable bio-inks applicable in additive manufacturing/3D printing and 3D cell bioprinting of regeneratively active patient-specific osteo-articular implants. The future prospects of this innovative technology will be discussed.

### References:

- Müller WEG, Wang S, Tolba E, Neufurth M, Ackermann M, Muñoz-Espí R, Lieberwirth I, Glasser G, Schröder HC and Wang XH (2018) Transformation of amorphous polyphosphate nanoparticles into coacervate complexes: an approach for the encapsulation of mesenchymal stem cells. *SMALL* 14:e1801170. doi: 10.1002/smll.201801170.
- Müller WEG, Wang S, Wiens M, Neufurth M, Ackermann M, Relkovic D, Kokkinopoulou M, Feng Q, Schröder HC, Wang XH (2017) Uptake of polyphosphate microparticles *in vitro* (SaOS-2 and HUVEC cells) followed by an increase of the intracellular ATP pool size. *PLoS ONE* 12(12):e0188977.
- Wang XH, Schröder HC, Müller WEG (2018) Amorphous polyphosphate, a smart bioinspired nano-/bio-material for bone and cartilage regeneration: Towards a new paradigm in tissue engineering. *J Mat Chem B* 6:2385-2412.
- Tolba E, Wang XH, Ackermann M, Neufurth M, Muñoz-Espí R, Schröder HC, and Müller WEG (2019) In situ polyphosphate nanoparticle formation in hybrid poly(vinyl alcohol)/karaya gum hydrogels: A porous scaffold inducing infiltration of mesenchymal stem cells. *Adv. Sci.* 6:1801452.
- Müller WEG, Ackermann M, Tolba E, Neufurth M, Ivetac I, Kokkinopoulou M, Schröder HC, Wang XH (2018) Role of ATP during the initiation of microvascularization. Acceleration of an autocrine sensing mechanism facilitating chemotaxis by inorganic polyphosphate. *Biochem. J.* 325:325-3273.

## **CP5 Marrow adipose tissue (MAT): lineage commitment and regulatory role in whole body energy metabolism**

Moustapha Kassem

Molecular Endocrinology Laboratory, University Department of Endocrinology, University Hospital of Odense, Odense, DK-5000 Odense C, Denmark

Marrow adipose tissue (MAT) is derived from skeletal stem cells (also known as bone marrow stromal stem cells or mesenchymal stem cells, MSC) differentiation. MSC are non-hematopoietic cells present within the bone marrow stroma and capable of multi-lineage differentiation into osteoblasts and adipocytes. Understanding lineage-specific commitment mechanisms can provide insight into mechanisms of age-related and osteoporosis-related impaired bone formation and also identifies novel pharmacological targets to enhance bone formation. In this overview, I will present our recent experiments identifying secreted factors present in the MSC micro-environment and that play a regulatory role in MSC differentiation choice to adipocytes versus osteoblasts. I will present a series of in vitro and in vivo studies that demonstrate that these factors are important regulators of MSC differentiation into osteoblasts and adipocytes and that they are potential candidates to be targeted for changing the differentiation fate of MSC from adipocytes to osteoblastic bone forming cells. In addition, I will present results from human studies of obese subjects demonstrating the changes in MAT in human metabolic disorders.

### References:

Kristensen LP et al (2012). Temporal profiling and pulsed SILAC labeling identify novel secreted proteins during ex vivo osteoblast differentiation of human stromal stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 10:989-1007

Jafari A et al (2017). Legumain Regulates Differentiation Fate of Human Bone Marrow Stromal Cells and Is Altered in Postmenopausal Osteoporosis. *Stem Cell Reports*. Feb 14;8(2):373-386. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.003. PMID: 28162997

Tencerova M, Kassem M (2016). The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Sep 21;7:127. Review. PMID: 27708616

Tencerova M, Figeac F, Ditzel N, Taipaleenmäki H, Nielsen TK, Kassem M (2018).



# PRÉSENTATIONS ORALES

## O1\* Mise en évidence de vésicules extracellulaires impliquées dans la biominéralisation de la coquille d'oeuf de poule

Lilian Stapane \*<sup>1</sup>, Nathalie Le Roy<sup>1</sup>, Jacky Ezagal<sup>1</sup>, Alejandro B. Rodriguez-Navarro<sup>2</sup>, Joël Gautron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France ; <sup>2</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

La coquille d'oeuf constitue une barrière physique contre les chocs mécaniques et la pénétration microbienne. Son intégrité est cruciale pour permettre le développement harmonieux du poussin et assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine. Dans ce contexte, nous caractérisons différents marqueurs qui influencent l'ultrastructure de la coquille et déterminent sa solidité. La coquille est constituée à 95 % d'une phase minérale de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>, calcite) et à 3,5 % d'une matrice organique principalement constituée de protéines et protéoglycane. La formation de la coquille résulte d'un processus de biominéralisation contrôlé et extracellulaire dans l'utérus et implique une phase transitoire de carbonate de calcium (ACC). L'ACC correspond à une réserve temporaire de calcium soluble fournissant les ions nécessaires durant la minéralisation rapide. En conditions physiologiques, l'ACC doit être stabilisée, ce qui nous a logiquement conduit au questionnement sur le mécanisme de maintien de cette forme dans le fluide utérin de la poule.

Ce travail vise à mettre en évidence le rôle de vésicules extracellulaires qui stabiliseraient et transporteraient cette forme transitoire jusqu'au site de la minéralisation. Dans ce système, des annexines (ANXA<sub>1</sub>, ANXA<sub>2</sub>) et une anhydrase carbonique (CA<sub>4</sub>) fourniraient les ions calciums et bicarbonates nécessaires à la formation du CaCO<sub>3</sub> vésiculaire. Pour valider cette hypothèse, différentes techniques ont été mises en place. Dans un premier temps, une analyse d'expression de gènes vésiculaires (pdc6ip, sdc6p, ywhaz...) nous a permis de démontrer une forte activité vésiculaire dans les segments de l'oviducte responsables de la minéralisation de la coquille. Dans un second temps, nous avons observé de nombreux événements d'exocytoses au niveau de la membrane plasmique des cellules utérines en microscopie électronique à transmission (MET). A travers une analyse élémentaire (EELS) en MET, nous avons ensuite repéré des vésicules extracellulaires dans le fluide utérin contenant du CaCO<sub>3</sub>. L'analyse de diffraction réalisée indique que le CaCO<sub>3</sub> vésiculaire observé est sous forme amorphe (ACC). Enfin, les protéines impliquées dans ce système de transport vésiculaire du minéral ont été détectées au niveau du tissu utérin (EDIL<sub>3</sub>, ANXA<sub>1</sub>, CA<sub>4</sub>...) et dans la fraction vésiculaire purifiée à partir du fluide utérin (EDIL<sub>3</sub>, PDC6IP...) par des techniques d'immunohistochimie et d'immunoblot.

Les résultats de cette étude valident pour la première fois l'hypothèse du transport vésiculaire de CaCO<sub>3</sub> dans la biominéralisation de la coquille d'oeuf. Ces résultats seront ensuite associés à l'analyse des polymorphismes réalisée sur les grands parentaux sélectionnés pour leur qualité de coquille, afin d'identifier les SNPs présents sur les séquences codantes et régulatrices de ces gènes. A terme, ces résultats permettront une sélection d'haplotypes de poules pondeuses aux coquilles renforcées.

Mots clés : biominéralisation, coquille d'oeuf, vésicules extracellulaires

## O2\* L'extinction génique (KO) de la sialoprotéine osseuse (BSP) entraîne une surexpression intestinale de la dentin matrix protein 1 (DMP1) et un profil de déficit d'absorption du phosphate

Hawa Cinar\*<sup>1</sup>, Nadia Boutahar<sup>2</sup>, Arnaud Vanden-Bossche<sup>1</sup>, Norbert Laroche<sup>1</sup>, Mireille Thomas<sup>1</sup>, Marie-Thérèse Linossier<sup>1</sup>, Marine Besson<sup>1</sup>, Marie-Hélène Lafage-Proust<sup>1</sup>, Laurence Vico<sup>1</sup>, Luc Malaval<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE, Université de Saint Etienne, Université de Lyon, Saint-Etienne, France ;

<sup>2</sup>: Plateau de Biologie du CHU, et Institut NeuroMyogène, Université de Saint Etienne, Université de Lyon, Saint-Etienne, France

Les SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins: BSP, ostéopontine (OPN), DMP1, MEPE) régulent la minéralisation osseuse et le métabolisme phosphocalcique. Elles contiennent des séquences ASARM (Acidic, Serine-Aspartate Rich, MEPE associated), libérées par clivage et qui ont une action phosphaturiante directe et indirecte. La DMP1 entière lie l'intégrine  $\alpha\beta3$  et PHEX (Phosphate-Regulating Endopeptidase Homolog, X-Linked) membranaire pour inhiber l'expression de FGF23, l'hormone osseuse phosphaturiante. Chez les souris KO (-/-) pour la BSP et double KO, BSP-/- OPN-/- (DKO) que nous avons générées (Bouletour et al., Bone, 120:411, 2019), la surexpression de DMP1 et MEPE dans l'os suggère une libération importante de peptides ASARM. Mais ces 2 lignées présentent un phosphate (Pi) sérique normal et les BSP-/- (pas les DKO) un FGF23 diminué, qui ne sont pas compatibles avec une hyperproduction d'ASARM.

Pour comprendre leur régulation phosphocalcique, des souris adultes des 4 génotypes (sauvage=WT, OPN-/-, BSP-/- et DKO) ont été placées en cage métabolique par groupe de 3, pendant 24h. Souris, nourriture et eau ont été pesés au début et à la fin de l'expérience, volume d'urine et poids des crottes ont été mesurés, sang, os longs, rein, duodénum, jéjunum et iléon ont été prélevés pour dosage, microtomographie et qRT-PCR. Les WT et OPN-/- perdent du poids (-6 et -3%, respectivement) dans les cages, mais pas les BSP-/- et DKO. La consommation de nourriture et le poids des crottes sèches des BSP-/- et DKO sont plus élevés. De manière frappante, BSP-/- et DKO sont hypophosphaturiques (-75% par rapport aux WT et OPN-/-,  $p < 0.01$ ,  $N=8$  cages/24 souris, U de Mann-Whitney). Leur profil (Pi sérique bas, FGF23 bas chez BSP-/-) rappelle celui des souris KO pour le transporteur intestinal du phosphate NPT2b, mais son expression ne varie pas dans l'intestin, pas plus que celle du transporteur Pit1, entre les 4 génotypes. Cependant, on mesure un pourcentage d'eau plus important (+150-200% avec WT,  $p < 0.01$ , NS pour OPN-/-) ainsi que davantage de potassium (+36-50%,  $p < 0.01$ ) dans les crottes des BSP-/- et DKO, et de sodium et Pi chez les DKO (et BSP-/- en tendance). Ceci suggère une réduction de l'absorption paracellulaire intestinale, dominante pour le Pi en régime normal. DMP1 est ~10X plus exprimée dans l'intestin des BSP-/- et DKO que chez les WT et OPN-/- tandis qu'OPN ne varie pas (autres SIBLING pas détectables).

Le KO de la BSP entraîne donc une régulation des autres SIBLING, différentielle selon les tissus, et des effets hors squelette qui affectent le métabolisme phosphocalcique. Les différences observées entre BSP-/- et DKO suggèrent un rôle de l'OPN à clarifier. Il a été montré que la DMP1 glycosylée exprimée par les astrocytes diminue la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Nos travaux ultérieurs exploreront la possibilité que cette protéine joue le même rôle dans l'intestin.

Mots clés : Phosphate, sialoprotéine osseuse, DMP1

### **O3\* YAP/TAZ est actif dans l'arthrite et son inhibition dans les synoviocytes restaure un phenotype normal**

Robin Caire \* <sup>1</sup>, Estelle Audoux <sup>2</sup>, Mireille Thomas <sup>1</sup>, Sylvie Peyroche <sup>1</sup>, Laurence Vico <sup>1</sup>, Hubert Marotte <sup>1</sup>

<sup>1</sup>: INSERM U1059-SAINBIOSE, Université de Lyon, Saint-Etienne, France ; <sup>2</sup>: GIMAP EA3064, Université de Lyon, Saint-Etienne, France

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire dans laquelle les « fibroblast like synoviocytes » (FLS) sont au centre de la pathologie. Dans des conditions pro-inflammatoires, les FLS vont développer un caractère « agressif » en proliférant excessivement, en échappant à l'apoptose, mais également en envahissant les tissus environnants (l'os et le cartilage), participant ainsi grandement à la destruction de l'articulation dans la PR. YAP et TAZ sont des co-facteurs de transcription étant décrits comme répondants aux stimuli mécaniques, mais aussi plus récemment, à l'inflammation. Leur activation est décrite dans de nombreux types de cancer conduisant les cellules cancéreuses à proliférer, migrer/envahir et résister à l'apoptose.

Pour cette étude nous avons utilisés des cultures de FLS de patients arthritiques et arthrosiques, cultivés classiquement ou dans un modèle d'organoïde mimant la membrane synoviale in vivo, ainsi qu'un modèle d'arthrite induite par adjuvant chez le rat.

Nous avons montré, dans un premier temps en utilisant des techniques d'immunohistochimie et d'immunofluorescence, de qRT-PCR et de WB, que YAP est actif dans l'arthrite in vitro et in vivo. Puis dans un deuxième temps en utilisant des supports de culture « mou » (2Kpa), nous avons pu montrer par immunofluorescence, qRT-PCR et WB, une activation de YAP sous stimuli pro-inflammatoires (TNF et IL-17) indépendamment de la contrainte mécanique.

De plus nous avons montré in vitro que le blocage de l'activité de YAP/TAZ par la verteporfine (inhibiteur chimique) permet une forte diminution de la capacité des FLS à proliférer (ki67 en immunofluorescence et cytométrie en flux) ainsi qu'une restauration de leur apoptose sous condition pro-inflammatoire (Annexine V en cytométrie en flux), et un blocage important de leur capacité d'invasion (test d'invasion sur insert de culture et quantification MMP13 en WB).

Enfin, les organoïdes synoviaux issus de patients PR présentent une hypertrophie synoviale plus importante que celle des patients arthrosiques, démontrant la capacité mimétique de ce modèle. Ils présentent également une augmentation de l'hyperplasie synoviale sous condition pro-inflammatoire (TNF et IL-17). Un traitement par la verteporfine permet un blocage presque total de l'hyperplasie synoviale, même sous stimuli pro-inflammatoires, dans l'arthrite et dans l'arthrose suggérant que l'activité de YAP/TAZ est essentielle à l'hyperplasie lors de l'inflammation.

Nos résultats démontrent pour la première fois une activation de YAP dans la PR et permettent de désigner YAP/TAZ comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les maladies articulaires inflammatoires impliquant les FLS.

Mots clés : YAP/TAZ, arthrite, verteporfine

#### O4 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory ectonucleotidase

Laurence Bessueille<sup>1</sup>, Anne Briolay<sup>1</sup>, Juna Como<sup>1</sup>, Cylia Mansouri<sup>1</sup>, Marie Gleizes<sup>2</sup>, Alaeddine El Jamal<sup>1</sup>, René Buchet<sup>1</sup>, Charles Dumontet<sup>3</sup>, Eva-Laure Matera<sup>3</sup>, Etienne Mornet<sup>4</sup>, Jose Luis Millan<sup>5</sup>, Caroline Fonta<sup>2</sup>, David Magne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ICBMS, UMR CNRS 5246, Lyon, France. <sup>2</sup>CERCO, UMR CNRS 5549, Toulouse, France. <sup>3</sup>CRCL, INSERM U1052, Lyon, France ; <sup>4</sup>Unité de Génétique Constitutionnelle, Le Chesnay, France. <sup>5</sup>Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, USA. LB and AB contributed equally

Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) is an ectoenzyme particularly known for its necessary role in skeletal and dental mineralization. To exert this function, TNAP hydrolyses the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate (PPi), which is mainly generated from extracellular ATP by ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (NPP1). Since children with TNAP genetic deficiency (hypophosphatasia, HPP) develop chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO) in addition to rickets, we hypothesized that TNAP might exert anti-inflammatory effects relying on the hydrolysis of ATP. Indeed, besides its intracellular energetic role, ATP is released extracellularly by virtually all cells in response to danger signals, to trigger autocrine and paracrine proinflammatory effects. Extracellular ATP effects are then resolved by CD39, which removes two Pi to generate AMP, which is further dephosphorylated by CD73 into the anti-inflammatory adenosine. We report here that Alpl mRNA levels (encoding TNAP) were much higher than those of Npp1, Cd39 and Cd73 (as determined by RT-qPCR) in bones of 7-day-old wild-type (WT) mice, as well as in primary mature osteoblasts and hypertrophic chondrocytes. Alpl<sup>+/-</sup> bones had increased levels of Il-1 $\beta$  and of its target Il-6 and decreased levels of the antiinflammatory Il-10 cytokine as compared with Alpl<sup>+/+</sup> mice, suggesting CRMO. In primary osteoblasts, TNAP inhibition with 25  $\mu$ M of MLS-0038949 led to exacerbated Il-6 secretion in response to IL-1 $\beta$ , as measured by ELISA. In addition, hypertrophic chondrocytes used TNAP to dephosphorylate exogenously added (as monitored by malachite green quantification of Pi) and endogenously released ATP (as measured by luciferase activity), and also produced more IL-6 when TNAP was inhibited with MLS-0038949. Interestingly, whereas IL-1 $\beta$  reduced Alpl levels in mineralizing osteoblasts and hypertrophic chondrocytes, IL-1 $\beta$  and LPS activated TNAP in nonmineralizing human mesenchymal stem cells (MSCs) and neutrophils respectively. In human MSCs stimulated with IL-1 $\beta$ , TNAP only modestly participated in ATP hydrolysis, and its inhibition with MLS-0038949 failed to produce any significant effect on cell proliferation, migration or cytokine production. In contrast, TNAP inhibition in human neutrophils exacerbated IL-1 $\beta$  secretion in response to LPS and extended neutrophil survival. In conclusion, these results indicate that TNAP is an anti-inflammatory ectonucleotidase in both bone mineralizing cells and neutrophils, explaining how TNAP genetic deficiency causes sterile osteomyelitis.

Mots clés : Tissue-nonspecific alkaline phosphatase; inflammation; ATP

## O5 Implication of bone marrow adipose tissue in bone homeostasis during osteoarthritis

Natalia Zapata-Linares <sup>1</sup>, Indira Toillon <sup>1</sup>, Damien Leterme <sup>2</sup>, Paul Magneron <sup>1</sup>, Audrey Pigenet <sup>1</sup>, Geoffroy Nourissat <sup>1</sup>, Christophe Chauveau <sup>2</sup>, Francis Berenbaum <sup>1</sup>, Marie-Hélène Lafage-Proust <sup>3</sup>, Stéphanie Lucas <sup>2</sup>, Xavier Houard <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Saint Antoine-UMRS\_938, Paris, France ; <sup>2</sup> PMOI-EA4490, Boulogne-sur-Mer, France ; <sup>3</sup> Sainbiose Inserm U1059, Saint-Étienne, France

Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal disease and currently there is no curative treatment for OA. Recently, it has been observed that bone loss is accompanied by an increase in the number of medullary adipocytes at the expense of osteoblasts in age-associated diseases. These results suggest that adipocytes from the bone marrow could play a role in bone homeostasis, yet their role on OA is to be discovered. In the present study we hypothesize that bone marrow adipocytes are crucial cell partners in the control of bone homeostasis and that their physiological functions are deregulated in OA. Material and Methods: C57BL/6 mice male (n=4) and female (n=4) underwent destabilization of the medial meniscus (DMM) or SHAM operation. OA development was determined using OARSI score at 3, 12 and 15 weeks post-surgery. The adipocytes were stained using an anti-Perilipin antibody and further quantified. Adipocytes and Mesenchymal stem cells (MSCs) were enzymatically isolated from epiphysis, metaphysis and subcutaneous adipose tissue (SC) of OA patients (n=8) that underwent hip replacement surgery. RNA extracted from adipocytes was used for gene expression analysis using RT-qPCR. MSCs were expanded and differentiated in vitro towards osteoblasts and adipocytes and were stimulated or not with IL1 $\beta$ . The capacity of differentiation of MSCs was assessed by cytology and gene expression analysis using RT-qPCR. Finally, their ability to respond to IL1 $\beta$  was evaluated using RT-qPCR.

OA was observed at 3 weeks in both male and female mice with no gender difference. The OARSI score increased gradually from week 3 post-surgery to week 15, showing the progression of the disease. While no differences were observed between DMM and SHAM after 3 weeks, adipocyte density was superior in DMM mice in both the medial and lateral parts of the epiphysis at 12- and 15-weeks post-surgery. Interestingly, the adipocyte density was positively correlated with the OARSI score, at 12 weeks post-surgery this correlation was statistically significant ( $p < 0.014$ ). This strong presence of adipose tissue was also observed in the epiphysis of OA patients. Those adipocytes showed an up-regulation of genes implicated in tissue remodeling and inflammation when compared to adipocytes from SC. It was observed that MSCs of OA patients tend to differentiate preferentially to adipocytes and not to osteoblasts. Finally, MSCs and osteoblasts derived from them responded considerably more to an inflammatory stress than adipocytes derived from MSCs.

The development of OA was observed to be associated with an increase in the bone marrow adiposity that could be explained by an increased tendency of MSCs to differentiate into adipocytes. Due to their molecular profile and their response to inflammatory stress, MSCs could participate in the regulation of bone microenvironment during OA.

Mots clés : Osteoarthritis, Bone marrow adipocytes, Bone homeostasis

## O6\* The calcium sensing receptor in breast cancer and bone metastasis: a new dawn for calcilytics

Souvik Das \*<sup>1</sup>, Lamia Bouazza<sup>3</sup>, Soumaya El-Moghrabi<sup>3</sup>, Cedric Boudot<sup>1</sup>, John Wysolmerski<sup>2</sup>, Said Kamel<sup>1</sup>, Philippe Clézardin<sup>3</sup>, Michel Brazier<sup>1</sup>, Romuald Mentaverri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MP3CV University Center for Health Research, Amiens, France; <sup>2</sup>Section of Endocrinology and Metabolism, Yale School of Medicine; <sup>3</sup>Inserm U1033 LYOS, Lyon, France

Breast cancer is the most common form of cancer affecting women worldwide with bones being the prevalent site of metastasis. The calcium sensing receptor (CaSR), whose primary physiological role is calcium homeostasis, has emerged as a new target in the “vicious cycle” that amplifies the metastatic cascade. Our team had already shown that over-expression of the CaSR dramatically increased the osteolytic potential of MDA-MB-231 cells *in vivo*. Our objective here was to abate the CaSR with calcilytics (CaSR antagonists) to prevent metastasis of breast cancer cells.

MDA-MB-231 cells were stably transfected with plasmids and made to over-express either a full-length wild-type CaSR (CaSR-WT) or a functionally inactive dominant negative mutant (CaSR-DN). For control, cells were transfected with empty pcDNA<sup>TM</sup>3.1/Zeo(+) plasmid (CaSR-EV). NPS 2143 was used as a calcilytic in relevant assays. Trabecular bone fragments, extracted from human femoral heads, were used as explants to study the osteoinvasion *in vitro* as well as to generate conditioned media. Transwell inserts seeded with the transfected cells were exposed to the bone fragment supernatant before quantifying migration. Treated/untreated cells were seeded directly onto the bone fragments, and zeocin-selective colony formation assay was performed with the extracted marrow population. Mice were inoculated intra-tibially or intra-arterially with MDA-MB-231 cells and received NPS-2143 (ip) for 7 or 14 days respectively.

The cultured supernatant elicited a strong migratory response across all transfected cell types. In these culture conditions, the CaSR-WT and CaSR-EV cells had a 50% increase in migration levels over the CaSR-DN ( $p < 0.01$ ). The difference between CaSR-WT and CaSR-EV was not statistically significant. Interestingly, similar results were obtained when cells were directly added to the bone fragment and allowed to colonize. The CaSR-WT and CaSR-EV had a 3-fold increase in colony formation over CaSR-DN. This led us to select the CaSR-EV in further experiments, where treating the cells with NPS 2143 decreased their colony formation by around 42%, diminished migration toward bone supernatants ( $p < 0.01$ ), and blunted proliferation sensitized by the conditioned media ( $p < 0.01$ ). In the intra-tibial model, mimicking treatment after diagnosis, administration of calcilytics reduced incidence (4/5 vs. 1/6) and extent (by 86%,  $p < 0.05$ ) of osteolytic lesions. Calcilytics administered for 14 days after intra-arterial injection of MDA-MB-231 cells caused a 30-fold decrease in BLI signal in mice hindlimbs ( $p < 0.05$ ).

In a co-culture model benefitting from an architecturally intact tissue micro-environment, we demonstrate that the CaSR in breast cancer cells is involved in engraftment and chemoattraction to the bone. Further experiments are underway *in vivo* to see if calcilytics can be repurposed as a therapeutic intervention for bone metastases from breast cancer.

Mots clés: Bone metastasis, breast cancer, CaSR

## O7\* Impact de l'inhibition de la sclerostine sur la regeneration osseuse cranio-faciale dans un modele murin

Sophie Maillard \*<sup>1,2,3</sup>, Brigitte Baroukh<sup>1</sup>, Jérémy Sadoine<sup>1</sup>, Anne Poliard<sup>1</sup>, Lotfi Slimani<sup>1</sup>, Catherine Chaussain<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>. Faculté de Chirurgie Dentaire - Paris Descartes, EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge, France ; <sup>2</sup>. Postgraduate en parodontologie et dentisterie implantaire, Département de parodontologie, U.F.R. d'odontologie, Université Paris Diderot, Paris, France ; <sup>3</sup>. Service d'odontologie, Hôpital Rothschild, APHP, Paris, France ; <sup>4</sup>. Service d'odontologie, Hôpital Bretonneau, APHP, Paris, France

Les défauts osseux cranio-faciaux de taille critique représentent un véritable défi en chirurgie reconstructive. Par conséquent, les approches biomimétiques en ingénierie tissulaire apparaissent comme une voie thérapeutique prometteuse. La sclérostine (codée par le gène SOST) est une glycoprotéine sécrétée qui inhibe la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ $\beta$ -caténine qui, lorsqu'elle est activée, stimule la formation osseuse. OBJECTIF : Cette étude cherche à déterminer si l'inhibition de Sost, dans un modèle d'implantation de tissu équivalent consistant en un hydrogel de collagène denseensemencé de cellules souches murines d'origine pulpaire (mDpsc), pourrait accélérer et améliorer la formation osseuse au sein d'un défaut critique de la calvaria.

MATÉRIEL ET MÉTHODES : Un défaut de taille critique (3,5 mm de diamètre) a été créé chirurgicalement dans l'os pariétal chez des souris mâles âgées de 10 semaines de type sauvage (WT, n = 40) et Knock-Out Sost (KO Sost, n = 40). Les défauts ont été soit (1) laissés vides (absence de matrice), remplis (2) avec une matrice collagénique acellulaire, ou avec une matrice collagéniqueensemencée avec des cellules mDpsc issues (3) de souris WT (WT mDpsc) ou (4) de souris KO Sost (KO Sost mDpsc). La formation osseuse dans les défauts a été suivie longitudinalement pendant 2 mois grâce à l'imagerie micro-CT in vivo. Des animaux ont été sacrifiés à J15 et J60 afin de réaliser des analyses histologiques et histomorphométriques.

RESULTATS : A J60, l'ensemble des défauts n'ayant pas reçu de matrices cellularisées avec mDPSC restent critiques chez les souris WT et KO. Dans les groupes cellularisés, la réparation osseuse chez les souris KO Sost est significativement améliorée par rapport aux souris WT quelle que soit l'origine des cellules (p < 0.05). Chez les souris WT, les défauts comblés avec une matrice collagénique enrichie de cellules mDpsc KO Sost présentent un volume osseux significativement plus important et une microarchitecture osseuse statistiquement améliorés par rapport aux défauts comblés avec une matrice contenant des cellules mDpsc WT (p < 0.05).

CONCLUSION : Cette étude suggère que l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, avec une utilisation d'un anticorps monoclonal Sost, pourrait constituer une approche clinique intéressante pour améliorer la régénération de l'os cranio-facial.

Mots clés : Réparation osseuse, inhibition voie Wnt/ $\beta$ -caténine, thérapie innovante



## O8 Vasorin modulates bone remodeling by regulating osteoclast activity

Caroline Andrique<sup>1</sup>, Anne-Laure Bonnet<sup>1,2</sup>, Julie Lesieur<sup>1</sup>, Heinrich Schrewe<sup>3</sup>, Céline Gaucher<sup>1,2</sup>, Catherine Chaussain<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>EA2496, Dental School, University Paris Descartes, Paris, France; <sup>2</sup>.AP-HP, Odontology departments (Charles Foix, Mondor, Bretonneau), Paris, France; <sup>3</sup>. Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

Vasorin (VASN) is a transmembrane protein first identified as a transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) binding protein. During development, Vasn is expressed in both intramembranous and endochondral ossification zones and other organs with a regionalized staining pattern linked to differentiation. When compared to wild type (WT) or heterozygous mice (these latter showing no phenotype), Vasn knock out (KO) mice display a very severe phenotype with short stature, severe nephrotic syndrome (NS) from postnatal day (PN) 15 onwards and abnormal bone and tooth mineralization. Vasn KO mice die at  $\sim$ PN21, suggesting a major role of this protein after birth. Similar phenotype was observed in adult Vasnflox:CAGG-Cre-ERTM KO mice after Vasn knock-down by tamoxifen injection, with proteinuria starting at 14 days post-injection and increasing progressively over 2 weeks. These mice also die at  $\sim$ 4 weeks after tamoxifen injection, further supporting a major role of Vasn in the physiopathology of several organs. Our previous data showed that constitutive Vasn KO mice exhibited an osteopenic phenotype associated with increased TRAP activity.

Here, we aimed to 1) analyse the impact of Vasn deletion on the skeleton of induced adult Vasnflox:CAGG-Cre-ERTM KO mice and 2) study more in depth the consequences of Vasn deletion on bone cells. Similarly to constitutive KO mice, an osteopenic phenotype was observed in induced adult KO mice 3 weeks following tamoxifen injection, with significantly decreased bone fraction and trabecular number when compared to similarly induced Vasnflox:CAGG-Cre-ERTM control mice. TRAP staining quantification showed increased osteoclast activity on induced adult femurs when compared to controls ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the femur analysis by transmission electron microscopy revealed that osteoclast displayed an abnormal structure with altered i) sealing zone, ii) ruffled border and iii) accumulation of dense vacuoles in the cytoplasm when compared to controls. Primary culture of osteoclasts derived from the bone marrow of constitutive KO mice showed that Vasn was expressed by osteoclasts and that its deletion modified cell differentiation. Namely, KO osteoclasts showed significantly larger area when compared to WT osteoclasts ( $p < 0.01$ ). In parallel, primary culture of osteoblasts obtained from the calvaria of WT and KO mice and maintained under osteogenic conditions showed that i) Vasn was also expressed by WT osteoblasts and its expression was increased during the mineralization course, and ii) mineralization was enhanced in KO osteoblasts as evidenced by alizarin red staining dosage at day 14 but reached a similar level to WT at day 21.

In conclusion, even if the underlying signaling pathways remain to be investigated, our findings suggest that Vasorin may play a major role in bone remodeling mainly by regulating osteoclast activity.

Mots clés: Bone turn-over, osteoclast, osteoblast

## O9 Macrophage-derived inflammation promotes heterotopic ossification in polytrauma patients by driving muscle stem cells towards osteoblastic differentiation

Dorothee Girard <sup>§ 1</sup>, Frédéric Torossian <sup>§ 2</sup>, Bernadette Guerton <sup>2</sup>, Adrienne Anginot <sup>2</sup>, Marie-Emmanuelle Goriot <sup>1</sup>, Jules Gueguen <sup>1</sup>, Denis Clay <sup>3</sup>, Nathalie Rochet <sup>4</sup>, Caroline Le Bousse-Kerdilès <sup>2</sup>, Sébastien Banzet <sup>1</sup>  
<sup>§</sup> contributed equally to this work

<sup>1</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées, INSERM UMRS-MD 1197, Clamart, France ; <sup>2</sup> INSERM UMRS-MD 1197, Université Paris 11, Villejuif, France ; <sup>3</sup>INSERM UMS33, Université Paris 11, Villejuif, France ; <sup>4</sup> Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Valrose, Nice, France

Heterotopic ossification (HO) is characterized by the development of ectopic bone tissue within periarticular muscle. HO is associated with severe pain, joint ankylosis, vascular and nerve compression and the only curative option is surgical resection. Polytraumatic injuries and inflammation are the main identified factors contributing to the pathology but the cellular mechanisms underlying the onset of HO still required further characterization.

In this study, we investigated the role of macrophage-derived inflammation via the secretion of Oncostatin M (OSM) in modulating the osteogenic potential of muscle stem cells.

Human HO samples were collected during surgery to isolate CD14<sup>+</sup> macrophages. Samples of muscle surrounding HOs were also collected to isolate CD56<sup>+</sup> myoblasts and PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> mesenchymal progenitors using cell sorting. Conditioned medium of CD14<sup>+</sup> cells stimulated or not with LPS and OSM was added during CD56<sup>+</sup> and PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> in vitro osteogenic differentiation assays and calcium deposition was quantified using Alizarin Red S staining. CD56<sup>+</sup> and PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells were also seeded into hydroxyapatite/calcium phosphate scaffolds and implanted subcutaneously into the flanks of nude mice for in vivo osteogenic assays. After 15 weeks, scaffolds were decalcified for H&E histological evaluation.

Our results show that conditioned medium of macrophages stimulated with LPS and the addition of OSM increase calcium deposition for both CD56<sup>+</sup> and PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells. Interestingly, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells display higher in vitro osteogenic differentiation potential compared to CD56<sup>+</sup> cells. The histological analyses of scaffolds seeded with CD56<sup>+</sup> cells showed collagen matrix deposition whereas PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells were able to generate mature bone matrix. More interestingly, the presence of hematopoietic stem cells was mainly observed in PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> seeded scaffolds.

This study confirms that macrophage-derived inflammation and more particularly OSM is a major component of HO pathophysiology. PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> precursor cells display higher osteogenic potential and can mediate de novo formation of a hematopoietic stem cell niche.

Mots clés : osteogenesis, inflammation, muscle stem cells

## **O10\* La memoire mecanique des cellules souches squelettiques humaines (hcss) conditionne leur réponse aux signaux adipogeniques lors de la mission spatiale invitrobone**

Mélanie Dhayer \*, Sylvie Peyroche, Mireille Thomas, Norbert Laroche, Marie-Thérèse Linossier, Laurence Vico, Alain Guignandon

INSERM U1059 LBTO St Etienne, France

Un environnement en décharge mécanique promeut un engagement des hSSC dans la voie adipocytaire au détriment de la voie ostéoblastique. Par ailleurs, il a été démontré que l'expansion des hSSC sur des substrats de culture rigides (support de culture conventionnel) instaure une mémoire mécanique conduisant à une prolifération soutenue des cellules souches et à une résistance à l'adipogenèse (Xi Li et al, 2017).

Dans ce contexte, nous avons testé si la modification de la mémoire mécanique pré-vol des hSSC sur des substrats rigides pour 3 ou 6 passages (respectivement, P3 ou P6) est capable de limiter la différenciation adipocytaire favorisée par les conditions microgravitaires. Dans ce but, les hSSC P3 et P6 ont été cultivées 14 jours en milieu de différenciation adipocytaire (Dexamethasone/Insuline/IBMX) à bord de la station spatiale internationale dans le cadre de la mission SpaceX14, expérience Invitrobone.

L'abondance et la séquence des transcripts d'ARN sont analysées par séquençage RNA-seq (séquençage nouvelle génération Illumina). Avant le vol, il a d'abord été établi que les cellules P3 indifférenciées (en milieu de maintenance) sont mécaniquement programmées sur des supports durs, démontré par l'expression basal des gènes maîtres de la différenciation en ostéochondroprogéniteurs. L'analyse de l'ontologie des gènes montre une régulation de la différenciation des (GO:0032331, taux de fausses découvertes FDR: 0.008) et la différenciation ostéoblastique (GO:0001649, FDR: 0.03). De plus, les cellules P6 sont restées indifférenciées, sans aucun signe de chondro-ostéogenèse, ni d'engagement dans la voie adipocytaire. Après l'exposition à la micropesanteur en vol spatial, nous avons observé que les cellules P3 en milieu de différenciation adipogénique étaient incapables de se différencier mais qu'elles conservaient leurs caractères souches (gènes pour le processus métabolique des acides gras, GO:0006631, FDR<0.001 et la localisation des lipides GO:0010876, FDR<0.001). Nous avons donc confirmé leur résistance aux conditions pro-adipocytaires liées à la micropesanteur. En revanche, les cellules P6 montrent une augmentation des marqueurs adipogéniques durant l'exposition à la micropesanteur (expression des gènes pour le stockage lipidique GO:0010883, FDR<0.002, et leur localisation, GO:1905952, FDR<0.002) suggérant qu'elles ont perdu leur programmation mécanique lors de l'expansion en culture.

Nos résultats démontrent qu'en l'absence de stimuli chimiques, la programmation mécanique pré-vol est essentielle à la réponse des cellules souches à la micropesanteur.

Mots clés : Micropesanteur, Cellules souches squelettiques, Adipocyte

## O11 The absence of claudin-10 in ameloblasts impairs amelogenesis

Sandy Ribes<sup>1</sup>, Nghia Nguyen<sup>1</sup>, Jerome Bouchet<sup>1</sup>, Pascal Houillier<sup>2</sup>, Claire Bardet<sup>1</sup>, Dominik Muller<sup>3</sup>, Tilman Breiderhoff<sup>3</sup>, Catherine Chaussain<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>EA 2496 Orofacial pathologies, Imaging and Biotherapies, and Life Imaging Platform (PIV) Dental School, University of Paris Descartes, Montrouge, France; <sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR S1138, Centre de Recherche des Cordeliers, CNRS ERL 8228, Paris, France.; <sup>3</sup>Department of Pediatric Nephrology, Charité University School of Medicine, Berlin, Germany; <sup>4</sup>AP-HP, Odontology Department, and Reference Center for rare diseases of the metabolism of calcium and phosphorus, Nord Val de Seine Hospital (Bretonneau), France

Tight junctions (TJ) are regulating the paracellular pathway of epithelial ion transport. Recently, it became evident that this paracellular pathway is highly specific, tightly regulated and causally involved in human diseases. CLDN10B is expressed in the thick ascending limb of Henle's loop but also in the skin and salivary glands. We recently reported that six patients from two unrelated families with the HELIX (Hypohidrosis, Electrolyte imbalance -renal loss of NaCl with secondary hyperaldosteronism and hypokalemia-, HypoLacrymia, Ichthyosis, Xerostomia) syndrome due to mutations in the CLDN10B gene also displayed severe enamel wear.

Here, we aim to determine whether this enamel wear only resulted from salivary glands and renal dysfunction or also from a direct consequence of the absence of Claudin10b in the enamel organ. METHODS: We investigated i) the pattern of Claudin-10b expression in the forming tooth, ii) the consequences of the absence of Claudin-10b on amelogenesis. For these purposes, we explored amelogenesis in *Cldn10*<sup>-/-</sup> mice, a murine model which dies within the first day of life.

Immunohistochemistry revealed that, in WT mice, Claudin-10 was expressed in the enamel organ at all the stages of amelogenesis, both in the stratum intermedium and in the TJ located at the basal end of ameloblasts, where it co-localized with zonula occludens protein 1 (ZO-1). Both histology and transmission electron microscopy revealed that the ameloblast layer displayed a chaotic organization evocating "porcupine spines" and that the basal TJ of ameloblasts were enlarged in *Cldn10*<sup>-/-</sup> mice.

Claudin-10b is expressed in the enamel organ and Amelogenesis is impaired in *Cldn10*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that the enamel defects observed in patients with CLDN10B mutations might not only result from the renal dysfunction or insufficient saliva. The ongoing generation of a mouse with a deletion of *Cldn10* in the enamel organ using Keratin-14 Cre will not only allow a full characterization of Amelogenesis in the absence of Claudin-10 but also the study of the direct consequences of the lack of this TJ protein on amelogenesis, independently of the kidney dysfunction.

Mots clés : jonctions serrées ; email ; transport paracellulaire

## O12\* Mandibular bone is protected against microarchitectural alterations and bone marrow adipose conversion in ovariectomized rats

Xavier Coute<sup>1</sup>\*, Jérôme Delattre<sup>1</sup>, Pierre Marchandise<sup>1</sup>, Guillaume Falgayrac<sup>1</sup>, Greet Kerckhofs<sup>2,3,4</sup>, Cécile Olejnik<sup>1</sup>, Guillaume Penel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Lille, PMOI – EA 4490, Lille, France; <sup>2</sup>Biomechanics lab, Institute of Mechanics, Materials, and Civil Engineering, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; <sup>3</sup>Department Materials Engineering, KU Leuven, Belgium; <sup>4</sup>Prometheus, Division of Skeletal Tissue Engineering, KU Leuven, Belgium

Osteoporosis is a common disease that leads to a loss of bone mass and to alterations in the bone microarchitecture that occur in a site-specific manner; however it remains controversial in the jaw (1). The involvement of bone marrow adipose tissue (BMAT) in the bone metabolism has been suggested during osteoporosis (2).

To test whether the BMAT content is related to mandibular bone loss, this study aimed to investigate the correlations between trabecular bone microarchitecture and BMAT content and its spatial distribution in relation to bone surface after ovariectomy (OVX) in a mature rat model.

Six months old female SD rats were used (N=69). Three distinct groups were compared: ovariectomized ad libitum group (OVX\_AL, n=20), ovariectomized pair-fed group (OVX\_PF, n=20) and control group fed ad libitum, (SHAM, n=29). Tibiae and mandibles (alveolar bone and condyle) were analysed by microCT at 6 months (baseline, n=9), 10 months (M<sub>4</sub>, n=9) and 15 months of age (M<sub>9</sub>, n=11). Trabecular bone morphometric and BMAT (after decalcification and tetroxide osmium staining) parameters were assessed: percent trabecular bone volume (BV/TV, %), trabecular surface/volume ratio (BS/BV, u.a) trabecular number (Tb.N, mm<sup>-1</sup>), thickness (Tb.Th, mm) and separation (Tb.Sp, mm), percent marrow volume (Ma.V/TV, %) and percent bone marrow adipocyte volume (AdV/Ma.V, %). To assess the distribution profile of BMAT, the mean percent adipocyte volume is evaluated according to the distance from the trabecular bone surface (3). Principal component analysis (PCA) was performed to study the global relationships between variables.

The OVX-induced bone loss was three-fold lower in the mandible than in the tibia and was observed only in the alveolar bone (not in the condyle). In the tibia, the Tb.N was approximately 65% lower and both Tb.Th. (+10%, p<0.0001) and Tb.Sp. (+65%, p<0.001) were higher in the OVX groups compared to those of the SHAM group. In the alveolar bone, the Tb.N. was approximately 20-25% lower (p <0.0001) in the OVX groups compared to that of the SHAM group. In the condyle, the OVX groups were characterized by a lower Tb.N. (-30% at M<sub>9</sub>, p<0.001) associated with a higher Tb.Th (+25%, p<0.05) compared to that of the SHAM group. The mandibular BMAT content remained 4-6-fold lower compared to that in the tibia. In addition, the adipose content in the mandible was located at a distance from the trabecular bone surface (only 5% in contact with the trabecular bone surface versus 85% in the tibia). Interestingly, PCA showed in the tibia only a clear distinction between SHAM and both OVX groups without separation in the mandibular sites.

These findings highlight a specific mandibular response to OVX. In particular, the alveolar bone is protected against the microarchitectural and BMAT content changes observed in the tibia. Oral functions may have a protective effect on the mandibular BMAT conversion and bone loss in an OVX context.

Mots clés : Mandibular bone microarchitecture, Bone marrow adiposity, Ovariectomized rat model

### O13 Comparative biomineralization in anthozoans: the red coral is not a reef coral

Philippe Ganot <sup>1</sup>, Nathalie Le Roy <sup>1,4</sup>, Markus Fritz <sup>2</sup>, Tobias Rausch <sup>2</sup>, Didier Aurelle <sup>3</sup>, Anne Haguenaer <sup>3</sup>, Manuel Arenda <sup>5</sup>, Vladimir Benes <sup>2</sup>, Denis Allemand <sup>1</sup>, Sylvie Tambutté <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CSM, Centre Scientifique de Monaco, Monaco ; <sup>2</sup> EMBL, Heidelberg, Germany ; <sup>3</sup> CNRS, Station Marine d'Endoume, Marseille, France ; <sup>4</sup>: INRA, Biologie des oiseaux et aviculture, Nouzilly, France ; <sup>5</sup> KAUST, Red Sea Research Center, Division of Biological and Environmental Science and Engineering, Saudi Arabia

Corals are calcifying organisms represented in diverse taxa of Cnidaria, including Hexacorallia (e.g. reef-building corals), and Octocorallia (e.g. precious red corals). *Corallium rubrum*, the Mediterranean precious red coral, produces two types of biomineralized structures, the sclerites and the axial skeleton. Both are made of high Mg calcite precipitates and an organic matrix (OM) which is secreted by the scleroblast cells and the calcifying epithelium, respectively. It is noteworthy that the red coral axial skeleton is the material for one of the oldest forms of jewelry known to man.

Hexacorallia and Octocorallia diverged around 550-700 Mya, before the first mineralized cnidarian fossil dating. How evolutionary conserved are the processes controlling biomineralization between the reefbuilding corals and the precious red corals? Although calcification in hexacorallia has been the subject of several investigations, little is known on octocorallian calcification.

We combined microdissection technics with omics approaches to shed light on the synthesis and composition of the red coral biominerals. Proteomic analysis of the decalcified biominerals allowed us to identify over 100 different proteins composing the sclerites and axial skeleton OMs. Transcriptomic analysis of the calcifying tissues enabled us to ascertain whether the OM proteins were specific to the calcification process or partaken with other regular extracellular matrix processes.

Our results show that 1/ many (but not all) OM proteins are shared between the sclerites and the axial skeleton; 2/ in comparison to the known reef-building coral OM proteins, octocorals seem to have evolved different strategies: a marked utilization of collagen fibers but also, many novel proteins; 3/ only half of the red coral OM proteins are specifically expressed by the calcifying cells; 4/ many of calcifying specific proteins appear to be co-opted from already existing extracellular matrix gene families.

Coral is a vernacular name: calcification in different cnidarian taxa, although using an evolutionary conserved "tool kit" (e.g. Carbonic Anhydrases), appears to result from independent recruitments of extracellular matrix genes involved in other processes.

Mots clés : coral, organic matrix, transcriptomic

## **O14\* Impact de l'extinction génique de la sialoprotéine osseuse et/ou l'ostéopontine sur la réponse du squelette à la vibration corps entier**

Mathieu Maalouf \*, Hawa Cinar, Arnaud Vanden-Bossche, Norbert Laroche, Mireille Thomas, Mélina Renaudin, Alain Guignandon, Marie-Hélène Lafage-Proust, Laurence Vico, Luc Malaval

INSERM, U1059, SAINBIOSE, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet - Université de Lyon, Saint-Etienne, France.

La sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN) sont deux protéines SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein) co-exprimées par les cellules osseuses. Ces deux protéines jouent un rôle clé dans le remodelage du tissu squelettique et dans son adaptation aux contraintes mécaniques. En particulier, leurs gènes présentent une réponse rapide aux contraintes mécaniques exercées sur le squelette. Nous avons récemment développé et décrit des modèles murins d'extinction génique (-/-, KO) individuelle ou conjointe de BSP et OPN, sur un fond 129sv/CD1 (Bouleftour et al., *Bone*, 120:411, 2019). Pour évaluer les réponses de ces mutants à un stimulus mécanique intermittent validé sur un autre fond génique (Gnuybkin et al., *J Biomech*, 49:1899, 2016), des souris mâles de 14 semaines, de 4 génotypes (sauvage=WT, BSP-/-, OPN-/- et double KO=DKO) ont été soumises à un régime de vibration corps entier à 90Hz sous 2g d'accélération, 15 minutes/jour, 5 jours/semaine durant 6 semaines. En fin de protocole, fémurs et vertèbres ont été collectés pour micro-tomographie et histomorphométrie, et les tibias pour qRT-PCR.

Les courbes de prise de poids des souris des quatre génotypes n'ont pas été modifiées par la vibration. Le régime vibratoire a eu peu d'impact sur l'os trabéculaire des WT et mutants, à l'exception des OPN-/- qui montrent une chute du volume trabéculaire de l'os vertébral (L2, BV/TV: -18%,  $p < 0.05$ ,  $N=10$ , U de Wilcoxon-Mann-Whitney) avec réduction du nombre et de l'épaisseur des trabécules. De manière intéressante, cette perte osseuse s'accompagne d'une augmentation des surfaces marquées par la Tétracycline (TTC) et du nombre de cellules TRAcP+, témoins d'un remodelage accéléré.

L'os cortical des souris vibrées montre une réduction de la porosité des WT et DKO, et une augmentation significative de l'épaisseur corticale des BSP-/- (+4%,  $p < 0.05$ ,  $N=10$ ). L'analyse en qRT-PCR de l'os cortical des tibias en fin d'expérience a montré chez les BSP-/- une réduction de l'expression de RANK-L, de Cathepsine K et d'OPN, suggérant une chute de l'activité de résorption. Une étude préliminaire des surfaces marquées par la TTC ne montre aucun effet de la vibration sur les BSP-/-, DKO et WT mais une augmentation des surfaces minéralisantes dans l'endoste (+34%,  $p < 0.05$ ,  $N=4$ ) et le périoste (+14%, NS,  $N=4$ ) des OPN-/. En conclusion, les souris BSP-/-, OPN-/- et DKO montrent des effets distincts et spécifiques de site d'un signal vibratoire, témoignant de l'importance de ces facteurs pour la réponse osseuse aux contraintes mécaniques. L'analyse se poursuit pour confirmer une régulation par l'OPN de l'intensité de l'activité osseuse induite par les signaux mécaniques intermittents, et ses interactions avec la BSP dans ce contexte.

Mots clés : Sialoprotéine osseuse, Ostéopontine, Vibration corps entier

## O15 Guinea fowl eggshell structural organization and particular organic matrix protein patterns to decipher its exceptional biomechanical properties

Nathalie Le Roy<sup>1</sup>, Lucie Combes-Soia<sup>2</sup>, Aurélien Brionne<sup>1</sup>, Valérie Labas<sup>2,3</sup>, Alejandro B. Rodriguez-Navarro<sup>4</sup>, Yves Nys<sup>1</sup> and Joël Gautron<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France ; <sup>2</sup> UMR PRC, INRA 85, CNRS 7247, Université de Tours, IFCE, 37380 Nouzilly, France ; <sup>3</sup> CIRE, Pôle d'Analyse et d'Imagerie des Biomolécules, INRA, CHRU de Tours, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France ; <sup>4</sup> Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

The Guinea fowl (*Numidameleagris*) presents a highly resistant eggshell compared to the other birds. We will describe in this study the particular ultrastructure of the Guinea fowl shell that confers exceptional mechanical properties and how changes in organic matrix components controls the development of this structure. The inner part of the shell is similar to other birds, but an additional change in the size and orientation of crystals (switch) is observed at about 1/3 of the calcified layer. Large columnar calcite units break into smaller crystal units with varying crystallographic orientations forming a microstructure with an intricate interlacing of calcite crystals. We recently reported the Guinea fowl shell structural organization from the micro to the Angstrom, which underlined that this particular shell is a bilayer structure. Organic matrix is suspected to firstly induce the initial microstructure shift and then the secondary nucleation events resulting in smaller crystals with increasing misorientations. Consequently, the change of the intra-crystalline organic matter level during the crystal switch was also investigated.

A proteomic survey allowed us to identify and characterize 149 proteins in Guinea fowl shell. These proteins were quantified at five calcification stages corresponding to the first events of mineral deposition, the growth of calcite units just prior the shift of crystal orientation, then to the period of the deposition of newly formed crystalline shape and to later stage when the growth of the newly formed crystals is stabilized after the microstructure shift and the secondary nucleation events. We have observed 61 matrix proteins only present in the shift period and potentially responsible of the change of mineral in the shell. Amongst them are calcium binding proteins (NPNT-X1, CALBP1, Protein S100-A6, ANXA1 and 2, CDH2...), core proteins of proteoglycans (TSKU, GPC4...), and other proteins regulating the activity of proteins driving the mineralization (SSP1, OC-116GDF6...).

These proteins interact with mineral to produce changes in crystal size and orientation and consequently the new shell structure and its resulting mechanical properties. Data obtained will allow the determination of biological markers that will be used for the genomic selection of chicken layers with improved mechanical shell mechanical properties. Additionally, they provided a list of organic products that will be tested as additives for material and ceramics.

Mots clés : Guinea fowl eggshell, biomineralization, matrix proteins



## O16 FGFR3: a key regulator of zebrafish cranial vault development

Émilie Dambroise<sup>1</sup>, Olivia Binder<sup>1</sup>, Ivan Ktorza<sup>1</sup>, Imke. A.K. Fiedler<sup>2</sup>, Kathrin Mletzko<sup>2</sup>, Joanne Edouard<sup>3</sup>, Björn Busse<sup>2</sup>, Frederic Sohm<sup>3</sup>, Laurence Legeai-Mallet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR1163, Paris, France; <sup>2</sup> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hambourg, Allemagne; <sup>3</sup> UMS AMAGEN (UMS 3504 CNRS / UMS 1374 INRA), Gif-sur-Yvette, France

FGFR3 (Fibroblast Growth factor Receptor 3) gain or loss of function mutations result in craniofacial defects such as craniosynostosis and macrocephaly or microcephaly and wormian bones formation. Considering the absence of significant craniofacial phenotype on Fgfr3 mouse models and the relevance of zebrafish model which express strongly fgfr3 during skull development, we decided to generate loss-of-function fgfr3 zebrafish model to decipher the role of FGFR3 during cranial vault (CV) development.

First, to study the role of FGFR3, a receptor tyrosine kinase, on CV development, we inhibited its activity with the FGFR inhibitor NVP-BGJ398. Larvae expressing mCherry in osteoblasts (Tg (osx: mCherry)) were injected with NVPBGJ398 during 15 days every 2 days. Analyses of mCherry expression revealed that the treated fish presented a bigger fontanel area ( $7138 \pm 213 \mu\text{m}^2$ ), compared to control fish ( $5299 \pm 376 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$ ). These data indicate that FGFR inhibition strongly disturbs the CV formation.

Secondly, we established the knock-out fgfr3 zebrafish line. Macroscopic analyses revealed that 3 month-old fgfr3<sup>-/-</sup> fish have craniofacial defects with flat face and microcephaly and they are smaller compared to their control littermates ( $1,850 \pm 0,05$  vs  $2,127 \pm 0,067$  cm,  $p < 0,01$ ). Skeleton analyses using alizarin-red staining and  $\mu\text{CT}$  highlighted that fgfr3<sup>-/-</sup> fish presented modification of craniofacial skeleton shape with impairment of nasal, frontal and parietal bones with presence of wormian bones. Then, we analyzed Tg:(Col2: mcherry; fgfr3<sup>-/-</sup>) larvae and we did not observe cartilage anomalies in fgfr3<sup>-/-</sup> zebrafish. Contrariwise, studies of Tg (osx: mCherry; fgfr3<sup>-/-</sup>) CV development revealed that absence of fgfr3 prevented osteoblast expansion leading to drastic delay of CV formation.

In conclusion, we obtained the first animal model mimicking craniofacial defects observed in Fgfr3 loss-of-function related diseases (Microcephalia, Wormian bones) and we highlighted that FGFR3 is necessary to cranial vault formation and to maintain osteoblasts homeostasis in cranial vault.

Mots clés : FGFR3, Craniofacial-skeleton, Zebrafish

## **O17\* L'immobilisation partielle en condition de neutralité thermique induit une perte osseuse sans modification de l'adiposité médullaire ou des marqueurs de sénescence et d'apoptose ostéocytaire**

Laura Peurière\*, Carmelo Mastrandrea, Marie-Hélène Lafage-Proust, Laurence Vico

INSERM, U1059, Université de Lyon, Saint-Etienne

Le modèle murin de suspension par la queue (SUSP) qui met en décharge les pattes arrière, induit une augmentation de la résorption ostéoclastique et une perte osseuse fémorale et tibiale. Dans ce modèle, analogue des conditions spatiales, la perte osseuse s'accompagnerait d'une augmentation des adipocytes médullaires (BMAT), comme observé dans le vol spatial BION M1 (Gerbaix et al., 2017). Une apoptose ostéocytaire a été démontrée comme facteur essentiel au déclenchement de la perte osseuse induite par un déficit en estrogène, des microfractures ou la prise prolongée de glucocorticoïdes. Cependant, en ce qui concerne la perte osseuse d'immobilisation, les données sont contradictoires (Moriishi et al., 2012; Plotkin et al., 2015; Cabahug-Zuckerman et al., 2016). De plus, de récentes études ont démontré que la SUSP induisait des modifications du métabolisme énergétique, pouvant influencer ces facteurs. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de la SUSP en condition de neutralité thermique sur la perte osseuse et les événements cellulaires associés.

Méthode : Des souris mâles C57BL/J6 de 4 mois ont été acclimatées en cage individuelle à 28°C pendant 4 semaines, n=7-10/groupe. Les souris ont été pesées, appariées et réparties aléatoirement au groupe SUSP ou contrôle (CONT). La suspension dure 5 (J5) ou 14 jours (J14). L'apport alimentaire et les cages des CONT sont identiques à celles des SUSP. Des analyses  $\mu$ CT in vivo sont effectuées à J0, J5 et J14. Le fémur a été collecté à J5 et J14 pour des analyses histomorphométriques, immunohistochimiques (IHC), RT-qPCR et quantification de BMAT après marquage osmium.

Résultats : la SUSP induit une perte osseuse trabéculaire dès J5 avec une diminution du BV/TV de 9.6% et de 23.7% à J14 vs. CONT. Les souris SUSP J14 présentent également une perte osseuse corticale au niveau de la métaphyse distale fémorale avec une diminution de 8,7% de l'épaisseur corticale (Ct.Th), de 6,7% de l'aire corticale (Ct.Ar) et une aire médullaire (Md.Ar) inchangée, suggérant une diminution de l'apposition périostée. Une augmentation significative des surfaces ostéoclastiques trabéculaires de 72.1% à J5 et 100% à J14 est observée chez SUSP vs. CONT. Les paramètres statiques et dynamiques de formation osseuse sont inchangés à J5 et J14. Aucune différence d'expression corticale n'est observée pour les gènes apoptotiques (FOXO3, p27, GADD153), de sénescence (p21, p16, p53), et pour Sclerostin, RANKL, IL6 et MMP13. La quantification de BMAT ne présente aucune variation entre SUSP et CONT à J14 et des résultats IHC préliminaires montrent un nombre très faible et comparable de lacunes vides et d'ostéocytes apoptotiques (caspase 3+) chez SUSP et CONT.

Conclusion : Nos résultats démontrent qu'une suspension de 5 ou 14 jours à neutralité thermique induit une perte osseuse accompagnée d'une résorption ostéoclastique sans augmentation des adipocytes médullaires, ni sénescence ou apoptose ostéocytaire.

Mots clés : Suspension, ostéocytes, neutralité thermique

## O18 Implication de la signalisation yap/taz dans la mecanotransduction osteocytaire

M. Zarka<sup>1</sup>, F. Etienne<sup>2</sup>, M. Bourmaud<sup>1</sup>, C. Helary<sup>3</sup>, K. Kampmann<sup>4</sup>, F. Rannou<sup>2</sup>, E. Haÿ<sup>1</sup>, M. Cohen-Solal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR1132, Hôpital Lariboisière and Paris Diderot University, Paris France ; <sup>2</sup> Inserm UMR-S1124, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris France ; <sup>3</sup> Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, CNRS, Collège de France, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris UMR7574 ; <sup>4</sup> Eurofins GATC Biotech GmbH, Konstanz Allemagne

Les osteocytes sont des cellules mécano-sensibles qui régulent le remodelage osseux en réponse aux contraintes mécaniques. Nous avons émis l'hypothèse que la signalisation YAP/TAZ pourrait être impliquée dans la mécanotransduction ostéocytaire puisque ces deux facteurs jouent un rôle important dans la mécanotransduction et qu'ils interagissent avec plusieurs voies de signalisation régulées au cours de l'ostéoblastogenèse.

L'objectif de cette étude était de définir la réponse des ostéocytes aux contraintes mécaniques et d'identifier l'implication de la signalisation YAP/TAZ.

La lignée ostéocytaire MLO-Y4 a été cultivée en hydrogel de collagène concentré durant 14 jours. Les ostéocytes ont été soumis aux contraintes mécaniques en utilisant l'appareil Flexcell Compression Plus System® avec un régime de compression sinusoïdale à 1 Hz, 40 kPa durant 9 heures. Un RNAseq a été réalisé afin de déterminer les modifications d'expression génique induites par les contraintes mécaniques. Des analyses en immunofluorescence et en Western Blot ont été effectuées à partir des gels de collagène inclus en paraffine et des lysats protéiques totaux respectivement. Les MLO-Y4 ont été transduites avec des shARN dirigés contre YAP et TAZ puis sélectionnés à la puromycine afin d'obtenir des lignées stables.

Les contraintes mécaniques augmentent l'expression de gènes mécano-sensibles tels que E11gp38 et Ptgs2 (x3 et x8 respectivement,  $p < 0.05$ ). L'analyse du RNAseq a démontré que la majorité des gènes cibles de YAP/TAZ modifiée par la compression était augmentée. Ce résultat a été confirmé par RTqPCR avec l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ (Ankdr1 (x2) and Tead4 (x6)  $p < 0.01$ ). Nous avons également observé que la compression induisait la translocation nucléaire de YAP/TAZ (x2,  $p < 0.001$ ) et l'augmentation protéique de YAP/TAZ. De plus, les contraintes mécaniques induisent une augmentation de l'expression d'un large panel de chemokines telles que CXCL3, CXCL5 and CXCL10. Nous avons démontré que YAP/TAZ était impliqué dans la régulation de l'expression de CXCL3 en réponse à la compression puisque le knockdown de YAP/TAZ bloque partiellement l'augmentation de CXCL3 normalement observée. En conclusion, notre modèle nous a permis de mettre en évidence l'activation de la signalisation YAP/TAZ dans les ostéocytes en réponse aux contraintes mécaniques. Nos résultats démontrent la contribution de la signalisation YAP/TAZ dans la mécano-transduction ostéocytaire et dans la régulation de l'expression des chemokines. Cette voie de signalisation représente donc une nouvelle cible potentielle afin de promouvoir le remodelage et l'anabolisme osseux.

Mots clés : Ostéocyte, Mécanotransduction, YAP/TAZ

## O19\* Altered bone marrow adiposity in *pit2*-deficient mice

Giulia Frangi<sup>\* 1</sup>, Greet Kerckhofs<sup>2</sup>, Jérémy Boulestreau<sup>1</sup>, Florent Autrusseau<sup>1</sup>, Joëlle Veziers<sup>3,3,4</sup>, Jérôme Guicheux<sup>1, 3</sup>, Guillaume Penel<sup>5</sup>, Christophe Chauveau<sup>6</sup>, Xavier Prieur<sup>7</sup>, Laurent Beck<sup>1</sup> and Sarah Beck-Cormier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR S 1229, RMeS, STEP group "Skeletal physiopathology and joint regenerative medicine", Université de Nantes, UFR d'Odontologie, Nantes, FRANCE; <sup>2</sup> Skeletal Biology and Engineering Research Center, Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Leuven, BELGIUM; <sup>3</sup> CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, FRANCE; <sup>4</sup> SC3M platform, UMS INSERM 016/CNRS 3556, SFR François Bonamy, Nantes, FRANCE; <sup>5</sup> PMOI EA4490, Univ Lille, Lille, FRANCE; <sup>6</sup> PMOI EA4490, ULCO, Boulogne-sur-mer, FRANCE; <sup>7</sup> INSERM UMR\_S 1087/CNRS UMR 6291, l'Institut du Thorax, Université de Nantes, Nantes, FRANCE

A growing interest in the Bone Marrow Adipose Tissue (BMAT) and its intimate relationship with skeletal health has lately emerged. For instance, BMAT volume is inversely correlated with bone volume during aging and in some clinical conditions such as postmenopausal osteoporosis, anorexia nervosa or diabetes. We recently identified the sodium-phosphate co-transporter *Slc20a2/PiT2* as a regulator of endochondral and intramembranous ossification and a major determinant for bone quality and strength (Beck-Cormier et al 2019).

Despite the skeletal anomalies observed in *PiT2*-deficient mice (*PiT2*KO), primary osteoblast and chondrocyte cultures showed no defect in either cellular differentiation or mineralization, indicating that the observed *in vivo* phenotype may result from *PiT2* deficiency in cells from non-skeletal origin. Given the strong relationship between bone and BMAT, we hypothesize that BMAT is altered in *PiT2*KO mice and impacts on skeletal health. We first examined BMAT volume in *PiT2*WT and *PiT2*KO tibias by immunohistochemistry and Contrast-Enhanced high-resolution  $\mu$ CT (CE-CT) analyses. In P16 *PiT2*KO mice, we observed a 3-fold increase in the number of perilipin+ adipocytes in the proximal and the distal bone marrow (n=6-8 per genotype,  $p < 0.0036$  and  $p < 0.0076$ , respectively). At P21, CE-CT analysis showed a dramatic BMAT volume increase within the proximal part of the *PiT2*KO tibia compared to WT (n=6 per genotype,  $p = 0.0050$ ). Consistent with this, Real-Time qPCR analyses revealed an increased expression of Adiponectin ( $p = 0.0061$ ) and FABP4 ( $p = 0.0424$ ) in whole tibia from *PiT2*KO mice (n=4) compared to WT mice (n=7). To investigate the ability of BMAT to secrete Adiponectin, we have implemented cultures of tibias from P21 *PiT2*KO and WT mice. Immunoblot analysis of conditioned media showed that Adiponectin secretion is increased in absence of *PiT2* (n=3 per genotype, per sex).

The inverse correlation between BMAT and bone volumes could originate from the ability of the Bone marrow Mesenchymal Stromal Cells (BMSCs) to differentiate into adipocytes or osteoblasts. By using a co-differentiation protocol (Ghali et al 2015), our first results reveal an increased number of adipocytes in the absence of *PiT2* (+70.8%,  $p = 0.0286$ ).

To elucidate the molecular mechanisms involved in the action of *PiT2*, we performed a yeast two-hybrid screen and identified putative *PiT2* proteic partners involved in skeletal and/or adipose tissues physiology. The interactions of *PiT2* with 4 of these partners have been confirmed by co-immunoprecipitation and further strengthening a putative role of *PiT2* at the interface between bone and BMAT that may be independent from its phosphate transport function.

Altogether, our results suggest *PiT2* as a potential new player in the communication between bone and adipose tissues and reveal the *PiT2*KO mice as a new model to better understand the role and regulation of BMAT in bone physiology.

Mots clés : *PiT2*, bone, bone marrow, adipose tissue

## Ozo\* Reprogrammation du chondrocyte par lin28a : application à l'arthrose

Yohan Jouan<sup>\*1,2</sup>, Joanna Sanna<sup>1,2</sup>, Augustin Latourte<sup>1,2,3</sup>, Pascal Richette<sup>1,2,3</sup>, Hang-Korng Ea<sup>1,2,3</sup>, Martine Cohen-Solal<sup>1,2,3</sup>, Eric Hay<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Paris Diderot Université, Paris, France ; <sup>2</sup>Inserm 1132, Paris, France ; <sup>3</sup>Hopital Lariboisière, Paris, France

Le cartilage articulaire est connu pour ses faibles capacités de régénération et de progresser vers un phénotype arthrosique avec des lésions irréversibles. Nous avons précédemment montré que la surexpression de Lin28a permettait de reprogrammer le chondrocyte et de protéger le cartilage de la dégradation. Nous démontrons dans un premier temps que HMGA2 constitue la cible principale des effets de Lin28a en induisant la transcription de Sox9, et dans un second temps que Lin28a possède un rôle physiopathologique puisque son KO aggrave le phénotype arthrosique du chondrocyte.

In vitro, des souriceaux de 7 jours ont été utilisés afin de récupérer les chondrocytes. L'inhibition ou la surexpression de HMGA2 a été réalisée par infection avec un lentivirus. Les échantillons ont été utilisés afin de réaliser un ChiP, Western Blot et une coloration Bleu Alcian. In vivo, l'arthrose a été induite chirurgicalement par ménisectomie. La semaine suivante, la délétion de Lin28a a été réalisée. Les souris WT et hétérozygotes ont été utilisées comme contrôles, et le genou gauche comme Sham. Le cartilage articulaire a été analysé 8 semaines après ménisectomie.

La surexpression de HMGA2 augmente la production de matrice (fois 9,  $p < 0.01$ ), l'expression de Sox9 et réduit significativement l'expression des gènes cataboliques. Le sh HMGA induit des effets opposés en inhibant l'anabolisme et en augmentant le catabolisme chondrocytaire. De plus, l'expérience de ChiP montre la fixation de HMGA2 sur des sites de régulation du promoteur de Sox9. In vivo, aucune différence sur le volume et la structure de l'os sous-chondrale n'a été observée entre les souris WT et KO pour Lin28a. En revanche, la délétion de Lin28a dans le chondrocyte aggrave fortement le phénotype arthrosique. Cette aggravation est associée à une augmentation significative l'expression de marqueurs cataboliques comme la MMP13 et à une diminution de marqueurs anaboliques comme Sox9 et PRG4.

Nous démontrons donc ici, les effets physiologiques protecteurs de Lin28a sur l'arthrose. De plus, le facteur HMGA2 constituant la cible principale de Lin28a, orchestre les effets de Lin28a sur le catabolisme et l'anabolisme chondrocytaire.

Mots clés : Osteoarthritis, Chondrocyte, Lin28a

## O21 Une supplémentation nutritionnelle en poudre de nacre accroît la masse trabéculaire osseuse chez des souris âgées

Bruno Jessel<sup>1</sup>, Norbert Laroche<sup>2</sup>, Mireille Thomas<sup>2</sup>, Marie-Thérèse Linossier<sup>2</sup>, Myriam Normand<sup>2</sup>, Arnaud Vanden Bossche<sup>2</sup>, Laurence Vico<sup>2</sup>, Patrice Laquerriere<sup>1</sup>, Marthe Rousseau<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UMR 7178 CNRS/Unistra, IPHC, Strasbourg, France ; <sup>2</sup> U1059 INSERM/Université de Lyon, SAINBIOSE, Saint Etienne, France

La nacre, ou mère de la perle, est un composite de carbonate de calcium acellulaire produit par des bivalves comme les huîtres perlières, sous forme de revêtement intérieur de leur coquille. La poudre de nacre de l'huître perlière japonaise *Pinctada fucata* et ses molécules extraites ont montré un effet préventif de la perte osseuse dans un modèle d'ostéoporose induite par l'ovariectomie chez la souris. Dans la présente étude, nous avons analysé l'effet de la supplémentation en poudre de nacre chez des souris âgées.

La poudre de nacre des coquilles de l'huître perlière polynésienne *Pinctada margaritifera* a été administrée par voie orale (25mg/kg/jour) à des souris femelles âgées de 22 mois (n=10), pendant 28 jours. Les souris témoin (n=8) ont reçu de l'eau. En fin d'expérience, la microarchitecture de l'os cortical et celle de l'os trabéculaire ont été évaluées par microtomodensitométrie. Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse (CTX), et de la formation osseuse (ostéocalcine et P1NP) ont été dosés dans le sérum, et l'expression de marqueurs de la formation et de la résorption osseuse a été étudiée dans le cortex fémoral et la moelle osseuse par qRT-PCR.

L'administration de poudre de nacre à des souris vieillissantes a entraîné une augmentation significative du volume trabéculaire du fémur distal (17%,  $p < 0,05$ , test Mann-Whitney) avec un accroissement de l'épaisseur des travées. A 28 jours les valeurs de CTX, d'ostéocalcine et de P1NP sériques étaient plus faibles chez les souris traitées, suggérant une diminution de l'activité osseuse. La poudre de nacre a été bien tolérée et n'a induit ni variation de poids ni effets secondaires dans d'autres organes évalués par anatomo-pathologie.

En conclusion, la supplémentation nutritionnelle en nacre a montré un effet positif sur la quantité d'os trabéculaire chez les souris de 22 mois. L'effet d'une durée plus longue d'administration est en cours d'étude dans notre laboratoire, ainsi que la recherche des composés bioactifs responsables de cette action ostéogénique.

Mots clés : Nacre, Ostéoporose, Vieilles souris

## O22\* Impaired claudin-16 tight junction protein alters enamel formation through acid transcellular pathway

Mamadou Tidiane Diallo \*<sup>1</sup>, Sandy Ribes<sup>1</sup>, Caroline Prot-Bertoye<sup>2,4</sup>, Tilman Breiderhoff<sup>3</sup>, Dominik Muller<sup>3</sup>, Pascal Houillier<sup>2,4</sup>, Catherine Chaussain<sup>3,5</sup>, Claire Bardet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 2496, Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies, Paris Descartes Dental School, Université de Paris, Paris, France; <sup>2</sup> Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>3</sup> Department of Pediatric Nephrology, Charité University School of Medicine, Berlin, Germany; <sup>4</sup> AP-HP, Renal and Metabolic Diseases Unit, and reference center of children and adult renal hereditary diseases (MARHEA) – Georges Pompidou Hospital, Paris, France; <sup>5</sup> AP-HP, Odontology Department, and Reference Center for rare diseases of the metabolism of calcium and phosphorus, Nord Val de Seine Hospital (Bretonneau), Paris, France

Claudin (Cldn)-16 tight junction (TJ) component associates with Cldn-19 to form cation-selective pore allowing paracellular reabsorption of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. These two proteins are expressed in the ameloblast TJ of murine tooth germs and in the cortical thick ascending limb of Henle's loop (CTAL) in the kidney. Loss-of-function mutations in Cldn16 and Cldn19 genes result in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC) associated to Amelogenesis Imperfecta (AI) in humans. Using a murine model of FHHNC (Cldn16 KO mice), we showed that lack of Cldn-16 strongly impaired TJ organization in secretory ameloblasts. Interestingly, the abnormal enamel matrix protein processing was associated to a significantly lower pH value of the forming enamel matrix. Here, we aimed to decipher how impaired TJs alter the pH in the forming enamel matrix, and determine the function of claudins during enamel formation. We first performed transcriptome analyses of Cldn16 KO micro-dissected secretory ameloblasts, indicating a modified expression of genes involved in apical junction integrity and in pH regulation compared to WT. We then studied paracellular permeability to H<sup>+</sup> ion using the micro-dissected CTAL as a model and did not find any difference in Cldn16 KO CTAL compared to WT CTAL. Afterwards, we sought to investigate transcellular ion transporters involved in the pH cycling necessary for normal enamel formation in the continuously growing incisor. Immunostaining and WB showed a higher expression of carbonic anhydrase II and ATP6VoA1 component of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in Cldn16 KO ameloblasts. We examined H<sup>+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase activities using vinblastine and acetazolamide inhibitors, respectively, and showed that both activities were significantly increased in Cldn16 KO ameloblasts.

Taken together, our data suggest that the lower pH value of the forming enamel matrix in Cldn-16 KO mice is likely due to an alteration of the transcellular acid transport rather than to an impaired paracellular permeability to H<sup>+</sup>. Furthermore, this study highlights the importance of TJ proteins in enamel formation, providing new insights regarding the mechanisms that determine enamel pH during tooth formation.

## O23\* "PALAEOSHELLOMICS": biomolecular identification of prehistoric pearl shell ornaments

Jorune Sakalauskaite <sup>\* 1,2</sup>, Søren Andersen <sup>3</sup>, Maria Borrello <sup>4</sup>, Paolo Biagi <sup>5</sup>, Carlo Colonese André <sup>6</sup>, Théophile Cocquerez <sup>2</sup>, Federica Dal Bello <sup>7</sup>, Claudio Medana <sup>7</sup>, Alberto Girod <sup>8</sup>, Marion Heumüller <sup>9</sup>, Hannah Koon <sup>10</sup>, Giorgia Mandili <sup>11</sup>, Kirsty Penkman <sup>12</sup>, Laurent Plasseraud <sup>13</sup>, Helmut Schlichtherle <sup>14</sup>, Sheila Taylor <sup>12</sup>, Caroline Tokarski <sup>15</sup>, Jérôme Thomas <sup>2</sup>, Julie Wilson <sup>16</sup>, Frédéric Marin <sup>2</sup>, Beatrice Demarchi <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, Italy; <sup>2</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, University of Burgundy - Franche-Comté, Dijon, France; <sup>3</sup> Moesgaard Museum, Aarhus, Denmark; <sup>4</sup> Département de géographie et environnement, University of Geneva, Switzerland; <sup>5</sup> Department of Asian and North African Studies, University of Ca' Foscari, Italy; <sup>6</sup> BioArCh, University of York, UK; <sup>7</sup> Department of Chemistry, University of Turin, Italy; <sup>8</sup> Italian Malacological Society, Switzerland; <sup>9</sup> Niedersächsisches Landesamt für Denkmalpflege, Germany; <sup>10</sup> Archaeological Sciences, University of Bradford, UK; <sup>11</sup> Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, University of Turin, Italy; <sup>12</sup> Department of Chemistry, University of York, UK; <sup>13</sup> UMR 6302 ICMUB, University of Burgundy - Franche-Comté, Dijon, France; <sup>14</sup> Landesamt für Denkmalpflege im Regierungspräsidium Stuttgart, Germany; <sup>15</sup> CNRS UMR5248 CBMN, University of Bordeaux, France; <sup>16</sup> Department of Mathematics, University of York, UK

Shell ornaments are one of the oldest and most widespread symbolic objects in prehistory. The selection of certain molluscan species as raw material reflects cultural and social aspects behind people's choices, for example perceived "prestige" (often linked to the "exotic" nature of the shells), but also the persistence of traditional crafts.

However, thorough study of tiny shell ornaments (and their identification) is complicated - the samples are often very small and microdiagnostics features are usually obliterated due to the manufacture process and/or degradation.

We exploit the technological advances in biomolecular archaeology, biogeochemistry and biomineralization to obtain an in-depth investigation of archaeological shell ornaments. Our multi-analytical approach, that also includes the novel application of palaeoproteomics to shells ("PalaeShellOmics") and actually to any invertebrate systems - for the first time enables to look at tiny shell ornaments at the molecular level.

Here we present a study on thousand-years-old pearl-like ornaments, "double-buttons", from three European prehistoric sites: a shell midden in Denmark (Havnø), a submerged pile dwelling settlement on Lake Constance (Hornstaad-Hörnle IA) and a cave site in Transylvania (Peștera Ungurească) dating between ~4200 and ~3800 BCE. We analyse the intra-crystalline shell proteins, which are trapped inside the mineral skeleton, are stable over archaeological timescales and can give insight onto the biological origin. Yet, the main challenge of "paleoshellomics" lies in the characterisation of the proteomes, due to the near absence of genomic datasets for mollusc shells and the phylogenetic diversity and complex evolutionary history of these organisms. We discuss different approaches to data analysis that we have attempted in order to overcome some of these issues.

Our analysis reveals a consistent exploitation of freshwater shells in all of the sites revealing the spread of ideas and material culture during Neolithic. The finding also show that freshwater mother of pearl was a 'prestige' raw material, suggesting that local riverine environments held an important place in the minds of prehistoric people, even where the marine resources were abundant. Finally, this work shows the valuable exchange of knowledge throughout the disciplines and how biomineralization can help to answer far reaching archaeological questions.

Mots clés : Biomineralization, Palaeoproteomics, Biomolecular archaeology



**O24\* Heterogeneity in inflammatory osteoclasts provokes alterations in their inflammatory phenotype and bone resorption capacity**

Maria-Bernadette Madel <sup>\* 1,2</sup>, Lidia Ibáñez <sup>1,2,3</sup>, Matthieu Rouleau <sup>1,2</sup>, Antoine Boutin <sup>1,2</sup>, Christophe Hue <sup>4</sup>, Isabelle Duroux-Richard <sup>5</sup>, Florence Apparailly <sup>5</sup>, Henri-Jean Garchon <sup>4</sup>, Abdelilah Wakkach <sup>1,2</sup> and Claudine Blin-Wakkach <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de Médecine, Nice, France ; <sup>2</sup> Université Côte d'Azur, Nice, France ; <sup>3</sup> Department of Pharmacy, Cardenal Herrera-CEU University, Valencia, Spain; <sup>4</sup> INSERM U1173, Faculty of Health Sciences Simone Veil, Université de Versailles Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France; <sup>5</sup> INSERM U1183, Institute for Regenerative Medicine and Biotherapies, Université de Montpellier, Montpellier, France

Osteoporosis is characterized by bone destruction but also by overactivation of inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells resulting in enhanced osteoclastogenesis and inflammatory bone loss. Recently, our team showed that besides bone resorption, osteoclasts (OCLs) are immunocompetent cells that, depending on their origin and inflammatory status, induce different types of T cell responses. We characterized tolerogenic OCLs (t-OCLs) that initiate regulatory CD4<sup>+</sup> T cells and inflammatory OCLs (i-OCLs) that induce TNF $\alpha$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells. As presented last year, transcriptomic profiling of these two OCL populations and our previous findings identified the fractalkine receptor CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> to be upregulated in ~25% of i-OCLs (CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup>) while ~75% are CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> (p=0.001; log<sub>2</sub>FC=3.2). Subsequent in vitro assays showed that CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs had higher osteoclast differentiation capacity and higher potential to activate TNF $\alpha$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells (p=0.0007). Therefore, our present aim was to characterize the heterogeneity of these two i-OCL populations and to determine the exact role of CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> and CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs.

To achieve this goal, we sorted in vitro generated i-OCLs based on their CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> expression and analysed the CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> and CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs in a comparative RNA-sequencing approach. Transcriptomic data revealed two entirely distinct populations of i-OCLs that differ in numerous functional and molecular pathways including osteoclast differentiation, antigen presentation and T cell stimulation underlining our previous observations. In addition, genes related to bone resorption were significantly upregulated in CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs. When seeding mature CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> or CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs at the same cell density on a resorbing matrix, we corroborated a significantly higher resorption capacity in CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs compared to CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs (p<0.0001). Interestingly, immune suppressive pathways and immunosuppressive genes such as PD-L1 were highly upregulated in CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs (p=0.0023). In vitro experiments confirmed that besides reduced T cell activation (p=0.0007), presence of CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs had a strong immunosuppressive effect on CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs thereby reducing their inflammatory capacity. These data suggest a negative feedback mechanism of CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs in inflammation.

Our results emphasize the heterogeneity of i-OCLs and enable new insights in their inflammatory function. They suggest that in inflammatory conditions, CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>neg</sup> i-OCLs play a major inflammatory role, while CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs act as immune suppressive cells controlling inflammation. A deeper characterization of the role of CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> in i-OCLs is ongoing thanks to transcriptomic profiling of CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>+</sup> i-OCLs from CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>-KO and control mice.

Mots clés : Osteoimmunology, Osteoclasts, Inflammation

**O25\* PTH-induced bone anabolism promotes systemic breast cancer growth and metastasis**

Yetki Aslan \* , Lea Hanna Doumit Sakr , Judith Luce , Rafailia Vakasiri , Claire-Sophie Devignes & Sylvain Provot

INSERM U1132 and Paris Diderot University, Paris, France

Clinical studies have shown that high bone mass correlates with increased risk of breast cancer, regardless of patient exposure to estrogen. However, the biological mechanism by which the skeleton could influence cancer progression in patients is unknown. Using various genetic mouse models, we previously demonstrated that the activation of HIF signaling in hypoxic osteoprogenitors, which increases bone formation, distantly promotes primary mammary tumor growth, and systemic breast cancer metastasis to numerous organs. Hence, increased bone formation in mice leads to systemic breast cancer progression. This suggests that patients treated with bone anabolic agents could be at risk for breast cancer. Parathyroid hormone (PTH) is the only bone-anabolic agent used in clinic. The risk of breast cancer associated with PTH treatment has not been evaluated.

To assess the effect of PTH-induced bone anabolism in breast cancer, wild-type immune-competent mice received daily injections of PTH (80 µg/kg) for 3 weeks. This led to increased bone mass, as expected. PTH-pretreated or PBS-injected (control) mice were inoculated 48 hours after the last PTH/PBS injection with syngeneic breast cancer cells, by intracardiac injections to assess tumor dissemination, or by orthotopic transplantation in the mammary gland to assess primary tumor growth.

Our results demonstrate that PTH pretreatment dramatically increases primary tumor growth and systemic metastasis to tissues distant from the skeleton. We next determined whether activation of the PTH receptor (PTH<sub>1R</sub>) in osteoblasts is responsible for the systemic tumorigenic effect observed upon PTH treatment. We reasoned that if this were the case, expressing a constitutive active form of PTH<sub>1R</sub> specifically in osteoblasts (Col1-PTH<sub>1R</sub>ca mice) would mimic the effect of PTH treatment. We observed that Col1-PTH<sub>1R</sub>ca mice, which have a high bone mass phenotype, develop significantly bigger primary mammary tumors, and more metastases in bones and soft tissues located away from the skeleton, compared to control animals.

Together, our data demonstrate that PTH-induced bone anabolism increases systemic breast cancer growth and metastasis, and indicate that this effect is mediated by activation of PTH signaling in osteoblast lineage cells. This discovery is important since it suggests that patients treated with bone anabolic agents are at risk for breast cancer.

Mots clés : PTH, Breast Cancer, Bone microenvironment

## O26 Pathobiology of osteoarticular lesions and effects of conventional treatment in the murine model of x-linked hypophosphatemia

Volha V. Zhukouskaya <sup>1,2,3,7</sup>, Axelle Cauliez <sup>1</sup>, Carole-Anne Faraji-Bellée <sup>1,4</sup>, Benjamin Salmon <sup>1,4</sup>, Thorsten Schinke <sup>5</sup>, Annamaria Colao <sup>3</sup>, Agnès Linglart <sup>2,6,7</sup>, Catherine Chaussain <sup>1,4,7</sup>, Claire Bardet <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies EA 2496, Paris Descartes Dental School, Université de Paris, Paris, France; <sup>2</sup> APHP, Department of Endocrinology and Diabetology for children, Bicêtre Paris-Sud Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France; <sup>3</sup> Department of Clinical Medicine and Surgery, Division of Endocrinology, University of Naples Federico II, Naples, Italy; <sup>4</sup> Dental Medicine Department, Bretonneau Hospital, APHP, Paris, France; <sup>5</sup> Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany; <sup>6</sup> Paris Sud – Paris Saclay University, Faculté de Médecine, Le Kremlin- Bicêtre, France; <sup>7</sup> APHP, Reference Center for Rare Disorders of the Calcium and Phosphate Metabolism, Filière OSCAR and Platform of expertise for rare diseases Paris-Sud, Bicêtre Paris-Sud Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France

X-Linked Hypophosphatemia (XLH) is the most common form of genetic rickets (1/20000). Mainly diagnosed during childhood with growth retardation and deformities of the lower limbs, this disease also affects adults with early and progressive formation of osteoarticular lesions that significantly alter the quality of life. The conventional treatment, based on phosphorus supplementation and active vitamin D analogs and commonly administrated from early childhood to the end of growth, does not allow a complete recovery of skeletal manifestations. Despite childhood treatment, cartilaginous tissue complications occur in adults and become a dominant feature in the natural history of the disease. Our previous data showed that, when compared to litter mate wild type mice, Hyp mice, a murine model of XLH, developed early osteoarticular lesions, whom severity gradually increased over 12 months. Here, we studied the impact of the conventional treatment on the progress of these lesions during growth and young adulthood, using the Hyp mouse model. Mice were supplemented with oral phosphorus and calcitriol injections, following two timelines: i) from 3 weeks to 3 months to analyze the effects of early treatment on the skeleton and on early osteoarticular lesion formation, and ii) from 2 months to 3 months to evaluate the effects of treatment on the evolution of already formed osteoarticular lesions. We showed that the conventional treatment given since the early stage delayed osteoarticular lesion formation, improved bone mineralization and micro architecture, however without noticeable effect on enthesopathies. In contrast, later administration in young adults had a limited efficacy on the evolution of osteoarticular lesions. Our data highlight the relevance of the Hyp murine model for preclinical studies on osteoarticular lesions. Further studies are needed to compare these outcomes with the potential benefits of new biotherapies such as the anti-FGF23 antibodies in order to allow a better management of XLH.

## O27\* Évaluation of the cellular communication between the vascular and the sensory nervous systems

Alice Leroux <sup>\*1</sup>, Bruno Paiva dos Santos <sup>1</sup>, Hugo Oliveira <sup>1</sup>, Jacques Leng <sup>2</sup> et Joëlle Amédée <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bioingénierie Tissulaire (BioTis), INSERM U1026, Université de Bordeaux, Bordeaux, France ; <sup>2</sup> Laboratory of the Future (LOF), UMR 5258 CNRS/Solvay/Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Recent evidence suggests a role of the sensory nervous system in angiogenesis, bone repair and regeneration [1]. Our team previously demonstrated that sensory neurons (SNs) induce the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells [2]. Here, we study the cellular communication between SNs and endothelial cells (ECs) in order to assess the influence of the sensory nervous system on angiogenesis.

Rat primary dorsal root ganglia-derived SNs and bone marrow-derived ECs were cultivated using microfluidic platforms. This indirect co-culture approach allows us to physically separate cellular bodies from the distinct cells types and cultivate them in their respective culture medium, permitting their communication only through microchannels, thus better mimicking the in vivo physiological microenvironment. Specific immunostaining with  $\beta$ -III-tubulin (SNs) and phalloidin (ECs) after 4 days of culture was performed. After 4 and 7 days of culture, ECs expression of genes involved in triggering angiogenesis processes and extracellular matrix remodeling was assessed. Concentration and activity of Mmp2/Mmp9 were also evaluated using the InnoZyme<sup>TM</sup> Gelatinase (Mmp2-Mmp9) Assay kit and zymography, respectively. Commercial calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) were used at different concentrations in the culture media of ECs seeded in 48-wells plates.

After 4 days of culture, SNs could emit neurites through the microchannels towards the ECs compartment, where they closely interact. The presence of SNs upregulated ECs gene expression of *Angpt1*, *Vegfa* and *Mmp2*. In particular, a 20-fold upregulation of *Mmp2* was observed after 7 days in ECs cultured in presence of SNs. Further analysis showed the same results for *Mmp2/Mmp9* at a protein level. Both enzyme concentration and activity were significantly increased in ECs when they were co-cultured with SNs. In order to identify potential soluble factors involved in these effects, ECs gene expression was assessed in contact with CGRP (0.1 nM – 1  $\mu$ M) or SP (10 nM – 100  $\mu$ M). *Mmp2* gene expression was modulated in presence of SP, being upregulated 13 folds in 100 nM SP. The further investigation of the exact role of CGRP and SP on endothelial cell function, using specific inhibitors, is ongoing.

Taken together, our results suggest that SNs can closely interact with ECs. SNs may be able to modulate the expression of vascular endothelial genes towards vessel formation and extracellular matrix remodeling. In addition, SP seems to be one of the soluble factors responsible for this latter effect.

### REFERENCES

- [1] Marrella A et al. *Mater Today* (Kidlington). 2018; 21(4):362-76
- [2] Silva DI et al. *Cell Death and Dis.* 2017; 8(12):3209

Mots clés : Bone innervation, Angiogenesis, Extracellular matrix remodeling

## O28 Role autocrine de cxcl12 dans l'auto-renouvellement et la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses squelettiques

J. Nguyen <sup>1</sup>, V. Rondeau <sup>1</sup>, A. Bonaud <sup>1</sup>, A. Boutin <sup>2</sup>, Z. Abou-Nader <sup>1</sup>, M. Aurrand-Lions <sup>3</sup>, S. Mancini <sup>3</sup>, M. Espéli <sup>1</sup>, C. Blin <sup>2</sup>, A. Anginot <sup>1</sup>, M. Rouleau <sup>2</sup>, and K. Balabanian <sup>1</sup>

<sup>1</sup>. INSERM UMRS1160, Institut de Recherche Saint-Louis, Université Paris-Diderot, Paris, France ; <sup>2</sup>. LP2M-UMR 7370 CNRS, Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France ; <sup>3</sup>. CRCM, Inserm U1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Univ U105 - Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Le tissu osseux est un environnement complexe assurant à la fois des fonctions mécaniques et de réserves en ions et minéraux, mais régulant également l'hématopoïèse par le biais de niches spécifiques. Il est maintenant bien décrit chez la souris qu'au sein de la moelle osseuse, les niches impliquées dans le maintien et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) font intervenir des cellules stromales mésenchymateuses et vasculaires ainsi que des facteurs environnementaux. En revanche, les connaissances actuelles sur le développement et le maintien de l'architecture stromale médullaire ainsi que sur l'identité et le degré de plasticité des cellules souches mésenchymateuses (CSM) y participant sont relativement limitées. CXCL12 est une chimiokine pouvant se lier à deux récepteurs, CXCR4 et ACKR3/CXCR7. Elle est impliquée dans la régulation des CSH. Afin d'étudier les activités du trio CXCL12/CXCR4-ACKR3 dans l'homéostasie du stroma médullaire, nous avons utilisé un modèle de souris portant une mutation germinale "gain de fonction de CXCR4" identifiée chez des patients atteints d'une immunodéficience héréditaire rare, le Syndrome WHIM. Nous avons établi que la désensibilisation de CXCR4 en réponse à CXCL12 est requise intrinsèquement et extrinsèquement pour le maintien de la masse osseuse chez la souris adulte. En effet, nos travaux révèlent que plusieurs souspopulations de cellules mésenchymateuses stromales, dont les ostéoblastes, sont diminuées dans les souris mutantes, et ce de façon dose-dépendante de l'allèle mutant. En conséquence, les souris mutantes présentent une ostéopénie sévère. Nos résultats *in vitro* démontrent également que la désensibilisation de CXCR4 est requise à la régulation de l'équilibre quiescence/cycle des CSM. De plus, la différenciation ostéoblastique *in vitro* à partir de CSM isolées de ces souris est fortement altérée par rapport aux cellules isolées de souris contrôle. Paradoxalement, une détection accrue de CXCL12 est observée à la fois dans la moelle osseuse des souris mutantes mais aussi dans les cultures ostéoblastiques et l'ajout d'AMD3100, un antagoniste de CXCR4, permet de restaurer la différenciation ostéoblastique *in vitro*.

Par conséquent, ces résultats suggèrent que les actions autocrines et paracrines de l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 au sein des CSM régulent leur potentiel ostéogénique tout en contribuant au maintien des niches des CSH et au processus d'hématopoïèse.

Mots clés : Biologie osseuse, cellules souches mésenchymateuses, désensibilisation de CXCR4

# PRÉSENTATIONS POSTER

## **P1\*** Atomic force microscopy and x-ray photoelectron spectroscopy to investigate human osteoarthritic cartilage

Ilhem-Lilia Jaabar\* <sup>1,2</sup>, Antoine Miche <sup>2</sup>, Kristell Wanherdrick <sup>1</sup>, François-Paul Ehkirch <sup>3</sup>, Francis Berenbaum <sup>1</sup>, Xavier Houard <sup>1</sup>, Jessem Landoulsi <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), INSERM UMRS-938 Sorbonne Université, F-75012 Paris, France ; <sup>2</sup> Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), CNRS UMR-7197 Sorbonne Université, F-75005 Paris, France ; <sup>3</sup> Clinique Maussins-Nollet, F-75019 Paris, France

Osteoarthritis (OA) is characterized by an irreversible degradation of articular cartilage and an abnormal remodeling of the subchondral bone. The reorganization of the cartilage-bone interface is decisive in the development and progression of this pathology. We hypothesize that the composition and the organization of the extracellular matrix, particularly at the cartilage-bone interface, play a pivotal role in disease progression [1]. In this study, we use X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and atomic force microscopy (AFM) to probe, respectively, the composition and the morphology of human cartilage at different OA scores. For this purpose, several procedures of sample preparation were evaluated, including tissue embedding (in paraffin vs OCT) and decalcification process (with vs without ultrasonic treatment). A methodology developed for bio-organic/inorganic interface and adapted for cartilage is used to extract fine chemical information from XPS data (proteins, proteoglycans, polysaccharides, ...) [2]. The organization of type II collagen fibrils and their dimensions are determined from AFM images, showing structural evolution with the disease progression. Complementary information regarding OA score is provided by means of histology tests. This approach, combining biochemical and physicochemical characterizations, provides a relevant way to probe the evolution of the cartilage/bone interface during osteoarthritis.

### Références

- [1] Houard et al. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 2012 (23Suppl8; 841-6)
- [2] Landoulsi et al. Organic adlayer on inorganic materials: XPS analysis selectivity to cope with adventitious contamination. *Applied Surf Sci.* 2016 (383; 71-83)

Mots clés : cartilage, atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

## **P2\* Proteomic approaches for shell biominerals: insights into the biomineralization of mediterranean spiny oyster spondylus gaederopus**

Jorune Sakalauskaite \*<sup>1,2</sup>, Jérôme Thomas<sup>2</sup>, Marie Albéric<sup>3</sup>, Mathieu Thoury<sup>4</sup>, Laurent Plasseraud<sup>5</sup>, Beatrice Demarchi<sup>1</sup>, Frédéric Marin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, Turin, Italy; <sup>2</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, University of Burgundy-Franche-Comté, Dijon, France; <sup>3</sup> CNRS LCMCP, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; <sup>4</sup> IPANEMA USR3461 CNRS/MCC, Synchrotron SOLEIL, France; <sup>5</sup> UMR 6302 ICMUB, University of Burgundy - Franche-Comté, Dijon, France

Mollusc shells are one of the most fascinating systems for studying the fundamental processes of biocalcification. Viewed as a niche in the field of biomineralization, shells have attracted a lot of interest over the years, with many studies exploring the molecular and biomechanical aspects of these biominerals. However, considering the size of phylum and the great diversity of shell structural architectures, our knowledge on the mechanisms controlling biomineralization is still very limited. This is especially evident for “non-model” systems, which are poorly studied and thus the information on their skeletal matrix is very scarce.

We aim to get a deeper insight into the formation of *Spondylus gaederopus* shell, which would extend our knowledge on the mechanisms of biomineralization for “non-standard-model” systems. We present our biomolecular study on the organic shell matrix and its synergy with the mineral skeleton: this is one of the first studies attempting to probe the whole set of biomolecules (proteins, sugars, and pigments) trapped inside the shell skeleton.

Our data reveals the peculiarities of the “biomolecular toolkit” controlling *Spondylus* shell biomineralization, compared to the molecular information known for closely related taxa, such as Pectinidae and Ostreidae. We discuss possible methods for “big data” analysis and interpretation, given the paucity of comparative ‘omics datasets for non-model system. Our study also sheds light onto the organic matrices of crossed-lamellar structures: these are one of the most common among bivalves and are known to have very interesting mechanical properties, often being compared to nacre. The work highlights the complexity and rapid evolution of molluscan skeletal matrices.

Finally, we ask ourselves and the conference attendees an important question for the future: what drives the selection of model organisms for biomineralization studies? Many studies have focused on commercially important species. Our starting point is cultural: *Spondylus* has been an iconic shell since Prehistory, and the presence of *Spondylus* ornaments can help the archaeologists to track the movements and cross-cultural interactions of prehistoric communities. Our biomolecular data will contribute to important archaeological projects.

Mots clés : Biomineralization, Mollusc shells, Proteomics



### **P3 An injectable antibacterial fibrin-based hydrogel for dental pulp regeneration**

Stéphanie Gobert<sup>1</sup>, Mourad Bekhouche<sup>1</sup>, Marie Bolon<sup>1</sup>, Fanny Charriaud<sup>1</sup>, Myriam Lamrayah<sup>1</sup>, David Da Costa<sup>1</sup>, Arthur Costantini<sup>1</sup>, Marielle Padeloup<sup>1</sup>, Frédéric Mallein-Gerin<sup>1</sup>, Bernard Verrier<sup>1</sup>, Maxime Ducret<sup>1,2</sup>, Jean-Christophe Farges<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique, UMR5305 CNRS, Université Lyon 1, Lyon, France ; <sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Service de Consultations et Traitements Dentaires, Lyon, France

Dental caries is a widespread chronic infectious disease which affects more than half of the world's population and is considered a leading public health problem by the World Health Organization [1]. When the dental pulp (DP) is irreversibly damaged, classical treatment consists of removing the DP tissue from the endo-dontic space, then disinfecting and filling the latter with gutta percha. This treatment results in a dead tooth, which is function-al but unable to detect a new invasion by oral bacteria owing to the absence of a living pulp. In addition, since endodontic dis-infection is seldom complete, endodontic space re-colonization often occurs and leads to further tooth degradation [2].

The main objective of this project is to design an appropriate scaffold able to prevent the growth of residual endodontic bacteria, and also to support dental pulp tissue regeneration. Our aim was to create an injectable fibrin-based hydrogel allowing matrix deposition from dental pulp mesenchymal stem cells.

An injectable fibrin-based hydrogel allowing matrix deposition from dental pulp mesenchymal stem cells was developed [3]. We also characterized the dental pulp-mesenchymal stem/stromal cell (DP-MS-C) response within the fibrin hydrogel by evaluating DP-MS-C viability (LiveDead® test), collagen production (RT-qPCR and immunohistochemistry). To provide the antibacterial property in narrow spaces, nanoparticles (NPs) containing an antibiotic were developed. We choose the antibiotic clindamycin for its wide spectrum antibacterial property and for its easy clinical use notably in case of tooth infections in penicillin-allergic patients.

Results: Results indicate that fibrin in the form of a hydrogel stimulates human DP tissue neoformation by promoting DP-MS-C viability and spreading, as well as DP-like ECM deposition (collagen I and III). Poly(D,L)lactic acid (PLA-)NPs encapsulating the antibiotic clindamycin were synthesized. These nanoparticles display no notable changes in NP size (160 nm diameter) and polydispersity index when compared to empty NPs. These NPs encapsulate the clindamycin with high efficiency. Work is under progress to characterize antibiotic release from the hydrogel and antibacterial potency.

This new project proposes an innovative nanocomposite injectable hydrogel for dental pulp regeneration and disinfection. This tool will be easily valuable for other applications in tissue engineering.

Mots clés: Dental pulp mesenchymal stem-stromal cells/ Fibrin Hydrogel/ Regenerative dentistry.

## **P4\*** Évaluation par spectroscopie IRM des caractéristiques régionales de l'adiposité médullaire à la hanche de patientes suivies pour anorexie mentale

Sammy Badr \*<sup>1,2</sup>, Isabelle Legroux-Gérot<sup>1,3</sup>, Jean Vignau<sup>1,4</sup>, Christophe Chauveau<sup>5</sup>, Stefan Ruschke<sup>6</sup>, Dimitrios C Karampinos<sup>6</sup>, Jean-François Budzik<sup>1,7</sup>, Bernard Cortet<sup>1,3</sup>, Anne Cotten<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, EA 4490 - PMOI - Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, F-59000 Lille, France ; <sup>2</sup> CHU Lille, Service de radiologie et imagerie musculosquelettique, F-59000 Lille, France ; <sup>3</sup> CHU Lille, Service de rhumatologie, F-59000 Lille, France ; <sup>4</sup> CHU Lille, Service d'addictologie, F-59000 Lille, France ; <sup>5</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 4490 - PMOI - Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France ; <sup>6</sup> Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany ; <sup>7</sup> Service d'Imagerie Médicale, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille / Université Catholique de Lille, F-59000 Lille, France

L'adiposité médullaire est un tissu aux caractéristiques sous-estimées, pouvant potentiellement modifier les propriétés mécaniques de l'os, en particulier en cas de maladies le fragilisant, telle que l'anorexie mentale. Dans notre étude, nous avons évalué les caractéristiques régionales de l'adiposité médullaire à la hanche de femmes anorexiques ayant un indice de masse corporelle (IMC) anormalement bas (n = 40) ou ayant récupéré un IMC normal (n = 36), ainsi que celles de 10 témoins. À partir d'acquisitions effectuées par spectroscopie IRM à plusieurs localisations anatomiques (acétabulum, col fémoral, région intertrochantérique et grand trochanter), la fraction adipeuse médullaire osseuse (bone marrow fat fraction, BMFF) et le degré d'insaturation apparent (apparent lipid unsaturation level, aLUL) ont été mesurés. Les corrélations entre BMFF, aLUL, pourcentage de masse grasse (body fat percentage, BF) et densité minérale osseuse (DMO) au col fémoral et à la hanche totale, tous deux évalués par absorptiométrie biphotonique à double énergie, ont été analysées chez les patientes anorexiques.

Alors que la BMFF était significativement plus faible et l'aLUL significativement plus élevé au col fémoral des volontaires saines comparativement aux patientes anorexiques ayant un IMC bas ou normal (BMFF : 81.3±8.1% versus 90.1±6.7% et 90.3±7.5% ; aLUL: 9.2±1.5% versus 7.6±1.4% et 7.3±1.3% respectivement), la BMFF et l'aLUL n'étaient significativement pas différents entre les 2 sous-groupes de patientes. Par ailleurs, 3 propriétés particulières ont pu être mises en évidence entre l'adiposité médullaire et les autres paramètres évalués chez les patientes anorexiques. Tout d'abord, des modifications synergiques ont été observées dans toutes les localisations anatomiques, avec une relation inverse entre BMFF et aLUL ( $\rho = -0.88$ ). Deuxièmement, une association entre les compartiments osseux minéral et adipeux a pu être confirmée, étant donné qu'il existait une corrélation inverse significative entre la DMO à la hanche totale et la BMFF quel que soit le site excepté le grand trochanter ( $\rho = [-0.32;-0.29]$ ), ainsi qu'une corrélation positive entre DMO à la hanche totale et aLUL quel que soit le site excepté la région intertrochantérique ( $\rho = [0.25;0.37]$ ). Enfin, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre BF et BMFF au col fémoral ( $\rho = 0.35$ ), et une corrélation négative entre BF et aLUL pour cette même localisation anatomique ( $\rho = -0.33$ ), suggérant une relation complexe entre adiposité médullaire et BF. Au final, l'adiposité médullaire possède des spécificités régionales qui peuvent potentiellement fragiliser l'os chez les patientes anorexiques, même en cas de récupération d'un IMC normal.

Mots clés : IRM, Adiposité médullaire, Anorexie mentale

## **P5\*** Biological response to hybrid functionalized collagen membrane for dental applications

Marie Dubus<sup>1</sup>, Johan Sergheraert \*<sup>1</sup>, Fabienne Quilès<sup>2</sup>, Halima Alem<sup>3</sup>, Isabelle Royaud<sup>3</sup>, Sophie C Gangloff<sup>1</sup>, Fany Reffuveille<sup>1</sup>, Cédric Mauprivez<sup>1</sup>, Hassan Rammal<sup>1</sup>, Halima Kerdjoudj<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 4691 BIOS, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France ; <sup>2</sup> CNRS, UMR 7564, LCPME, Université de Lorraine, Nancy, France ; <sup>3</sup> CNRS, UMR 7198, IJL, Université de Lorraine, Nancy, France

Collagen membrane, barrier in maxillofacial bone regeneration, prevents the ingrowth of fibrous tissue into the bone defect impairing bone regeneration. Functionalization of the bone facing membrane with osteoinductive properties could improve bone healing. We report here a hybrid calcium phosphate/biopolymers functionalized collagen membrane as a new strategy for bone regenerative medicine in dental field.

We used a straightforward process based on simultaneous spray coating of interacting species to functionalize collagen membrane with biomimetic calcium phosphate (CaP) coating supplemented with chitosan (CHI) and hyaluronic acid (HA). Physicochemical characterizations of resulting CaP-CHI-HA coating were performed by scanning electron microscopy with a field emission gun (FEG-SEM), high-resolution transmission electron microscopy coupled to electron diffraction (HR-TEM), X-rays photoelectron and infrared (XPS and FTIR) spectroscopies. Biocompatibility of coated membrane was evaluated after 7 days of human mesenchymal stem cells (MSCs) culture through metabolic activity assay (WST-1) and DNA quantification. MSCs morphology was investigated by confocal laser scanning microscopy (CLSM). MSCs pro-healing properties were analyzed through supernatant cytokines and growth factors quantification (ELISA).

FEG-SEM images showed the presence of star-shaped particles wrapped in organic film, confirmed by TEM. Furthermore, HR-TEM, in addition to FTIR spectroscopy and XPS, indicated the presence of non-stoichiometric and poorly crystalline hydroxyapatite. WST-1 and DNA quantification showed a higher proliferation of MSCs on CaPCHI- HA coating. Cytoskeleton labeling highlighted spread, elongated and aligned MSCs on coated membrane (vs randomly distributed cells on bare membrane). No significant difference was observed in MSCs inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) secretion between bare and coated membrane, whereas osteoprotegerin and angiogenic growth factors (VEGF, bFGF) releases in supernatant were increased in presence of CaP-CHI-HA coating. Thus, CaP-CHI-HA coated membrane provides a suitable environment for MSCs to induce bone healing.

Finally, CaP-CHI-HA coating allowed to reduce significantly *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on collagen membrane, conferring anti-adhesive bacteria function to this surface. Therefore, buildup of CaP-CHI-HA on collagen membrane provides an interesting material for maxillofacial bone regeneration.

Mots clés : collagen membrane, hybrid coating, alveolar bone regeneration

**P6 The increased BMP-2/BMP-4 ratio in the joint of patients with spondyloarthritis parallels the inflammation- and stretch-induced imbalance observed in cultured chondrocytes**

Anne Briolay<sup>1</sup>, Alaeddine El Jamal<sup>1</sup>, Benoît Legoff<sup>2,3</sup>, Frédéric Blanchard<sup>2</sup>, David Magne<sup>1</sup>, Carole Bougault<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR5246 ICBMS, Lyon, France ; <sup>2</sup> INSERM UMR1238, Nantes, France ; <sup>3</sup> CHU Nantes, Nantes, France

Excessive bone formation in the entheses, where tendons and ligaments attach to bone, is one of the features of spondyloarthritis (SpA). Complex pathological mechanisms connecting inflammation and mechanical stress are probably involved. We focused on the Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-2, -4 and -7 as possible mediators of this process that can result in ossification.

In synovial fluids of SpA patients, if BMP-7 was barely detectable, BMP-2 content was higher and BMP-4 was lower than in osteoarthritic samples. Actually, BMP-2/BMP-4 ratio was increased by almost 6 folds. For SpA patients, BMP-2 levels correlated osteoprotegerin (OPG) content and C-reactive protein (CRP) concentration. An even stronger correlation was observed between OPG and the BMP-2/BMP-4 ratio. Treatment of mouse organotypic ankle cultures with a pro-inflammatory cocktail composed of TNF- $\alpha$ , IL-22, IL-17, IL-6 and IL-1 $\beta$  induced a comparable imbalance between BMP-2 and BMP-4 at mRNA level. Mouse primary chondrocytes, osteoblasts or tenocytes were treated with TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-17 or IL-22: wherever Bmp-2 and/or Bmp-4 gene expression was regulated, the balance also tilted in favor of Bmp-2. Similar results were obtained in response to mechanical stimulation by dynamic stretching. Chondrocytes were the most responsive cell type and simultaneous application of TNF- $\alpha$  and cyclical stretch for 6 hours induced a 30-fold increase of the Bmp-2/Bmp-4 ratio. Adding recombinant BMP-2 or -4 on chondrocytes and tenocytes had osteoinductive effects. Slightly different dose effects were observed, BMP-4 seeming more effective than BMP-2 in inducing alkaline phosphatase activity and gene expression in both cell types.

Our results with patients first settle that BMP factors are deregulated locally in the SpA joint. Very similar deregulation was observed when challenging our explant and cell models by mechanical or inflammatory stimulations. Our data globally suggest that an unexpected decrease in BMP-4 could be associated to an increase in BMP-2 in SpA joints. More investigations are needed to decipher how this imbalance could cause abnormal ossification in SpA entheses. Nevertheless, our results established the interest of further investigating BMP pathways in SpA patients.

Mots clés: BMP, Spondyloarthritis, Chondrocytes

**P7\* Role of HSF1 in osteosarcoma initiation and development**

Brice Moukengue \*<sup>1</sup>, Robel Tesfaye<sup>1</sup>, Souad Kolli<sup>3</sup>, Céline Charrier<sup>1</sup>, Séverine Battaglia<sup>1</sup>, Marc Baud'huin<sup>1,2</sup>, Thibaut Quillard<sup>1</sup>, Valentina Boeva<sup>3</sup>, Benjamin Ory<sup>1</sup> and Francois Lamoureux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR1238 Phy OS, Nantes, France ; <sup>2</sup> CHU de Nantes, Nantes, France ; <sup>3</sup> Institut Cochin, Paris, France

With 7 cases per million each year, osteosarcoma (OS) is the most common primary bone tumor, affecting mainly children and young adults. OS is characterized by an alteration of the bone remodeling process and metastatic dissemination mainly to the lungs. The current treatment associates chemotherapy with surgical resection of the tumor. Unfortunately, the five years survival rate in case of metastases and for the bad responders stays low (30% at 5 years) despite the improvements. There is an urgent need to develop new therapeutic approaches. HSF1 (Heat Shock Factor I) is a member of the Heat Shock Factor family of proteins. This transcription factor is the major regulator of the Heat Shock Response (HSR), the cell's response to stress (heat shock, UV, hypoxia, oxidative stress, heavy metals...). It has been shown that HSF1 is overexpressed in several cancer types (lung, colon, breast...), but also in cancer associated fibroblasts, and its overexpression is a poor prognosis factor in breast cancer. For a long time, HSF1 role in cancer had been limited to HSR and the regulation of the chaperones, the guardian of proteostasis in the cell. But recently, several studies have shown that HSF1 regulates a large transcription network involved in the initiation and progression of the tumor. HSF1 deletion in mice reduces the number of apparition of sarcomas, after exposition to carcinogenic compounds. In OS, it has been shown that HSF1 is involved in cell proliferation, migration and invasion.

The goal of this study is to define the importance of HSF1 in OS. In that aim, HSF1 biological function will be studied, as well as its regulated genes. The study will also try to identify HSF1 partners and their impact on its action. And finally, the study will evaluate the impact of HSF1 inhibition on the biology of the tumor cell.

We showed that HSF1 is overexpressed in OS cell lines, and in biopsies from OS patients, compared to human mesenchymal stem cells. We also confirmed the involvement of HSF1 in OS cells proliferation. Using Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) sequencing and RNA sequencing, after HSF1 inhibition by RNA interference, we identified hundreds of target genes that are both bound and regulated by HSF1. This list includes known oncogenes such as members of the FOS family. Through Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME), we identified hundreds of potential HSF1 partners on DNA, including proteins which involvement has been described in bone development, bone diseases and cancer.

These results indicate that HSF1 involvement in OS is more important and complex than previously thought.

Funded by : Ligue contre le cancer (29, 44, 49), SFCE, Fondation ARC, Association Enfants Cancres Santé

Mots clés : Osteosarcoma, HSF1, Proteostasis

## P8 Biominéralisation coquillière chez le lièvre de mer *Aplysia* sp

Frédéric Marin<sup>1</sup>, Davorin Medakovic<sup>2</sup>, Andrej Jaklin<sup>3</sup>, Jérôme Thomas<sup>1</sup>, Asher Schmidt<sup>4</sup> et Laurent Plasseraud<sup>5</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne - Franche-Comté, Dijon, France ; <sup>2</sup> Cesta za Mondelaco 2, Rovinj, Croatie ; <sup>3</sup> Center for Marine Research Rovinj, Ruđer Bošković Institute, Rovinj, Croatie ; <sup>4</sup> Schulich Faculty of Chemistry, Technion Israel Institute of Technology, Haïfa, Israël ; <sup>5</sup> UMR CNRS 6302 ICMUB, Université de Bourgogne - Franche-Comté, Dijon, France

Encore appelée lièvre de mer, l'aplysie est un gastéropode marin herbivore à répartition mondiale. Il appartient à un ordre, Anaspidea, très dérivé du point de vue évolutif car ayant émergé tardivement, au Cénozoïque, il y a environ 50 millions d'années. Le mode de développement de la coquille des aplysies est tout à fait particulier et compte parmi les apomorphies (caractères dérivés) de ce groupe : en effet, la coquille minéralisée externe chez les formes larvaires s'internalise progressivement, peu après la métamorphose, chez les formes adultes, jusqu'à devenir vestigiale et sans réelle fonction de protection, bien que toujours calcifiée. Si les aplysies sont des animaux-modèles en neurobiologie et en pharmacologie (molécules bioactives), en revanche pratiquement rien n'est connu des processus moléculaires de formation de leur coquille, et en particulier, de la nature de la matrice extracellulaire qui "fabrique" cette biominéralisation vestigiale.

Nous avons étudié la structure et la biochimie de la coquille de trois espèces d'aplysie, *A. californica*, *A. fasciata* et *A. punctata*. A cette fin, nous avons employé la microscopie électronique à balayage, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'état solide, ainsi que des techniques biochimiques et protéomiques après extraction de la matrice coquillière.

La coquille d'aplysie est aragonitique et présente de nombreuses couches minéralisées, principalement "lamellaire croisée" ou fibreuses. Par rapport à une coquille externe classique, elle est très fortement enrichie en organique (10-15% du poids de coquille) et cet organique, principalement distribué dans la couche la plus externe, est dominé par la chitine et des complexes chitino-protéiques. Trois dizaines de protéines environ, constituant le répertoire sécrétoire coquillier, ont été identifiées par analyse protéomique. Parmi celles-ci, on distingue des enzymes, des inhibiteurs de protéase, des protéines à domaines extracellulaires, ainsi que de nombreuses protéines à domaines de faible complexité (LCD), répétitifs ou non. Bien que de nombreuses séquences comportent des domaines fonctionnels répertoriés, les fonctions réelles de ces protéines - notamment celles à structures modulaires - demeurent inconnues.

Une comparaison avec le répertoire coquillier de mollusques conchifères bien étudiés montre que les protéines d'aplysie ont pour la plupart des homologies extrêmement limitées, suggérant qu'elles pourraient être propres à ce groupe, et non pas héritées de formes plus anciennes. Il est cependant intéressant de noter que malgré ces faibles similitudes, le répertoire d'aplysie a gardé une 'signature typique' de répertoire calcifiant avec la présence d'inhibiteurs de protéases et de protéines à domaines LCD hydrophobes ou acides. Ces résultats illustrent la grande plasticité des matrices calcifiantes chez les mollusques, et, de manière générale, chez les métazoaires.

Mots clés : biominéralisation, mollusque, protéomique

## P9 Imagerie osseuse et transparisation, une nouvelle histologie en vue ?

Arnaud Vanden Bossche <sup>1</sup>, Denis Ressnikoff <sup>2</sup>, Marie-Hélène Lafage-Proust <sup>1</sup>, Laurence Vico <sup>1</sup>, Alain Guignandon <sup>1</sup>

<sup>1</sup> : INSERM U1059 – Sainbiose- Université de Lyon, Saint-Etienne ; <sup>2</sup> : CIQLE Rockefeller, Fac Med Lyon-Est, Université de Lyon, Lyon

La transparisation des tissus vise à homogénéiser les indices de réfraction pour limiter les phénomènes de réfraction/diffusion de la lumière. Plusieurs équipes ont déjà montré que l'os (souris transgéniques *osx-gfp*) pouvait être transparisé et imagé in toto grâce à la microscopie à feuillet de lumière (Light Sheet Fluorescent Microscopy, LSFM) après déminéralisation. Il est également possible selon certaines modalités de conserver les minéraux puis de rendre l'os transparent. Nous avons donc combiné les 2 approches pour imager des os entiers minéralisés en LSFM avec les enjeux suivants : pas d'usage d'acrylamide, conservation de l'intégrité du tissu, visualisation de marquages dynamiques de formation osseuse (alizarine, calcéine) et observation des réseaux vasculaire et ostéocytaire in toto. Pour cela, notre approche expérimentale a été d'injecter in vivo chez la souris à des temps très antérieurs à la mise à mort de l'animal (mois, semaines, jours) des marqueurs de front de minéralisation puis des traceurs vasculaires (nanobilles, Dextran HW) ou ostéocytaires (fluorescéine, Dextran LW, albumine) injectés juste avant la mise à mort de l'animal. Les images réalisées en LSFM montrent qu'il est possible d'imager les fronts de minéralisation osseuse sur des fémurs ou des tibias entiers. Ces images rendent compte de leur localisation dans les différents compartiments (périoste/endoste, antéro-postérieur etc). La visualisation du réseau vasculaire intra-osseux et intramédullaire est aussi accessible avec cette technique. L'utilisation d'un objectif x5 en LSFM empêche la visualisation du réseau canaliculaire des ostéocytes mais pas celle des lacunes et de leur perfusion par la fluorescéine. Des observations en microscopie confocale à plus haute résolution, sont également possibles sur des sections d'os de 300µm transparisés. Ces coupes transversales marquées in-vivo peuvent en plus être marquées ex-vivo avec d'autres traceurs (DAPI, Phalloïdine, DiO, anticorps). L'observation des surfaces de formation osseuse, des réseaux vasculaires d'une part et ostéocytaire d'autre part constituent un ensemble d'information, obtenues à différentes échelles, qui permettra de mieux comprendre les interactions spatiotemporelles entre ces différentes structures. Toutefois, des solutions robustes doivent être mises en place dans la gestion des grandes quantités d'information numériques générées et leur quantification. Nous avons débuté un programme d'analyse quantitative en 3D avec des mathématiciens et des opticiens dans le cadre de l'EUR Manutech-Sleight IDEX Lyon sur des os murins transparisés après défis mécaniques et génétiques. La transparence du tissu osseux ouvre donc d'immenses possibilités de visualisations de structures tissulaires ou cellulaires spécifiques tout en gardant une vue générale du tissu.

Mots clés : Transparisation, Histologie

**P10\* Regulation of osteochondral remodeling by hypertrophic chondrocyte-derived factors during osteoarthritis**

Indira Toillon \*<sup>1</sup>, Sandy van Eegher<sup>1</sup>, Maria-Luisa Perez-Lozano<sup>1</sup>, Éric Hay<sup>2</sup>, Francis Berenbaum<sup>1</sup>, Xavier Houard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012, Paris, France ; <sup>2</sup> Université Paris Diderot, INSERM, BIOCANVAS, F-75018, Paris, France

Osteoarthritis (OA) is a whole-joint disease mainly characterized by cartilage degradation and subchondral bone pathological remodelling, including bone resorption at early stages and the development of neovessels at the bone-cartilage interface. We hypothesize that the osteochondral angiogenesis is pivotal in OA progression, allowing cartilage disappearance and bone sclerosis, and that it's driven by chondrocytes that become hypertrophic in OA cartilage.

Our laboratory developed a unique model of progressive differentiation of murine immature articular chondrocytes (IMACs) into prehypertrophic (Prehyp) and hypertrophic (Hyp) chondrocytes. The expression of angiogenic/angiostatic and osteoclastogenic factors by IMACs, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes was analyzed by RT-qPCR and ELISA. Proliferation assay of endothelial cells in response to IMAC, prehypertrophic and hypertrophic chondrocyte conditioned media was determined by EdU incorporation. Differentiation of the monocyte cell line raw 264.7 into osteoclast in response to IMAC, prehypertrophic and hypertrophic chondrocyte conditioned media was performed and the percentage of multinuclear TRAP positive cells was counted. Adherence of fluorescent endothelial cells on primary cultures of chondrocytes was assessed by spectrophotometry.

Differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes was associated with an increased mRNA and protein expression of angiogenic factors, including VEGF-a, VEGF-c and SDF-1. In contrast, a decreased mRNA expression of the angiostatic factors CHM1 and ANGPTL4 was observed. An increased expression of osteoclastogenic genes (IL-34, CCL4, RANKL/OPG ratio and SDF-1) was also observed with the hypertrophic differentiation of chondrocytes. Proliferation assay on HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) showed that hypertrophic chondrocyte conditioned media displayed a stronger endothelial cell proliferation activity than IMAC and prehypertrophic chondrocyte conditioned media. Hypertrophic chondrocyte conditioned media also have a positive effect on osteoclastogenesis, by promoting the differentiation of raw 264.7 monocytes into osteoclasts. Secreted factors by hypertrophic chondrocytes might be implicated in those effects, but the chondrocyte extracellular matrix can also be an important actor of cell communication between chondrocytes and endothelial cells. To evaluate the possible interactions between these two cell types, an adherence assay of fluorescent human (HUVECs) and murine (MS-1: Mile Sven-1) endothelial cells was performed. The first results show that endothelial cells tend to adhere more on hypertrophic chondrocyte extracellular matrix. These findings suggest that the differentiation of prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes in the deeper layer of OA cartilage, close to the vascularized subchondral bone, is a crucial step in the osteochondral angiogenesis and osteoclastogenesis in OA.

Mots clés : Chondrocyte, Angiogenesis, Bone remodeling



**P11 MIR-342-3P regulates the generation of osteoclasts**

Claire Lozano<sup>1</sup>, Valentin Estibals<sup>1</sup>, Maria-Bernadette Madel<sup>2</sup>, Claudine Blin-Wakkach<sup>2</sup>, Isabelle Duroux-Richard<sup>1</sup>, Florence Apparailly<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Regenerative Medicine and Biotherapies, University of Montpellier, INSERM U1183, CHU Montpellier, Montpellier, France; <sup>2</sup> CNRS, LP2M, UMR7370, University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France

Beyond their crucial role in bone remodeling, osteoclasts (OCL) are critical to immune responses. Heterogeneity of OCL precursors impacts on their capacity to polarize the immune adaptive response. It has been shown that monocytes (MN) and dendritic cells (DC) differentiate into OCL, which display tolerogenic or inflammatory properties, respectively. The molecular mechanisms driving OCL functional heterogeneity remain however unknown.

Objectives: To identify genes that discriminate MN-derived OCL and DC-derived OCL, and to investigate their role in OCL differentiation.

MN-OCL and DC-OCL were generated from CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> cells isolated from mouse bone marrow, respectively (n=10/group).. Total RNAs were extracted and miRNA transcriptomic analysis performed. Markers differentially expressed were validated using RT-qPCR. Gain- and loss-of function studies were performed for a candidate miRNA that distinguishes between MN-OCL and DC-OCL using the RAW264.7 cell line. RT-qPCR of OCL genes, TRAP staining, osteo-assay, apoptosis, mobility and acting ring formation were monitored during kinetic studies of OCL differentiation.

The miRNome analysis identified a 19-miRNA signature discriminating MN-OCL from DC-OCL (p value < 0.05 and FC > 2). Among these, miR-342-3p was 5-fold expressed in DC-OCL than in MN-OCL (p=0.018). RT-qPCR confirmed miR-342-3p as discriminating marker of DC-OCL and MN-OCL (p=0.0013, AUC=0.901). During OCL differentiation, miR-342-3p expression progressively decreased. Overexpression of miR-342-3p in RAW264.7 cells increased OCL differentiation as compared with controls, while miR-342-3p neutralization markedly reduced OCL differentiation. This later effect was due to increased apoptosis and reduced mobility of OCL progenitors.

Our study identified miRNAs able to discriminate OCL subsets and suggested that miR-342-3p might play a role in the inflammatory DC-OCL functions by promoting OCL differentiation.

Mots clés : osteoclast, microRNA, miR-342-3p

## **P12\* Impact de l'indoxyl-sulfate sur la minéralisation des cellules interstitielles de la valve aortique**

Alexandre Candellier \* <sup>1,2</sup>, Maria Grissi <sup>1</sup>, Cédric Boudot <sup>1</sup>, Carine Avondo <sup>1</sup>, Gaëlle Lenglet <sup>1</sup>, Gabriel Choukroun <sup>1,2</sup>, Jean-Marc Chillon <sup>1,3</sup>, Saïd Kamel <sup>1,4</sup>, Michel Brazier <sup>1,4</sup>, Lucie Hénaut <sup>1</sup>

<sup>1</sup>- Laboratoire MP3CV, EA 7517, Université de Picardie Jules Verne, Amiens France ; <sup>2</sup>- Service de Néphrologie, Hémodialyse et Transplantation, CHU Amiens-Picardie, France ; <sup>3</sup>- Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation, CHU Amiens-Picardie, France ; <sup>4</sup>- Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens-Picardie, France

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est une pathologie valvulaire fréquente qui touche près de 10% des patients insuffisants rénaux chroniques (IRC). Son pronostic est sombre avec une mortalité ajustée 3 fois plus importante qu'en population générale et une médiane de survie d'un an et demi. L'arsenal thérapeutique est actuellement très limité et peu d'études se sont intéressées à la physiopathologie du RAC chez les patients IRC. L'accumulation de toxines urémiques telles que l'indoxyl-sulfate (IS) a montré des effets pro-calcifiants sur les cellules vasculaires. En outre, de récentes études suggèrent que l'IS est à l'origine de la polarisation des macrophages dans un phénotype inflammatoire susceptible d'aggraver le processus de calcification. Objectifs : Déterminer le rôle de l'IS dans le processus de calcification, par ses effets directs sur les cellules valvulaires interstitielles humaines (hVICs) et indirects par l'intermédiaire de la polarisation des macrophages (THP1).

Ce travail a été réalisé à partir (1) de hVICs provenant de remplacements chirurgicaux, (2) de monocytes de la lignée THP1. Des concentrations croissantes d'IS : 0,5 µg/mL (ISn), 37 µg/mL (ISmoy), 233 µg/mL (ISMax) ont été utilisées. Les hVICs ont été cultivées en conditions pro-calcifiantes (2,7 mmol/L Ca<sup>2+</sup> / 2,5 mmol/L Pi). Les monocytes THP1 ont été préalablement différenciés en macrophages par exposition pendant 48h au PMA (100 ng/mL). 1- Les effets directs de l'IS sur la différenciation ostéogénique et la calcification des hVICs ont été évalués par qRT-PCR (suivi des marqueurs BMP2 et RunX2) et mesure du calcium par la méthode au crésolphtaléine, respectivement. La survie des hVICs a été évaluée par MTT. 2- Le caractère inflammatoire des macrophages THP1 a été évalué par qRT-PCR en suivant les marqueurs (IL-1B, IL-6, IL-8, TNF-α et CCL2).

Résultats : 1- L'IS favorise de façon dose dépendante la calcification des hVICs. Cet effet est associé à une augmentation des marqueurs de différenciation ostéogénique runX2 (+60%, p<0,05) et Bmp2 (+50%, p<0,05) et à une altération de 40% (p<0,05) de la viabilité cellulaire. 2- L'exposition des macrophages Mo à des concentrations croissantes d'IS favorise l'expression d'IL-1 (p<0,01), de TNF-α (p<0,01), IL-6 (p<0,01), IL-8 (p<0,01) et CCL2 (p<0,01), connus pour leurs effets pro-calcifiants.

L'IS montre des effets directs sur la différenciation ostéogénique et la calcification des cellules valvulaires humaines. L'effet délétère de concentrations élevées d'IS sur la survie pourrait amplifier ce phénomène. L'exposition des macrophages à l'IS favorise leur polarisation vers un phénotype M1 proinflammatoire qui pourrait favoriser le développement du RAC. L'utilisation de milieux conditionnés provenant des macrophages exposés ou non à l'IS permettra de vérifier l'impact de cette polarisation sur la calcification des hVICs.

Mots clés : rétrécissement aortique calcifié, cellule valvulaire interstitielle humaine, indoxyl-sulfate.

### **P13\*** Régulation des facteurs yap/taz par la calpaïne-6 dans des cellules souches d'ostéosarcome

Joëlle Tchicaya Bouanga \*, Emilie Chotard, Dominique Modrowski

INSERM UMR 1132 BIOSCAR, Paris, France

Nous avons montré précédemment que l'expression de la calpaïne-6 (calp6) permet d'identifier une population de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des ostéosarcomes et que la suppression de la calp6 dans des lignées murines et humaines abolit les capacités des cellules à former des tumeurs osseuses et des métastases pulmonaires chez la souris.

Le but de notre étude est de caractériser les mécanismes qui lient la calp6 au développement tumoral. Les facteurs YAP/TAZ jouent également un rôle clé dans la tumorigenèse et dans la promotion du phénotype de CSC. Ici, nous avons cherché à déterminer si l'activité YAP/TAZ est modifiée dans les CSC exprimant la calp6. Tout d'abord, parce que la calp6 est surtout présente dans des zones hypoxiques des tumeurs et est induite par l'hypoxie dans les CSC, nous avons examiné les effets de l'hypoxie sur l'activité YAP/TAZ grâce au plasmide rapporteur GT11c et en mesurant l'expression de CTGF (connective tissue growth factor). L'activité transactivatrice de YAP/TAZ était fortement réduite dans les cellules cultivées avec 3% d'O<sub>2</sub>. Cet effet était indépendant de la calp6. Nous avons utilisé une lignée d'ostéosarcome humain exprimant (143B Calp6+) ou non (143B Calp6KD) la calp6. L'activité de YAP/TAZ était diminuée dans les cellules Calp6+ par rapport aux cellules Calp6KD indépendamment du niveau d'oxygène. L'examen par Western blot et immunofluorescence a montré que l'hypoxie n'a pas modifié le niveau des protéines YAP/TAZ, alors que la calp6 a induit une forte accumulation de YAP/TAZ dans le cytoplasme. De façon cohérente, nous avons observé que les niveaux de phospho-LATS1 étaient moins élevés dans les cellules 143B Calp6+ vs Calp6KD après une nuit de culture en absence de sérum. Cependant, 30 minutes après l'ajout de sérum, la différence de phosphorylation entre les deux types cellulaires n'était plus observable. La stabilité de YAP/TAZ est régulée par le complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. Or, la calp6 a induit également une accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme et une diminution de l'activité TOPFlash. De plus, la calp6 a supprimé l'activation de GT11c et TOPFlash par du Wnt3a suggérant que la disponibilité du complexe de destruction était réduite dans les cellules Calp6+. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ dans les cellules Calp6+ n'était donc pas associée à une plus grande dégradation des facteurs. Cette inhibition pourrait être la conséquence de modifications du cytosquelette d'actine, notamment, de la disparition des fibres de stress observée dans ces cellules. Finalement, un traitement de 2 jours avec l'inhibiteur de YAP/TAZ, la verteporfin a réduit l'expression de ces facteurs et a supprimé l'arrêt en G<sub>2</sub>/M des cellules calp6+.

En conclusion, la calp6 module la sensibilité des CSC aux facteurs du microenvironnement et supprime l'activité transcriptionnelle dépendante de YAP/TAZ et  $\beta$ -caténine au profit d'un pool cytoplasmique qui participe à la régulation du cycle cellulaire.

Mots clés : Ostéosarcome, Cellules souche cancéreuse, Calpaïne-6, YAP/TAZ

## **P14 Excessive mechanical loading increase bone remodeling and angiogenesis through gremlin-1 and bmp-4 in osteoarthritis**

Maria-Luisa Pérez-Lozano<sup>1</sup>, Danièle Citadelle<sup>1</sup>, Laure Sudre<sup>1</sup>, Sandy van Eegher<sup>1</sup>, Indira Toillon<sup>1</sup>, Frédéric De Ceuninck<sup>2</sup>, Philippe Pastoureau<sup>2</sup>, Francis Berenbaum<sup>1,3</sup>, Xavier Houard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France ; <sup>2</sup> Servier Research Institute, Department of Rheumatology, F-92150 Suresnes, France ; <sup>3</sup> Department of Rheumatology, AP-HP Saint-Antoine Hospital, F-75012 Paris, France. Labex Transimmunomics, DHU i2B

Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal degenerative disease. OA is mainly characterized by an irreversible cartilage degradation and a subchondral bone remodeling. The development of new vessels coming from the subchondral bone and reaching the cartilage is suspected to play a role in the endochondral ossification process reactivated in OA, bone sclerosis and cartilage disappearance. The increased vascular density in weight-bearing joints suggests that excessive mechanical loading of bone cells may play a role in the angiogenic process. The angiogenesis and bone formation processes depend on the regulation of a complex network of activators and inhibitors. The mechanisms leading to osteochondral angiogenesis in OA remain to be determined. Hence, we investigated whether excessive mechanical load regulates the expression and secretion by osteoblasts of factors involved in osteochondral angiogenesis and bone remodeling.

Primary cultures of osteoblasts isolated from the skulls of new born C57BL/6 mice were compressed or not at a mechanical strain of 10 % of 1.67 MPa and a frequency of 1 Hz for 4 and 24 hours. The mRNA expression and protein secretion were assessed by real-time quantitative PCR, ELISA and western-blotting. The conditioned media were used to study the proliferation and angiogenesis capacity of endothelial cells. Immunohistochemical analyses in OA human samples were made to confirm the expressions of proteins induced by mechanical loading.

The mechanical compression of osteoblasts for 4 hours induced a general increase in the mRNA expression of factors involved in cartilage and bone homeostasis (BMP-2, BMP-4). In addition, the compression induced an increase in both angiogenic and angiostatic factors. After 24 hours of compression, there was a strong decreased expression of factors involved in joint homeostasis (BMP-2) and osteoclasts activation (SDF-1 et ratio RANKL/OPG). Furthermore, a downregulation of the mRNA expression of the angiostatic factors TSP-1 and ANGPTL-4 was observed, as well as a decreased mRNA expression of the angiogenic factors VEGF and bFGF. However, mechanical stress also upregulated the mRNA expression of the homeostatic factor BMP-4 and its antagonist Gremlin-1. The immunohistochemical analyses showed an increased expression of Gremlin-1 and BMP-4 in human tissue with advanced OA. Furthermore, the conditioned media after 24 hours of loading increased the proliferation capacity of endothelial cells.

The results show that a short compression time (4h) modified the expression pattern of osteoblasts without affecting their global angiogenic and remodeling potential. However, a longer compression (24h) led to an increase in the angiogenic and bone formation potential of osteoblasts. Our results thus suggest that angiogenesis and bone formation at the OA junction may result in part from a prolonged excessive mechanical stress through Gremlin-1 and BMP-4.

Mots clés : angiogenesis, bone remodeling, osteoblast compression

## **P15\* Dopages inorganique et organique d'un substitut osseux tridimensionnel constitue de bioverre et polycaprolactone**

Henri Granel \*<sup>1</sup>, Cédric Bossard<sup>2</sup>, Anne-Margaux Collignon<sup>3</sup>, Fabien Wauquier<sup>1</sup>, Julie Lesieur<sup>3</sup>, Gaël Y Rochefort<sup>3</sup>, Edouard Jallot<sup>2</sup>, Jonathan Lao<sup>2</sup>, Yohann Wittrant<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Université Clermont Auvergne; INRA UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine (UNH), Clermont-Ferrand, France ; <sup>2</sup>: Université Clermont Auvergne; CNRS/IN2P3 Laboratoire de Physique de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France ; <sup>3</sup>: Faculté de chirurgie dentaire, Paris Descartes EA2496 Laboratoire Pathologies Imagerie et Biothérapies orofaciales, Montrouge, France

Avec l'âge et dans certaines conditions pathologiques, les mécanismes de la régénération osseuse deviennent moins performants et la prévalence des troubles ostéo-articulaires augmente. Dans ces conditions, le traitement peut devenir particulièrement difficile même en utilisant des biomatériaux qui présentent des propriétés ostéoinductives intrinsèques comme les bioverres (BV). Dans ce contexte, le dopage des substituts osseux revêt une importance capitale. Deux grandes classes de composés sont utilisées comme agent dopant, les éléments chimiques inorganiques et les molécules organiques bioactives.

Malheureusement, les méthodes de productions des substituts osseux actuels ne permettaient pas d'obtenir des biomatériaux monophasiques bioactifs intégrant dans leurs structures des composés organiques sensibles. De plus, les facteurs de croissance, les agents dopants utilisés le plus fréquemment, peuvent être sujets à discussion. La recherche de molécules alternatives présente donc un intérêt certain.

Récemment, des membres de notre consortium ont breveté un procédé permettant de synthétiser des scaffolds hybrides constitués de BV et de polycaprolactone (PCL). La biocompatibilité ainsi que l'effet positif sur la régénération osseuse de ce type de biomatériaux a pu être démontrée.

Ses conditions de synthèse nous ont permis d'y intégrer de manière homogène (dans la masse du biomatériau) différents agents dopants. Ainsi, un composé inorganique ostéoinducteur, le strontium, a pu être ajouté. De même, des composés organiques ont été intégrés et notamment la fisétine et l'hydroxytyrosol, des composés de la famille des polyphénols qui ont déjà montré un effet positif sur le métabolisme osseux. Afin d'évaluer le potentiel de ces types de dopage, une étude in vitro a été réalisée à l'aide d'un modèle d'ostéoblastes primaires de rat. Les scaffolds ont également été implantés dans un modèle murin de défaut osseux crânien de taille critique.

Cette étude a montré que l'ajout de strontium ou de fisétine/hydroxytyrosol n'altère pas la viabilité des ostéoblastes dans un contexte de culture dynamique et que ces cellules étaient capables d'adhérer à la surface des biomatériaux. Par ailleurs, les différents agents dopants apportent un avantage décisif au niveau de la différenciation des ostéoblastes qui se traduit par une stimulation importante de la régénération osseuse après 3 mois chez la souris.

Ces résultats appuient le potentiel de ces biomatériaux hybrides à base de bioverre permettant l'intégration de molécules organiques au sein de leurs structures. Ils mettent également en lumière l'intérêt de poursuivre la recherche d'agents dopants organiques alternatifs aux facteurs de croissance.

Mots clés : Bioverre sol-gel, Dopages inorganique/organique, Biomatériaux hybrides.

## **P16 PIM-engineered hydroxyapatite scaffolds; physical, chemical and biological evaluations**

Renaud Siboni <sup>1</sup>, Christine Guillaume <sup>1</sup>, Julien Braux <sup>1</sup>, Olivier Dugauguez <sup>2</sup>, Justin Roche <sup>2</sup>, Bruno Cauwe <sup>2</sup>, Delphine Auzène <sup>2</sup>, Clémence Demangel <sup>2</sup>, Sophie C. Gangloff <sup>1</sup>, Frédéric Velard <sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 4691 « BIOS », Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ; <sup>2</sup>CRITT-MDTS, Charleville Mézières, France

One fundamental problem for bone engineering is the requirement of adequate biodegradable, porous and osteoinductive scaffolds. Calcium-phosphate biomaterials and bioactive glasses are commercially available and currently used in clinic but reaching the goal to ideal structured biomaterial has not been yet achieved. In this context, we proposed to elaborate a porous scaffold using powder injection molding (PIM). This approach appears to be particularly relevant for the challenging production of foams-like porous parts that could not be achieved using conventional sintering processes in an industry-compliant manner. This work aims to develop and validate, in vitro, porous bone substitutes intended to accelerate bone regeneration.

Hydroxyapatite (Biocetis) was embedded by Technical Centre for Ceramics and Glass, Portugal, before inclusion of NaCl spacer. Thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDXS), Mercury intrusion and microcomputed tomography were performed to characterize extruded materials. Raw material, the desorbed one (72h in cell culture media) and supernatants from desorption were tested for their impact on human primary osteoblasts culture (imagery, biochemical assays).

TGA indicated that less than 0.15% of polymer remains after aqueous and thermal debinding and EDXS confirmed absence of remaining NaCl. This validated the debinding procedure. Tomography and mercury intrusion highlighted that closed porosity was very low whereas open porosity reach 75%. SEM analysis clearly demonstrated the presence of disseminated pores (mean diameter 500 µm). First analyses on primary human osteoblasts behaviour demonstrated that nor the particles (desorbed or not) neither the desorption supernatants were cytotoxic until 10 mg/mL, underlying the expected biocompatibility of the materials. Primary osteoblasts cultured on 3D scaffolds exhibited elongated morphology as evidenced by fluorescence and SEM.

Our data indicated that highly porous hydroxyapatite-made structure may be used with PIM process, which could be promising for bone tissue engineering. Further analyses are ongoing to fully characterize the osteoconductive/osteoinductive properties of the biomaterials in vitro and in vivo in long bone critical defect model.

Acknowledgments: Authors would like to thank PICT platform for imagery and Institut Carnot MICA for funding the project (BiomateriOs exploratory program 2017).

Mots clés: Hydroxyapatite; Powder injection molding; Human Primary Osteoblasts

## **P17 SSC-DERIVED adipocytes induce the transdifferentiation of osteoblasts into pre-adipocytes**

Aline Clabaut <sup>1</sup>, Céline Grare <sup>1</sup>, Gaëlle Rolland-Valognes <sup>2</sup>, Jean-Guillaume Letarouilly <sup>1</sup>, Chantal Bourrier <sup>2</sup>, Philippe Pastoureau <sup>3</sup>, Pierre Hardouin <sup>1</sup>, Massimo Sabatini <sup>3</sup>, Odile Broux <sup>1</sup>

<sup>1</sup>PMOI, ULCO, Boulogne sur Mer et Lille, France ; <sup>2</sup>CentExBiotechnology, Servier research Institute, Croissy-sur-Seine, France ; <sup>3</sup>CTI Immuno-Inflammatory Disease, Servier research Institute, Croissy-sur-Seine, France

Our preliminary findings lead us to propose bone marrow adipocyte secretions as new actors of bone loss. Indeed using an in vitro coculture model based on human skeletal stem cells (SSCs), we previously showed that soluble factors secreted by adipocytes induced the conversion of osteoblasts towards an adipocyte-like phenotype. The aim of this study is to better characterize the changes triggered by the coculture and to strengthen our hypothesis of a transdifferentiation event.

A gene expression kinetics performed to analyze the temporal changes in the osteoblast phenotype revealed that the conversion of osteoblasts is quickly initiated (from 9h of coculture) but still incomplete when compared to adipocytes. Transcriptomic analysis of 7 biological replicates demonstrated that osteoblasts presented different phenotypic changes according to the duration of coculture. In fact, 376 and 405 transcripts were significantly modified in cocultured osteoblasts compared with the monoculture controls upon 9h and 48h respectively. Gene ontology annotation analysis showed an enrichment in the adipocyte gene signature. In particular, we identified 24 genes which were associated with biological processes related to differentiation of adipocyte ( $2,1 \leq FC \leq 16,82$ ). Double immunofluorescence microscopic analyses were performed to demonstrate the co-expression of adipogenic and osteoblastic proteins on a single cell level. The results clearly showed that at least 12% of the osteoblastic cells expressed the adipogenic marker PPAR $\gamma$ 2, when osteoblasts cells were incubated during only 48h with adipocyte conditioned medium. On molecular level, such conversion was associated with upregulated expression of specific reprogramming genes ( $p \leq 0.05$ ). Moreover, whole genome methylation analyses showed that levels of 5-methylcytosine were strongly decreased ( $p \leq 0.01$ ) in co-cultured osteoblasts, accompanied by an upregulation of TET1 gene expression ( $p \leq 0.05$ ), an enzyme implicated in methylation.

Taken together, these data show that osteoblast transdifferentiation is initiated rapidly and then progresses in a multi-step process.

Mots clés : Osteoblast, adipocyte, transdifferentiation

## **P18\*** Développement d'un modèle d'étude, *in vitro*, de la prise en charge des calcifications vasculaires par les PBMC

Nadia Flissi \* <sup>1</sup>, Yohann Demont <sup>1,2</sup>, Marlène Gallet <sup>1,2</sup>, Thibaut Objois <sup>1</sup>, Alison Vanlaeys <sup>1</sup>, Cédric Boudot <sup>1</sup>, Loïc Garçon <sup>1,2</sup>, Said Kamel <sup>1,2</sup>, Michel Brazier <sup>1,2</sup>, Isabelle Six <sup>1</sup>, Romuald Mentaverri <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre Universitaire de Recherche en Santé, Laboratoire EA7517, Université de Picardie Jules Verne, Amiens ; <sup>2</sup> Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens Picardie, Amiens

Réel problème de santé public, la survenue des complications cardiovasculaires, associées au développement des calcifications vasculaires, est très fréquente dans l'insuffisance rénale chronique terminale. Dans ce contexte physiopathologique, nous étudions le rôle joué par l'expression monocytaire du récepteur sensible au calcium (CaSR) dans la capacité de ces cellules à détecter et à prendre en charge la calcification cardiovasculaire. Nous avons notamment mis en évidence que les monocytes circulants (PBMC) isolés de ces patients (Cohorte ACIDE) présentaient 1) une expression réduite du CaSR et 2) une moindre capacité à prendre en charge la calcification vasculaire *in vitro*, comparativement à des PBMC isolées d'individus sains (Cohorte MonoCaSR). Dans ce travail, nous avons développé un modèle d'étude afin de préciser les liens fonctionnels associant monocytes et capacités déminéralisantes des PBMC.

**Matériels et méthodes.** Notre modèle est basé sur l'utilisation d'anneaux aortiques précalcifiés (milieu de culture présentant 3.8 mM Pi durant 5 jours). Isolés du rat, ces anneaux aortiques sont cultivés en présence d'un agent fluorescent dérivé des bisphosphonates (l'osteosense 68oEX), durant les dernières 24h de calcification. L'aorte marquée est morcelée mécaniquement (ciseaux puis sonication) en très petits fragments pour être mise en culture avec des PBMC (1.10<sup>6</sup>/mL) isolés à partir d'individus sains (24h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Un immunomarquage avec des anticorps anti CD45-FITC et anti CD14-PE est ensuite réalisé pour caractériser les PBMC. Les données sont alors recueillies par ImageStreamX ainsi que par microscopie confocale.

Nos données montrent que 54% des cellules CD45+/CD14+ mis en culture avec des fragments d'aorte calcifiée marquée à l'osteosense (OS68o) ont incorporé des particules OS68o+ (6 µm de diamètre moyen). Lorsque les PBMC ont été mis en culture avec des fragments d'aorte non calcifiée ou calcifiée sans ajout d'OS68o, aucun marquage cellulaire n'est constaté. Il semble par contre que 1.5% des cellules CD45-/CD14- et 0.46% des cellules CD45+/CD14- soient aussi capables d'incorporer les particules OS68o+. Les cellules OS68o+ présentent toutes un marquage particulaire intracellulaire.

Nos données indiquent que certaines populations de PBMC isolés d'individus sains sont en capacité de prendre en charge des particules issues du broyage d'aortes calcifiées. Nous souhaitons maintenant préciser si l'insuffisance rénale chronique terminale modifie ce mécanisme et surtout l'implication éventuelle du CaSR dans ce processus.

**Mots clés :** calcification vasculaire, monocytes humains, CaSR.



**P19\* Caractérisation phénotypique de cultures primaires d'ostéoblastes mandibulaires humains de patients atteints de dysplasie fibreuse**

Johan Sergheraert \* <sup>1,2</sup>, Christine Guillaume <sup>1</sup>, Kerdjoudj Halima <sup>1</sup>, Laurence Sébastien <sup>2</sup>, Fabien Bornert<sup>3</sup>, Sophie Gangloff <sup>1</sup>, Frédéric Velard <sup>1</sup>, Cédric Mauprivez <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>URCA, EA 4691 « Biomatériaux Inflammation en Site Osseux » (BIOS), Reims, France ; <sup>2</sup> Pôle Médecine Bucco-Dentaire, CHU Reims, France ; <sup>3</sup> CHU de Strasbourg, France

La dysplasie fibreuse (DF, OMIM #174800) est une maladie osseuse bénigne rare dans laquelle le tissu osseux est remplacé par un tissu fibro-osseux. La DF résulte d'une mutation du gène *GNAS* survenant à un stade précoce du développement embryonnaire aboutissant à un mosaïcisme dans lequel des cellules mutées et les cellules normales coexistent. Si les lésions de DF localisées au niveau du squelette appendiculaire ont été largement étudiées dans le but d'améliorer les résultats thérapeutiques des patients présentant un handicap locomoteur ; la pathogénèse des atteintes crânio-faciales, malgré des répercussions esthétiques, neurologiques ou sensorielles, a peu été évaluée. Le but de notre étude est de caractériser *in vitro* des cultures primaires d'ostéoblastes mandibulaires humains issus de patients présentant une DF vs des contrôles sains. Matériel et méthodes : Les cultures d'explants osseux sont issues de chirurgies orales sur des patients sains (n=8) ou atteints d'une DF (n=3). Une évaluation de la prolifération cellulaire (test WST-1 et mesure de la quantité d'ADN) et du profil phénotypique (coloration et dosage de l'activité phosphatase alcaline et rouge alizarine, immunomarquage de l'ostéocalcine) a été effectuée sur 3 temps (J7, 14 et 21), en conditions ostéodifférenciantes.

Une augmentation de la prolifération des cellules osseuses mandibulaires issues des explants DF est notée à J7 par rapport aux témoins (temps de dédoublement moyen 2,1 jours vs 3,1 jours, p=0.029) Ces observations sont en accord avec les données de la littérature obtenues sur des cultures cellulaires d'os longs (Marie et al., 1997). Dès 14 jours de culture, les quantités cellulaires sont équivalentes pour l'ensemble des conditions. A J21, un défaut de la différenciation ostéogénique est suggéré chez les DF avec une diminution de l'activité PAL (31,79 vs 46,78 mUI/L/ $\mu$ g de protéines totales en moyenne, p>0.05) et de l'expression de l'ostéocalcine par rapport aux cellules témoins. La phase de minéralisation est également impactée avec une diminution quantitative de dépôt calcique extracellulaire (209,43 vs 426,60  $\mu$ g/mL en moyenne, p>0.05). Ces données originales font écho aux travaux de Terpstra et al. (2002) menés sur coupes histologiques d'os iliaques qui ont mis en évidence un défaut de minéralisation de la matrice ostéoïde dans des explants issus de patients DF.

Ces résultats préliminaires, qui devront être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons DF, suggèrent que les cellules issues de lésions DF mandibulaires présentent une population d'ostéoblastes immatures (faible expression de l'ostéocalcine, minéralisation matricielle diminuée) et hautement prolifératifs. L'analyse transcriptionnelle des cultures cellulaires et une étude histologique des lésions osseuses permettront de mieux comprendre le dysfonctionnement ostéoblastique dans la DF crânio-faciale.

Mots clés : Dysplasie fibreuse, Ostéoblastes primaires humains, *in vitro*

## **P20 Exploring the role of sensory nervous system on inflammatory bone loss**

Diana Isabel Silva, Maria-Bernadette Madel, Antoine Boutin, Majlinda Topi, Matthieu Rouleau, Abdelilah Wakkach, Claudine Blin-Wakkach

LP2M, CNRS UMR7370, Université Côte d'Azur, Nice, France

Advances in the understanding of bone biology have provided compelling evidence that sensory nervous system is a critical regulator of bone remodelling and homeostasis. Indeed, it was recently demonstrated that sensory innervation has a direct and positive role on osteoblastogenesis and bone formation. However, the precise role of sensory nervous system on osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction remains obscure. Different teams, including ours, demonstrated that while monocyte-derived osteoclasts (MN-OCLs) are associated with physiological bone resorption, dendritic-cell-derived osteoclasts (DC-OCLs) are characteristic of pathological conditions. Here, the aim of this study was to explore the role of sensory neurons on OCL differentiation in the context of bone destruction associated with osteoporosis, focusing more specifically on the differentiation of these two OCL populations.

We were first interested in clarifying whether the pattern of bone sensory innervation is altered in ovariectomized (OVX) mice. Immunostaining of femur sections revealed that OVX mice had a significant reduction in the proportion of CGRP+ sensory nerve fibers compared with SHAM operated mice. Moreover, performing transcriptomic profiling by comparative RNAseq analysis between DC-OCLs and MN-OCLs, we identified significant differences in molecular pathways involved in neuronal outgrowth and axonal guidance. Based on these results, we attempted to understand the effect of dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons from SHAM and OVX mice on OCL differentiation and survival. We found that coculture of DRG neurons inhibits the ability of OCL precursors, MNs and DCs, to undergo OCL differentiation. Consistently, we observed a significant decrease of TRAP+ cells (>3 nuclei) during the differentiation of OCLs from MNs and DCs treated with secretome derived from DRG neurons of SHAM and OVX mice when compared with non-treated cells. Interestingly, a detrimental effect of DRG neuronal conditioned medium obtained from OVX mice was found in the survival of mature MN-OCLs and DC-OCLs, evidenced by the significant reduction in the number of OCLs. Finally, gene expression analysis in DRG neurons of OVX mice indicated a significant downregulation of genes related to the OCL differentiation and survival, particularly macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), and chemokine ligand 2 (CCL2, encoding monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)).

These preliminary results suggest a positive correlation between the decrease in the density of bone sensory innervation and inflammatory bone destruction. Understanding how sensory nerve fibers inhibit osteoclastogenesis and identifying the factors involved in the loss of these nerves may result in new avenues to treat osteoporosis.

Mots clés : DRG neurons, osteoclast differentiation, osteoporosis

## **P21 L'imagerie micro-CT in vivo : un outil pour les études précliniques longitudinales**

Lotfi Slimani<sup>1</sup>, Jérémy Sadoine<sup>1</sup>, Catherine Chaussain<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire EA2496 -"Pathologie, Imagerie & Biothérapies Orofaciales" Faculté de Chirurgie Dentaire, Montrouge, France et Plateforme Imagerie du Vivant Paris Descartes PIV, Université Paris Descartes ; <sup>2</sup> AP-HP, Services Odontologie Bichat-Bretonneau HNPVS, France

Les techniques d'imageries in vivo sont devenues progressivement un outil essentiel pour les études cliniques et précliniques. Parmi ces techniques, l'utilisation de la micro-tomographie à rayon X permet l'acquisition rapide d'images structurales en fonction de l'absorption des rayons X par les tissus traversés. Il est ainsi possible d'obtenir de manière non invasive à partir de (bio)-matériaux scannés des représentations spatiales de ces objets à très hautes résolutions.

Au sein du laboratoire EA2496 « Pathologie, Imagerie et Biothérapies Orofaciales » notre plateforme d'imagerie micro-CT qui fait partie du réseau d'imagerie in vivo de l'université Paris Descartes (PIV-Paris Descartes, future université de Paris) permet l'acquisition d'images sur divers modèles de rongeurs. Les récentes avancées techniques permettent l'acquisition rapide d'images à faible dose pour le suivi longitudinal des pathologies sur ces rongeurs. Nous sommes équipés d'un micro-CT (Quantum FX® Perkin Elmer) ainsi que de stations de traitements d'images permettant l'analyse à haute résolution d'images obtenues sur des modèles murins, des échantillons de tissus ou de (bio)-matériaux inférieurs à 15 cm. Il nous est possible d'obtenir en 3 minutes des images volumiques pouvant aller jusqu'à 10 µm de résolution. Cette technique principalement utilisée pour l'exploration des tissus minéralisés a d'abord été optimisée pour les études des tissus osseux et dentaires (suivi de croissance, phénotypage, remodelage et régénération) une des expertises premières de notre plateforme. Il s'agit, par exemple, d'un outil utile pour surveiller le développement des lésions rhumatismales dans le contexte des troubles génétiques, permettant une meilleure connaissance de l'histoire naturelle de la maladie. De plus, le micro-CT haute résolution est un outil précieux pour détecter les calcifications ectopiques dans le contexte de l'exploration sur des modèles murins de troubles génétiques ou de maladies chroniques. Diverses études nous ont permis par exemple d'identifier des troubles de la minéralisation par analyse phénotypique ou d'observer le remodelage osseux dans des défauts critiques implantés avec des matrices cellularisées ou pour valider des régimes pour corriger les anomalies dans le développement squelettique chez la souris. Nous avons été, par ailleurs, impliqués dans des projets de recherche pour lesquelles nous avons développé des méthodes de quantification de la masse adipeuse, de suivi du développement de pathologies pulmonaires ou encore du suivi du tractus digestif. Le développement de nouveaux agents de contraste spécialement dédiés aux petits animaux ouvre des possibilités exploratoires récentes (rénale, pulmonaire, hépatique, cardiaque et vasculaire) dans lesquelles nous sommes de plus en plus impliqués. L'imagerie par micro-tomographie à rayons X constitue, par conséquent, une haute valeur ajoutée pour de nombreux projets de recherche dans le biomédical.

Mots clés : Imagerie préclinique, Micro-CT, Etudes longitudinales

## **P22 Role of the histone demethylase *Lsd1* in articular chondrocytes and how it contributes to the matrix homeostasis**

Anne-Laure Durand<sup>1</sup>, Sebastien Lustig<sup>2</sup>, Elvire Servien<sup>2</sup>, Gualter Vaz<sup>3</sup>, Frédéric Mallein-Gerin<sup>1</sup>, Jérôme Lafont<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Claude Bernard Lyon1, CNRS, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR 5305, Lyon, France ; <sup>2</sup>Service de chirurgie orthopédique, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France ; <sup>3</sup>Hopital des Massues - Croix Rouge, CMCR, Lyon, France

The articular cartilage is an avascular tissue with a limited regenerative capacity. During osteoarthritis (OA), the most common degenerative joint disease, the articular surface becomes eroded, due to the progressive loss of the extracellular matrix. Restoring the cartilage matrix is challenging because the molecular mechanisms regulating the matrix gene expression are unclear. Increasing evidences indicate that the gene expression is controlled by epigenetic mechanisms. In the chondrocytes, recent studies have identified several histone modifiers such as histone acetyltransferases and methyltransferases acting as transcriptional co-regulators of SOX9 (a key regulator of cartilage formation and chondrocyte differentiation) by modifying the local state of chromatin. To further understand the contribution of epigenetic regulators of chondrocyte-specific genes, we investigated the role of the Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1), which is a histone demethylase upregulated in OA and involved in mediating the inflammatory effects of Il-1 $\beta$ .

Human articular cartilage was obtained from patients undergoing total knee replacement and was used for primary culture of chondrocytes. The role of LSD1 was evaluated following knock-down experiments using siRNA strategy.

We found that LSD1 is highly expressed in human OA cartilage compared with non-diseased cartilage. Moreover, we found its presence in a molecular complex with the transcription factor SOX9. Following RNA-seq. experiments, we found that the depletion of LSD1 up-regulates the transcription of COL9A1, leading to the increased expression of type IX collagen. In addition, LSD1 binds to the promoter of COL9A1, suggesting that LSD1 represses COL9A1 expression.

Our findings show that LSD1 forms a molecular complex with SOX9 and contributes to the COL9A1 repression in human articular chondrocytes. Considering the pro-inflammatory role previously described for LSD1, the pharmacological inhibition of LSD1 may represent a novel approach in the OA treatment.

Mots clés : Articular chondrocytes, Histone methylation/demethylation, Collagen expression

### **P23 Combining calcium phosphate with polysaccharides – biomimetic substrate modulates monocyte inflammation**

Laura Entz, Marie Dubus, Cédric Mauprivez, Sophie C. Gangloff, Hassan Rammal, Halima Kerdjoudj

Université de Reims Champagne-Ardenne, EA 4691 "Biomatériaux et inflammation en site osseux", Pôle Santé, SFR CAP-Santé, Reims, France

The use of inorganic calcium phosphate supplemented with biopolymers has drawn lots of attention in bone regenerative medicine. While inflammation is required for bone healing, its exacerbation can alter successful tissue regeneration. Owing to their critical role in bone dynamics, investigating the interaction between monocytes/macrophages and bioactive/osteoinductive calcium phosphate/chitosan/hyaluronic acid (CaP-CHI-HA) will provide essential information for the rational design of new biomaterials. CaP-CHI-HA cytocompatibility was monitored by WST-1 assay, DNA quantification and intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS).

The low metabolic activities and DNA content of THP-1 on CaP-CHI-HA in addition to the absence of an increase in ROS intracellular accumulation compared to LPS positive control confirmed its biocompatibility. On CaP-CHI-HA, THP-1 exhibited a sub-membranous F-actin localization with a prominent distribution of vinculin throughout the cytoplasm and the membrane. In contrast, on LPS, F-actin was mostly arranged as spike-like protrusions of the cell membrane with vinculin evenly localized at peri-nuclear region. Exposing monocytes to CaP-CHI-HA resulted in a secretion of pro-healing VEGF and TGF- $\beta$  growth factors, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 and IL-8 pro-inflammatory mediators but also IL-10 anti-inflammatory cytokine along with an inflammatory index below 1.5 versus 7.5 following monocytes LPS stimulation.

Although CD44 receptor seems not to be involved in the inflammatory index regulation, results suggest a potential role of the chemical composition and calcium release from CaP-CHI-HA, in affecting the intracellular expression of calcium sensing receptors. Herein, our findings indicate a great potential of CaP-CHI-HA in providing a moderate inflammatory response, suitable for bone regeneration.

Mots clés : Interface Cellules-Biomatériaux, Macrophages, Régénération osseuse

**P24 WNT1-CRE-ROSA-mT/mT fluorescent dental pulp stem cells to identify the cellular and molecular mechanisms underlying the repair of critical-sized cranio-facial defects**

Anne-Margaux Collignon<sup>1,2</sup>, Julie Lesieur<sup>1</sup>, Eduardo Gomez<sup>1</sup>, Marine Maisencal<sup>1</sup> Thomas Guilbert<sup>3</sup>, Catherine Chaussain<sup>1,2</sup>, Anne Poliard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 2496 Orofacial Pathologies, Imagery and Biotherapies, Dental School Faculty, University Paris ; Descartes, Montrouge, France ; <sup>2</sup> AP-HP, Paris, France ; <sup>3</sup> Plateforme IMAG'IC, Institut Cochin, Inserm U1016-CNRS UMR8104, University Paris Descartes, Paris France

Stem cells endowed with skeletogenic potentials seeded in specific scaffolds are considered attractive tissue engineering strategies for treating large bone defects. In the context of cranio-facial bone, mesenchymal stromal/stem cells derived from the dental pulp (DPSCs) have demonstrated significant osteogenic properties. Their neural crest embryonic origin further makes them a potential accessible therapeutic tool to repair craniofacial bone. The stem cell's direct involvement in the repair process versus a paracrine effect is however still discussed. In addition, the best cell culture conditions for maximizing the in vivo DPSC osteogenic potential have to be established.

To clarify these questions, we have 1) characterized the phenotype of fluorescent murine DPSCs derived from PN3 Wnt1-CRE-RosaTomato mouse molar (T-mDPSCs) cultured under either normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (5% O<sub>2</sub>) and 2) followed and compared the fate of the two cell populations during the repair process of calvaria bone defects. Two symmetrical critical defects created on each parietal region were filled with either i) dense collagen scaffolds seeded with T-mDPSCs cultured under hypoxia, ii) dense collagen scaffolds seeded with T-mDPSCs cultured under normoxia iii) non cellularized scaffolds, or iv) no scaffold. Mice were imaged over a 3-month period by microcomputer tomography to evaluate the extent of repair and by bi-photon microscopy to track T-mDPSCs. Histological and immunocytochemical analyses were performed in parallel to characterize the nature of the repaired tissue.

We show that depending on culture conditions (normoxia vs hypoxia): 1) T-mDPSCs are able to survive in the healing defect up to 3 months after implantation and 2) depending on DPSC culture conditions before implantation, bone repair can take place through an intramembranous or endochondral process. Further work should now focus on dissecting the signaling mechanisms underlying the mDPSCs fate choice upon implantation as well as the molecular dialogue initiated with the host cells.

Mots clés : Dental pulp stem cells, Bone repair, endochondral versus intramembranous process

## **P25\* Évaluation du potentiel ostéoconducteur d'une matrice osseuse allogénique partiellement déminéralisée dans des défauts de différentes tailles au niveau de la calvaria de rat**

Ahmad Moustapha Diallo \* <sup>1,3</sup>, Cyprien Denoeud <sup>1</sup>, Hanane El-Hafci <sup>1</sup>, Hervé Petite <sup>1</sup>, Morad Bensidhoum <sup>1</sup>, Fani Anagnostou <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA) CNRS UMR 7052, INSERM U 1271, Paris, France ; <sup>2</sup> UFR Odontologie Garancière, Université Paris Diderot, Paris, France ; <sup>3</sup> Service de Parodontologie, Département d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

Des matrices osseuses allogéniques déminéralisées sont utilisés pour restaurer des défauts osseux mais leur potentiel ostéoformateur est variable. Une nouvelle formulation d'une matrice osseuse partiellement déminéralisée (MOPD) BioBank® issue d'os spongieux humain viro-inactivé a été mise au point. Elle est sous forme injectable permettant une mise en place du matériau facile et l'obtention d'un contact intime entre l'implant et les berges du défaut. L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel ostéoconducteur de la MOPD dans la réparation de défauts osseux de calvaria de rat et son efficacité par rapport à la taille du défaut.

Pour cette étude 24 rats mâles Wistar âgés de 12 semaines et répartis en 4 groupes de 6 animaux ont été utilisés. Des défauts osseux circulaires de 8-, 6- et 4 mm de diamètre ont été réalisés sur la calvaria. Les défauts de 8 mm sont soit laissés vides (groupe i) soit comblés avec la MOPD (groupe ii). Les défauts de 6- et 4 mm réalisés sur le même rat sont soit laissés vides (groupe iii) soit comblés avec la MOPD (groupe vi). La réparation des défauts a été suivie par micro-CT in vivo. Des acquisitions ont été effectuées à J0, J15, J30, J45 et J60. Après la mise à mort des animaux, les explants ont été fixés et traités en histologie non décalcifiée, puis des analyses histologiques et histomorphométriques ont été effectuées.

L'analyse micro-CT a montré une augmentation de la radio-opacité de J0 à J60 dans les défauts de 4- et 6 mm non comblés ainsi que dans les défauts de 4-, 6-, et 8 mm de diamètre comblés avec la MOPD. Dans les défauts de 8- et de 6 mm de diamètre comblés avec la MOPD, le volume de radio-opacité à J30 et J60 était significativement supérieur ( $P < 0,05$ ) à celui observé dans les défauts laissés vides. Dans les défauts comblés, l'os néoformé était présent autour et entre les particules de MOPD. De plus, dans les défauts de 8- et 6 mm comblés, la néoformation osseuse était respectivement 16 fois ( $p < 0,001$ ) et 1,57 fois ( $P < 0,05$ ) supérieure à celle des défauts laissés vides. Dans les défauts de 4 mm, la néoformation osseuse était quantitativement équivalente entre les défauts comblés avec la MOPD ou laissés vides.

La MOPD testée présente un potentiel ostéoconducteur intéressant pour des défauts de diamètre supérieur ou égale à 6mm.

Mots clés : régénération osseuse ; défaut osseux de calvaria de rat, matrice osseuse déminéralisée

**P26\* Effet de molécules à motif pyridazinone sur des cellules ostéosarcome**

Aurélie Moniot\*<sup>1</sup>, Fabien Lamret<sup>1</sup>, Christine Guillaume<sup>1</sup>, Sarah Renault<sup>3</sup>, Françoise Redini<sup>3</sup>, Ingrid Allart-Simon<sup>2</sup>, Janos Sapi<sup>2</sup>, Sophie C. Gangloff<sup>1</sup>, Stéphane Gerard<sup>2</sup>, Frédéric Velard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> URCA, EA 4691 " Biomatériaux & inflammation en site osseux " (BIOS), Reims, France ; <sup>2</sup> UMR CNRS 7312 ICMR « Institut de Chimie Moléculaire de Reims », Reims, France ; <sup>3</sup> INSERM UMR1238 Phy.Os « Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés », Nantes, France

L'ostéosarcome est un cancer primitif des os qui affecte le plus souvent les enfants, adolescents et jeunes adultes (Mirabello L et al., *Int J Cancer*, 2009). Les approches thérapeutiques actuelles, combinant la chirurgie et la chimiothérapie restent encore malheureusement insuffisantes pour éviter les récives et les métastases, et ne permettent plus d'amélioration en termes de survie depuis une vingtaine d'années (Perkins SM et al., *PLoS One* 2014). Le besoin de nouvelles molécules candidates pour la thérapie contre l'ostéosarcome est donc aujourd'hui crucial. Des études préliminaires menées par le laboratoire ont permis de mettre en évidence l'effet anticancéreux des molécules à motif pyridazinone nommées 516 et 532 (Moniot A et al., *European Calcified Tissue Society Congress*, 2018).

Le but principal du présent travail a été de tester l'activité d'une seconde génération de molécules à structure pyridazinone, 5016 et 5032, in-vitro, sur des cellules de lignées ostéosarcomateuses humaines (SaOS-2, MG-63, HOS-MNNG et K-HOS) ainsi que d'évaluer la tolérance de ces molécules in-vivo dans un modèle murin. L'efficacité de la pharmaco-modulation sur les molécules de première génération a été mise en évidence par technique WST-1. Nous avons ainsi déterminé les IC<sub>50</sub>, qui sont de 50 µM pour 5016 et 30 µM pour 5032 sur les SaOS-2, 105 µM et 40 µM pour les MG-63, et de 4 µM et 7 µM pour les HOS-MNNG in-vitro. En revanche ces molécules se sont montrées moins efficaces sur la lignée K-HOS, avec des IC<sub>50</sub> déterminées de 223 µM pour le 5016 et 118 µM pour le 5032. Les IC<sub>50</sub> de ces mêmes molécules sur les MOS-J (lignée ostéosarcomateuse murine) ont été déterminées à 64 µM pour le 5016 et 43 µM pour le 5032, confortant l'effet de nos molécules y compris dans l'espèce murine. Des tests de tolérance in-vivo de la molécule 5032 ont ainsi été réalisés à 50, 10 et 2 mg/kg en intra-péritonéal et intra musculaire. Deux injections par semaine pendant 4 semaines ont été réalisées et les résultats préliminaires ont montré une très bonne tolérance par les souris de ces molécules à ces concentrations. En effet, au sein des différents groupes, une augmentation de 13 à 18 % du poids de départ a pu être observée, comparable à celle du groupe témoin.

Ainsi, l'ensemble de nos données confirme que nos molécules à motif pyridazinone, et surtout celles de seconde génération, peuvent être des candidats-hits intéressants comme base de développement d'une potentielle thérapie contre l'ostéosarcome. Les mécanismes d'action de ces molécules sont en cours d'étude ainsi que l'étude des effets anti-cancéreux in-vivo qui seront étudiés dans un modèle murin d'ostéosarcome orthotopique.

Mots clés : ostéosarcome, pyridazinone, cytotoxicité



## P27 Characterization and properties of vesicles released from chondrocytes

Rene Buchet <sup>1</sup>, Thierry Granjon <sup>1</sup>, David Magne <sup>1</sup>, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek <sup>2</sup>, Joanna Bandorowicz-Pikula <sup>3</sup>, Slawomir Pikula <sup>2</sup>, Pietro Ciancaglini <sup>4</sup>, Maytê Bolean <sup>4</sup>, José Luis Millan <sup>5</sup>, Massimo Bottini <sup>5,6</sup>, and Saida Mebarek <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ICBMS UMR 5246 CNRS Université Lyon 1, Villeurbanne, France; <sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry of Lipids and <sup>3</sup>Laboratory of Cellular Metabolism, Nencki Inst. Exp. Biol., Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; <sup>4</sup>Dept. de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; <sup>5</sup>Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037, USA; <sup>6</sup>Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, Italy

Chondrocytes release several types of extracellular vesicles (EVs) including exosomes (EXs), vesicles, matrix vesicles (MVs) and apoptotic bodies (ABs). Their characterization and properties are the object of intense scrutiny due to their possible roles in initiating mineralization and in cell-to-cell communications. EV-based therapeutic treatment may be amenable to multiple forms (injection, impregnated scaffolds) [1]. However, the use of EVs in medicine is still hampered by the lack of efficient purification protocols [2].

We compared different methods to extract EVs from cultured chondrocytes, analyzed their biochemical properties.

Due to the strong affinity of MVs to collagen, collagenase treatment allowed the release of a large amount of MVs with high activity of tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and strong ability to initiate apatite formation. Nevertheless, collagenase treatment may affect the integrity of MVs [2], prompting the necessity to develop other methods to extract this type of EVs. Extracellular media from murine primary chondrocytes, were subjected to two-step ultracentrifugation process without any treatment of collagenase. The first step of ultracentrifugation allowed the extraction of ABs, while the second step extracted EXs and other types of vesicles. MVs, extracted after collagenase treatment, did not originate from endoplasmic reticulum as suggested by the lack of CD9 and Alix as probed by Western Blot. MVs had similar lipid composition as microvilli-like plasma membrane. EXs were evidenced by the presence of CD9 and claudin, while ABs did not reveal any presence of CD9 and claudin. Both ABs and EXs extracted from chondrocytes were less efficient to mineralize than MVs.

These findings confirmed that MVs are distinct from other types of EVs.

[1] M.C. Blaser and E. Aikawa. Roles and regulation of extracellular vesicles in cardiovascular mineral metabolism. *Frontiers in cardiovascular medicine*. doi: 10.3389/fcvm.2018.00187

[2] R.E. Wuthier, J.E. Chin, J.E. Hale, T.C. Register, L.V. Hale and Y. Ishikawa. Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem* 1985, 260, 15972

Mots clés : Chondrocyte, collagen, matrix vesicle,

**P28\* Génération de matrices extracellulaires d'adipocytes médullaires à différentes concentrations de glucose, étude de leur impact sur la différenciation ostéogénique**

Laura Entz \*<sup>1</sup>, Christophe Chauveau <sup>1</sup>, Gilles Pasquier <sup>2,3</sup>, Stéphanie Lucas <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université du Littoral-Côte d'Opale, EA4490 « Physiopathologies des Maladies Osseuses Inflammatoires » PMOI, Boulogne-sur-Mer, France ; <sup>2</sup> CHU de Lille, Service de chirurgie orthopédique et de traumatologie, Hôpital Salengro, Lille, France ; <sup>3</sup> Université de Lille, EA4490 « Physiopathologies des Maladies Osseuses Inflammatoires » PMOI, Faculté de Chirurgie Dentaire, Lille, France

De nombreuses études montrent que la quantité d'adipocytes médullaires (AM) est corrélée positivement à la perte osseuse dans l'ostéoporose. Depuis peu, le risque fracturaire est rapporté augmenté dans le diabète de type 2 (T2D) et l'obésité, indiquant une fragilité. Or la quantité d'AM est rapportée augmentée chez les patients T2D. Deux hypothèses ont été largement explorées pour expliquer le rôle délétère des AM sur l'os : une compétition de différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (SSC, Skeletal Stem Cells) et/ou la sécrétion de facteurs par les adipocytes qui peuvent affecter l'ostéoblastogénèse.

Afin de définir l'implication des AM dans la fragilité osseuse au cours du T2D, nous avons comparé l'impact de la concentration de glucose in vitro sur des AM. La concentration la plus élevée de glucose favorise le détachement des AM lors d'un isolement cellulaire et induit une augmentation de l'expression de certaines métalloprotéases et de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces résultats suggèrent que les AM peuvent contribuer à un remaniement de la matrice extracellulaire (MEC) qui de plus est régulé par la concentration de glucose. Les objectifs de notre travail sont donc d'étudier l'impact de la composition des MEC adipocytaires sur les différentes étapes de l'ostéogénèse.

Notre modèle in vitro repose sur la différenciation et la maturation en adipocytes de SSC humaines commerciales (RoosterBio) durant 21 jours à une concentration faible (5mM) ou élevée (25mM) de glucose mimant respectivement des conditions normo- et hyperglycémique. Les matrices adipocytaires sont ensuite dévitalisées afin d'étudier la capacité d'adhésion, de prolifération et de différenciation en ostéoblastes de SSC ensemencées.

Nos premiers résultats montrent que les SSC cultivées à 25mM de glucose prolifèrent moins rapidement qu'en présence de 5mM de glucose, justifiant qu'une unique concentration soit maintenant choisie pour conduire à la confluence des SSC. L'accumulation de triglycérides et l'expression de gènes clés adipocytaires montrent que la concentration en glucose n'influe pas sur la différenciation adipocytaire. Trois protocoles de dévitalisation classiquement utilisés ont été testés pour obtenir des matrices alors validées par marquage au DAPI et au Bodipy. La dévitalisation a été systématiquement plus rapide pour la condition à 25mM de glucose que pour les cellules cultivées à 5mM. L'élimination des composants adipocytaires (ADN génomique et triglycérides) s'est avérée la plus efficace par la dévitalisation avec choc hypotonique.

Ces premiers résultats suggèrent bien un remaniement de la matrice par les AM, qui sera plus précisément caractérisé par la mesure de la quantité de protéines matricielles par PCR en temps réel et approches biochimiques.

Mots clés : Matrice Extracellulaire, Adipocyte Médullaire, Glucose

## **P29 Running-exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in male Wistar rats**

Céline Bourzac <sup>1,2</sup>, Mathieu Manassero <sup>1,2</sup>, Morad Bensidhoum <sup>1</sup>, Stéphane Pallu <sup>1,2,3</sup>, Hugues Portier <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> B2OA UMR 7052, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, CNRS, Paris, France ; <sup>2</sup> B2OA UMR 7052, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France ; <sup>3</sup> COST, Université d'Orléans, Orléans, France

This study aims to investigate the most osteogenic exercise-conditioning program for bone-defect repair in Wistar rats. We hypothesized that high-intensity-interval running will improve the healing of non-critical size bone defects.

Thirty male Wistar rats were divided in three groups (n=10): Sedentary Control (SC), Continuous running (CR, 45 min at moderate speed, 70% maximal aerobic speed ) and Intermittent running (IR, repeated cycles of -5 min at moderate speed, followed by 2 min of intensive running at 90% maximal aerobic speed, and 1 min of passive recovery-). Training lasted for 8 weeks (5 days/week, 45min/day). Then, a surgical procedure was performed (bone defect in the right tibia and femur). No exercise was performed during the convalescence period. The healing-tissue microarchitectural parameters were assessed once a week for 4 weeks by microCT, and serum alkaline phosphatase (ALP) by an enzymatic assay at 4 weeks. Experimental protocols were approved by the local Animal Ethical Committee. Comparisons were made using a Kruskal-Wallis test, then a Mann-Witney test when applicable, with significance set at  $p < 0.05$ .

The percentage of bone-volume variation in the tibia was significantly higher in CE and IE at 2 and 4 weeks, compared to respective results obtained in SC, and in IE compared to CE at 4 weeks. In contrast, the percentage of bone-volume variation in the femur was similar in all groups, at each time-point. In CE and IE, this percentage was higher in the tibia than in the femur at 2 and 4 weeks. ALP dosages were similar in all groups.

Continuous and Intermittent exercise-conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in Wistar rats. The tibia may be a better model than the femur to study bone repair. The observed differences between the tibia and the femur may be explained by differences in mechanical loading during running.

Mots clés : High-intensity-interval exercise, bone repair, rat

### **P30** **Projet TEXTOS : développement d'une matrice de PLGA biofonctionnelle pour la régénération tissulaire**

Sevde Celik <sup>1</sup>, Marie Dubus <sup>1</sup>, Xavier Carette <sup>2</sup>, Jean Marie Raquez <sup>2</sup>, Rosica Mincheva <sup>2</sup>, Olivier Jolois <sup>3</sup>, Mohamed Boudifa <sup>4</sup>, Fany Reffuveille <sup>1</sup>, Halima Kerdjoudj <sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 4691 Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux (BIOS), SFR CAP Santé (FED4231), Université de Reims Champagne-Ardenne, France ; <sup>2</sup> Laboratory of Polymeric and Composite Materials (LPCM), University of Mons, Belgium ; <sup>3</sup> Centre du textile Belge (CENTEXBEL), Liège, Belgique ; <sup>4</sup> CRITT-MDTS, Charleville-Mézières, France

L'ingénierie tissulaire en médecine régénérative constitue un domaine en pleine évolution dont le but est de réparer, remplacer et régénérer des tissus et organes endommagés. Le projet TEXTOS, issu du programme France-Wallonie-Vlaanderen, consiste à développer une matrice 3D innovante bio-fonctionnalisée à base d'acide polylactique et de chitosane pour la reconstruction osseuse. Plusieurs acteurs sont mis en jeu, notamment dans la mise au point des fils d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (LPCM-UMons), la fonctionnalisation de surface au chitosane (CRITT-MDTS), la fabrication additive textile (Centexbel) et enfin la validation biologique en vue de son utilisation en reconstruction osseuse (BIOS-URCA).

Des plaques à base d'acide polylactique ont été préparés par la technique de solvant casting et ont été soumis à l'action du plasma atmosphérique pendant 20, 40 et 60 sec. L'adhésion des cellules souches mésenchymateuses ensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> a été évaluée après 24h par WST-1. La surface biocompatible a ensuite été recouverte par du chitosane à 1mg/mL et l'activité antimicrobienne vis à vis de la souche clinique de *Staphylococcus aureus* SH1000 a été évaluée après 24h de contact/d'adhésion.

L'adhésion des cellules souches mésenchymateuses sur le polymère PLA a été augmentée significativement après exposition de la surface au plasma atmosphérique pendant 40 sec. Aucune différence avec le témoin plastique n'a été observée entre les surfaces traitées pendant 40 et 60 sec. L'activation de la surface au plasma a permis une meilleure accroche du chitosane au polymère. Les propriétés antibactériennes du chitosane semblent être conservées après fonctionnalisation. En effet, une réduction de l'adhésion bactérienne d'un facteur 2,7 est observée.

La fonctionnalisation de la surface des polymères par le plasma améliore d'une part l'adhésion des cellules mais également l'accroche du chitosane qui conserve ses propriétés antimicrobiennes. Cette stratégie semble prometteuse pour la mise en oeuvre de la matrice 3D par textile.

Remerciements : Programme TEXTOS : Interreg V France-Wallonie-Vlaanderen.

Mots clés : Textiles, ingénierie tissulaire osseuse, infection

**P31\* Importance of dectin-1 for the control of inflammatory osteoclastogenesis**

Maria-Bernadette Madel \* <sup>1,2</sup>, Lidia Ibáñez <sup>1,2,3</sup>, Myriam Salah <sup>1,2</sup>, Antoine Boutin <sup>1,2</sup>, Rodolphe Pontier-Bres <sup>4</sup>, Majlinda Topi <sup>1,2</sup>, Dorota Czerucka <sup>4</sup>, Matthieu Rouleau <sup>1,2</sup>, Abdelilah Wakkach <sup>1,2</sup>, Claudine Blin-Wakkach <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de Médecine, Nice, France ; <sup>2</sup> Université Côte d'Azur, Nice, France ; <sup>3</sup> Department of Pharmacy, Cardenal Herrera-CEU University, Valencia, Spain ; <sup>4</sup> Centre Scientifique de Monaco, Monaco

Estrogen deficiency-associated bone loss has been linked to alterations of gut microbiota that leads to an overproduction of inflammatory cytokines by activated T cells resulting in enhanced osteoclastogenesis. Bacterial probiotics (e.g. *Lactobacillus* species) have beneficial effects in osteoporotic mice that were attributed to a decrease in inflammatory T cells. As presented last year, we observed similar protective effect on bone destruction in ovariectomized (OVX) mice using the yeast probiotics *Saccharomyces Boulardii* (Sb). In addition to reduced T cell activation, our very preliminary results suggested that Sb could have a direct effect on osteoclasts (OCLs).

We recently showed that in pathological conditions related to bone destruction, OCLs differ from those in steady state. They express distinct markers and have opposite immune functions, ranging from anti-inflammatory effects for steady state tolerogenic OCLs (t-OCLs) to pro-inflammatory responses for inflammatory OCLs (i-OCLs) emerging in inflammation. This description of OCL diversity is very new and has not yet been explored in the context of therapeutic approaches. Thus, the aim of this study was to decipher the molecular mechanisms by which yeast probiotics modulate the different OCL populations in the context of osteoporosis in mouse.

We assessed in vitro the effect of Sb-conditioned medium on the differentiation of t-OCLs and i-OCLs generated from monocytes and dendritic cells, respectively. Sb-conditioned medium slightly decreased the formation of t-OCLs ( $p=0.004$ ), but completely inhibited the formation of i-OCLs ( $p<0.0001$ ). Transcriptomic profiling (RNAseq) on purified i-OCLs and t-OCLs revealed differences in functional and molecular pathways associated with host defense and immune responses. We identified the pattern-recognition receptor Dectin-1 ( $p=0.07$ ;  $\log_2FC -1.19$ ) which is upregulated in i-OCLs. This receptor is involved in antifungal immunity by mediating responses to yeast wall-derived  $\beta$ -glucans. It has also been involved in modulation of osteoclastogenesis but results are still controversial. We investigated the effect of Sb on OCL differentiation using the Dectin-1 agonist Curdlan. Presence of Curdlan during OCL differentiation blocked the emergence of i-OCLs ( $p=0.005$ ) without significant effects on t-OCL differentiation. We performed the same experiments using OCLs derived from OVX and SHAM mice. Curdlan dramatically blocked OCL differentiation from OVX mice ( $p<0.0001$ ) but had very low effects on OCLs from SHAM mice. Experiments on the effect of Curdlan on mature i-OCL immune function and survival are still ongoing. Our results reveal new mechanisms involved in the protective effect of yeast probiotics on inflammatory bone loss. We identified the Dectin-1 pathway as a key pathway to specifically block i-OCLs while maintaining t-OCLs. Such a targeted approach is highly promising as it could avoid the detrimental effects of global inhibition of OCLs on bone.

Mots clés : Osteoclast, Microbiota, Inflammation

### P32 Étude de la qualité osseuse des os longs de souris invalidées pour PiT2 par microspectrométrie Raman

Guillaume Falgayrac<sup>1</sup>, Giulia Frangi<sup>2</sup>, Cécile Olejnik<sup>1,3</sup>, Caroline Vignes<sup>2</sup>, Jérôme Guicheux<sup>2,4</sup>, Laurent Beck<sup>2</sup>, Guillaume Penel<sup>1,3</sup>, Sarah Beck-Cormier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 4490 PMOI- Physiologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, F-59000 Lille, France ; <sup>2</sup> INSERM, UMR 1229, Regenerative Médecine and Skeleton (RMeS), Université de Nantes, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique (ONIRIS), F-44000 Nantes, France ; <sup>3</sup> CHU Lille Service d'Odontologie, F-59000 Lille, France ; <sup>4</sup> CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, FRANCE

Nous avons récemment montré que l'invalidation du gène *Slc20a2* codant pour le co-transporteur sodium-phosphate PiT2 altère la rigidité et la solidité osseuse (Beck-Cormier et al, JBMR 2019). En effet, l'analyse des paramètres biomécaniques en test 3 points montre que les os PiT2KO sont moins rigides et plus cassants par rapport aux os de souris contrôles (wild-type, WT). De plus, les valeurs de point de rupture, de contrainte maximale et du module de Young sont inférieures aux valeurs attendues d'après le contenu en minéral (BMC) déterminé dans une cohorte de 320 souris WT indiquant que la qualité osseuse est altérée. Or, la diminution de la solidité des os PiT2KO ne peut pas seulement s'expliquer par les faibles diminutions d'épaisseur corticale et de BMC.

Sachant que la qualité osseuse représente un ensemble de facteurs interdépendants associant à la fois des paramètres structurels et de composition de l'os (géométrie osseuse, microarchitecture, orientation, interrelation des protéines matricielles et des fibrilles de collagène, taille des cristaux d'apatite), nous avons utilisé la technique de microspectroscopie Raman pour évaluer une partie de ces paramètres chez les souris PiT2KO.

L'analyse a été réalisée à partir de fémurs de souris WT (n=4) et PiT2KO (n=7) sur un spectromètre Raman LabRAM HR800 (HORIBA JY) doté d'un laser à 785 nm et d'un objectif de microscope x50. Au niveau de la diaphyse, trois zones corticales ont été choisies selon des critères anatomiques en lien avec l'âge osseux : le périoste, le centre et l'endoste. Cinq paramètres physico-chimiques (PPC) ont été évalués à partir des spectres Raman. Le taux de minéralisation, le taux de carbonatation et la cristallinité évaluent la composition et structure du minéral. La maturité collagénique et le ratio hydroxyproline/proline évaluent la qualité du collagène. Les PPC sont comparés à zones équivalentes pour évaluer l'effet du génotype (analyses statistiques : test Mann-Whitney).

Nous montrons que le taux de minéralisation est modifié chez les souris PiT2KO par rapport aux souris WT. Il est diminué dans la zone du périoste (-13%,  $p < 0,0001$ ), non modifié au centre de la corticale et augmenté dans l'endoste (+27%,  $p < 0,0001$ ). Le taux de carbonatation est diminué (-2%,  $p = 0,0082$ ) dans le périoste seulement. La cristallinité, qui reflète l'organisation du minéral, est faiblement augmentée (+1,2%,  $p < 0,0001$ ) dans l'endoste des fémurs PiT2KO. Il n'y a pas de différence de maturité du collagène chez ces souris. Par contre, le ratio hydroxyproline/proline est diminué dans toutes les zones analysées de l'os cortical des fémurs PiT2KO par rapport aux souris WT (en moyenne -6,7%,  $p < 0,05$ ) indiquant un défaut de la qualité du collagène.

Cette étude suggère que des défauts de la trame du collagène pourraient être à l'origine de la diminution des propriétés biomécaniques observées chez les souris PiT2KO. L'analyse détaillée de la qualité du collagène sera complétée par microscopie FTIR.

Mots clés : spectroscopie Raman, qualité osseuse, co-transporteur sodium-phosphate PiT2

### **P33\* Le stress apoptotique potentialise l'effet pro-ostéoclastogénique du sécrétome de cellules souches mésenchymateuses in vitro**

Paul Humbert <sup>\*1</sup>, Meadhbh A Brennan <sup>1,2</sup>, Julien De Lima <sup>1</sup>, Céline Charrier <sup>1</sup>, Régis Brion <sup>1</sup>, Frédéric Blanchard<sup>2</sup>, Pierre Layrolle <sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 1238 Phy-OS, Nantes, France ; <sup>2</sup> Harvard School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, Cambridge, MA, United States

L'étude clinique ORTHOUNION a pour but d'évaluer l'association de biomatériaux phosphocalciques (BCP) et de cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées de la moelle comme alternative à la greffe osseuse autologue pour le traitement des fractures non consolidées des os longs. Chez la souris, cette association BCP/CSM permet d'induire la formation d'os en site intramusculaire et sous-cutané. Néanmoins, les CSM implantées disparaissent rapidement (réponse inflammatoire, hypoxie, accès aux nutriments) et l'os néoformé est principalement d'origine murine. En amont de la formation osseuse, des ostéoclastes sont observés sur le biomatériau et leur déplétion avec un anticorps anti-RANKL empêche la formation osseuse. Notre hypothèse est que les CSM implantées modulent la réaction à corps étrangers et favorisent le développement des ostéoclastes au contact des biomatériaux. Les ostéoclastes vont alors recruter de nouvelles cellules souches squelettiques de l'hôte qui se différencieront en ostéoblastes et formeront le tissu osseux.

Notre objectif est de modéliser ce système in vitro pour comprendre les communications entre les CSM implantées et les ostéoclastes.

Des CSM de moelle osseuse humaine ont été ensemencées sur des granules de BCP pour mimer le protocole d'implantation in vivo. La viabilité des cellules diminue de moitié ou plus après seulement 48 heures. Le milieu conditionné (MC) de cette culture favorise la fusion de monocytes humains CD14<sup>+</sup> en ostéoclastes TRAP<sup>+</sup>, induisant la formation de cellules plus grandes, mais ne remplace pas l'apport exogène de RANK-L. Étonnamment, des résultats comparables ont été obtenus avec des CSM à passage élevé (p>8) ou dérivées de tissus adipeux alors que ces cellules induisent moins efficacement la formation osseuse in vivo. Sur plastique, différentes formes de stress cellulaires ont été testés sur les CSM : apoptotique (staurosporine), oxydatif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hypoxique (0,1% d'O<sub>2</sub>).

Le stress apoptotique induit par de faibles doses de staurosporine permet d'obtenir des MC capables d'augmenter la taille et le nombre des ostéoclastes. En plus de son effet pro-ostéoclastogénique en présence de RANK-L, le MC apoptotique semble inversement bloquer la fusion de monocytes stimulés avec de l'interleukine 4, qui forment normalement des cellules géantes multinucléées (MNGC). Ces MC produits sans sérum peuvent être concentrés sans perte d'activité et pourront être analysés en protéomique (spectrométrie de masse, analyse multiparamétrique Luminex). Une analyse préliminaire a permis de détecter après stress cellulaire une surexpression des cytokines IL-6, IL-8 et VEGF.

Les CSMs en condition de stress apoptotique in vitro produisent donc des médiateurs capables à la fois de favoriser le développement d'ostéoclastes et d'inhiber la formation de cellules géantes inflammatoires. Ces résultats permettent de mieux comprendre le processus de régénération osseuse induite par l'implantation de CSMs et de BCP.

Mots clés : Biomatiériau, Cellules souches, Ostéoclastes

### **P34 In situ prevascularization designed by Laser-Assisted Bioprinting: effect on bone regeneration**

Olivia K  rour  dan <sup>1,2,3</sup>, Davit Hakobyan <sup>4</sup>, Murielle Rémy <sup>1,2</sup>, Sophia Ziane <sup>1,2,3</sup>, Nathalie Dusserre <sup>4</sup>, Jean-Christophe Fricain <sup>1,2,3,4</sup>, Damien Le Nihouannen <sup>1,2</sup>, Samantha Delmond <sup>5</sup>, No  lie B. Thébaud <sup>1,2,3</sup> et Raphaël Devillard <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33076 Bordeaux, France ; <sup>2</sup> Université de Bordeaux, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33076 Bordeaux, France ; <sup>3</sup> CHU de Bordeaux, Services d'Odontologie et de Santé Buccale, F-33076 Bordeaux, France ; <sup>4</sup> ART BioPrint, INSERM, U1026, F-33076 Bordeaux, France ; <sup>5</sup> CHU de Bordeaux, INSERM, CIC1401, F-33000 Bordeaux, France

Vascularization plays a crucial role in bone formation and regeneration process. Development of a functional vasculature to improve survival and integration of tissue-engineered bone substitutes remains a major challenge. Biofabrication technologies, such as bioprinting, have been introduced as promising alternatives to overcome issues related to lack of prevascularization and poor organization of vascular networks within the bone substitutes.

In this context, this study aimed at organizing endothelial cells in situ, in a mouse calvaria bone defect, to generate a prevascularization with a defined architecture, and promote in vivo bone regeneration. Laser-Assisted Bioprinting (LAB) was used to pattern Red Fluorescent Protein (RFP)-labeled endothelial cells into a mouse calvaria bone defect of critical size, filled with collagen containing mesenchymal stem cells and vascular endothelial growth factor (VEGF).

LAB technology allowed safe and controlled in vivo printing of different cell patterns. In situ printing of endothelial cells gave rise to organized microvascular networks into bone defects. At two months, vascularization rate (vr) and bone regeneration rate (br) showed statistically significant differences between the "random seeding" condition and both "disc" pattern (vr=+203.6%; br=+294.1%) and "crossed circle" pattern (vr=+355%; br=+602.1%).

These results indicate that in vivo Laser-Assisted Bioprinting is a valuable tool to introduce in situ prevascularization with a defined configuration and promote bone regeneration.

Mots clés : bone, vascularization, bioprinting



### **P35 Effets d'un mélange de 7 pesticides à faibles doses sur des cellules du microenvironnement de tumeurs osseuses primitives**

Valérie Trichet<sup>1</sup>, Louis-Romée Le Nail<sup>1</sup>, Elhadji Ngom<sup>1</sup>, Pierre Layrolle<sup>1</sup>, Françoise Rédini<sup>1</sup>, François Valette<sup>3</sup>, Olivier Hérault<sup>2</sup>, Christophe Olivier<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 1238, Phy-Os, Université de Nantes, Nantes, France ; <sup>2</sup> CNRS UMR 7292, LNOx, Université de Tours, Tours, France ; <sup>3</sup> INSERM UMR 1232, CRCINA, Université de Nantes, Nantes, France

À travers notre alimentation, nous sommes exposés quotidiennement à de faibles doses de pesticides, qui prises individuellement, ne dépassent pas le seuil de sécurité alimentaire. Une polyexposition longue à de faibles doses de 7 pesticides a induit la sénescence de cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) (Hochane et al., Stem Cells 2017 ; Lévêque et al., Stem Cells 2019). Ce mélange n'a pas induit pas de transformation des CSM mais a potentialisé le caractère tumoral de CSM portant 4 mutations oncogéniques. Le tissu osseux est le siège permanent d'un remodelage entre l'activité ostéogénique des ostéoblastes et l'activité ostéolytique des ostéoclastes. Les ostéosarcomes (OS) et les tumeurs à cellules géantes (TCG) sont des tumeurs osseuses primitives qui sont rares mais dont les traitements actuels restent insatisfaisants. Ces tumeurs dérivent de cellules du tissu mésenchymateux et lors de leur développement, elles activent une ostéolyse excessive. Au sein du microenvironnement des sarcomes osseux, les interactions des CSM avec les ostéoclastes sont impactées. Nous étudions les effets du cocktail de 7 pesticides sur le microenvironnement des OS et des TCG. Notre hypothèse est que l'induction d'un stroma sénescent pourrait aggraver ces tumeurs. Les résultats montrent que ce cocktail sur des CSM dérivées d'OS (CDOS) a un effet antiprolifératif, qu'il induit une augmentation de la taille des cellules et une modification de leur sécrétome. Le sécrétome des CDOS ainsi que celui de cultures primaires de TCG, préalablement exposées aux pesticides, favorisent la différenciation ostéoclastique. Des analyses de méthylation du génome montrent un effet hypométhylant des pesticides sur des séquences transposables du génome (LINES) tandis que l'analyse des variations de la méthylation des régions promotrices de différents suppresseurs de tumeur est en cours.

Mots clés : Tumeurs osseuses primitives, pesticides, cellules souches mésenchymateuses

### **P36 Effets du monosodium glutamate sur la qualité osseuse l'os en situation de restriction protéique**

Anne Blais <sup>1</sup>, Gaël Y. Rochefort <sup>2</sup>, Juliane Calvez <sup>1</sup>, François Blachier <sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR PNCA, Agroparistech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, France; <sup>2</sup> INSERM UMR 1229 - Regenerative Medicine and Skeleton, Dental Faculty, Nantes, France

Le but de cette étude est d'étudier l'effet du monosodium glutamate (MSG), un exhausteur de goût, sur la physiologie osseuse en situation de restriction protéique. Nous avons développé au laboratoire un modèle murin qui, lorsqu'il est soumis à un régime modérément carencé en protéines (6% de l'énergie totale sous forme de protéine de soja) présente une perte de densité minérale osseuse et une altération de la microarchitecture osseuse par rapport aux valeurs mesurées lorsque le régime inclut 20% de protéine de soja ou 6% de caséine. Lors d'une première étude nous avons démontré que la restriction protéique induit une ostéopénie par inhibition des ostéoblastes. Dans la mesure où le glutamate semble activer les ostéoblastes, nous avons choisi ce modèle pour tester les effets de cet acide aminé sous sa forme monosodique sur la perte de densité osseuse liée à une restriction protéique.

Des souris Balb/c femelles ont été mises sous régime modérément carencé en protéines de soja pendant 12 semaines. L'étude incluait 8 groupes de 12 animaux : un groupe témoin ingérant un régime normoprotéique (NP) et 7 groupes ingérant un régime hypoprotéique (LP) qui incluait différentes concentrations de MSG (0,05, 0,1, 0,5, 1 ou 2%) ou de la PTH utilisée comme témoin positif, et un groupe sans MSG recevait un apport isosodé et isoazoté d'alanine. Les animaux ont été placés en cages individuelles afin de pouvoir mesurer leur consommation alimentaire et réaliser les expériences en « pair-feeding ». L'effet du complément MSG a été évalué par la mesure de la densité minérale osseuse par absorptiométrie biphotonique à rayons X, et par l'évaluation de marqueurs du remodelage osseux qui permettent de rendre compte des activités de résorption et de formation osseuse. Nous avons également évalué la macroarchitecture de l'os corticale et la microarchitecture de l'os trabéculaire.

L'ingestion du régime LP arrête la croissance des souris et induit une réduction de gain de masse osseuse. L'ingestion de MSG n'a pas d'effet sur la croissance, mais permet un gain de masse osseuse similaire à celui observé lorsque les animaux ingèrent le régime NP. La préservation de la densité minérale osseuse est corrélée à une augmentation des concentrations plasmatiques des marqueurs de l'activité des ostéoblastes, sans modification des marqueurs de l'activité des ostéoclastes. L'évaluation de la microarchitecture montre que l'os cortical est moins sensible à la complémentation avec MSG que l'os trabéculaire. De plus, le MSG stimule la synthèse du collagène de type I, constituant protéique majeur de la matrice osseuse.

Le MSG a donc un effet positif sur les paramètres osseux chez la souris en restriction protéique. Une complémentation en MSG pourrait donc être bénéfique pour maintenir la qualité des os en particulier chez les personnes dénutries à risque d'ostéoporose.

Mots clés : Densité minérale osseuse, Microarchitecture, Marqueurs du remodelage osseux

### P37 Rôle osseux de la voie de signalisation $G\alpha q/11/PCK$ en cas d'hyperparathyroïdie induite par la maladie rénale chronique dans un modèle murin

Sébastien Rizzo<sup>1</sup>, Justine Bacchetta<sup>1,2</sup>, Georges Boivin<sup>1</sup> et Ariane Zaloszcyc<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1033, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; <sup>2</sup> Centre de Référence des Maladies Rénales Rares, Centre de Références des Maladies Rares du Calcium et du Phosphore; <sup>3</sup> Imagerie Préclinique – UF6237, Pôle d'imagerie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>4</sup> Service de Pédiatrie 1, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>5</sup>INSERM UMR S 1109, ImmunoRhumatologie Moléculaire, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Strasbourg, France

La parathormone (PTH) joue un rôle clé dans l'homéostasie osseuse. En se liant à l'ostéoblaste par son récepteur couplé à la protéine G, elle active au minimum deux cascades de signalisation. La première voie  $G\alpha s/PKA$  joue un rôle anabolique en clinique et avec des modèles murins. La deuxième voie de signalisation fait intervenir la protéine  $G\alpha q/11/PCK$ , dont le rôle n'est que partiellement connu à ce jour. Lors de la maladie rénale chronique (MRC), les patients présentent une hyperparathyroïdie (HPT) secondaire à l'atteinte rénale conduisant à une fragilité osseuse. Une inactivation de  $G\alpha q/11$  dans un modèle murin conduit à une majoration de l'effet ostéoblastique lors d'injections quotidiennes de PTH.

L'objectif était de décrire le rôle osseux de la voie de signalisation  $G\alpha q/11/PCK$ , en cas d'HPT induite par la MRC. Nous voulions ainsi déterminer si l'inactivation de cette voie était une cible thérapeutique pour les patients insuffisants rénaux.

Nous avons étudié la microarchitecture et le remodelage osseux par histologie dans un modèle de souris transgéniques inactivées pour la voie  $G\alpha q/11/PCK$  avec ou sans insuffisance rénale. Des vertèbres lombaires de 4 groupes de 4 souris ont été étudiées, en absence de MRC les souris contrôles (CO) et les souris Knockout  $G\alpha q/11/PCK$  (KO), en présence d'une MRC (COMRC et KOMRC), à 24 semaines de vie soit à 12 semaines de MRC. L'histologie a été réalisée après inclusion en méthacrylate de méthyle sans décalcification préalable, sur coupes épaisses de 8  $\mu m$  colorées au Trichrome de Goldner et les variables mesurées sont des paramètres de structure [BV/TV (Bone Volume/Tissu volume), BS/BV (Bone Surface/Bone Volume), Trabecular Thickness, Trabecular Number, Trabecular Separation] et statiques de formation/résorption [OV/BV (Osteoid Volume/Bone Volume), OS/BS (Osteoid Surface/Bone Surface), Ob.S/BS (Osteoblast Surface/Bone Surface)]. Des tests Mann Whitney ont été effectués.

Les variables histomorphométriques ne sont pas significativement modifiées entre les différents groupes, excepté OS/BS qui augmente chez les KOMRC versus CO. A noter que certaines comparaisons sont à la limite de la significativité comme Ob.S/BS entre les CO et KOMRC, avec une tendance à l'augmentation chez les KOMRC. Ces résultats montrent une augmentation des surfaces ostéoïdes chez les KOMRC. Ils confortent l'analyse réalisée par micro-TDM au niveau fémoral qui montrait une altération de la structure corticale chez les KOMRC sans altération de la structure trabéculaire. De plus, les KOMRC présentaient un trouble du remodelage osseux avec une activité ostéoblastique augmentée mesurée par scintigraphie osseuse quantitative au niveau des genoux comparativement aux CO à 10 semaines de vie, et une activité diminuée à 24 semaines (résultats non publiés).

L'inactivation de la voie  $G\alpha q/11/PCK$  chez la souris, en présence de MRC, conduit à une augmentation de la formation ostéoïde sans modification majeure de la structure osseuse trabéculaire.

Mots clés : Maladie Rénale Chronique,  $G\alpha q/11/PCK$ , histologie

### **P38\* La difficile récupération du tissu osseux suite à un vol spatial n'est pas seulement un problème de mécanosensibilité des ostéocytes (Ocy), l'exemple des femurs de souris de la mission BIONM1**

Mélanie Dhayer \*, Vasily Gnyubkin, Norbert Laroche, Mireille Thomas, Marie-Thérèse Linossier, Laurence Vico, Alain Guignandon

INSERM U1059 LBTO St Etienne, France

Le déchargement mécanique induit par les vols spatiaux provoque une perte osseuse rapide et sévère parfois irrémédiable chez l'homme (Vico et al, 2017). La compréhension des mécanismes de récupération de l'os est importante pour permettre de trouver des contremesures efficaces contre la progression de la perte osseuse post-vol. La mission spatiale de 30 jours (j) du biosatellite BionM1 nous a permis de caractériser les changements du squelette de souris mâles matures C57BL6J (n=5/groupe) en  $\mu$ G (Flight) et lors d'une récupération de 8j sur Terre (Flight+rec) en comparaison à des souris contrôles (habitat standard) et contrôles habitat (simulation de l'habitat en vol, habitat control). Les premiers résultats tissulaires (Gerbaix et al, 2017) ont confirmé une activité accrue de la résorption et un arrêt de la formation en  $\mu$ G qui se normalise rapidement lors de la REC laissant penser à un rôle décisif des Ocy via RANKL et SOST. Dans ce contexte, l'étude du profil d'expression transcriptomique, en  $\mu$ G et après une REC de 8j permet de tester la réactivité des Ocy, des ostéoblastes (OB) et des adipocytes (AD) sur des extraits de fémurs proximaux de souris. Le faible nombre d'animaux ainsi que la grande variabilité des réponses interindividuelles (observable chez les astronautes) limite le pouvoir statistique des analyses. SOST est augmentée en vol et diminuée suite à la REC (+54,6%, -68,7%) comme les marqueurs de sénescence (p21 +196,3% (\*\*), -39,6% (p=0.15) ; p53 +94,3% (\*\*), -20,7% (p=0.15); IL6 +40,3% (p=0.08), -4,2% (p=0.11)). La REC s'accompagne d'une réversion rapide (<8j) de la plupart des réponses observées pendant le vol ce qui atteste de la bonne mécano sensibilité des ostéocytes en vol et dès le retour sur terre. Au contraire, la podoplanine et la périostine ne sont pas modifiées en vol mais sont augmentées en REC (+92,2%, +129,3% (p=0.06)). Il n'est pas exclu que de nouveaux ostéocytes plus mécanosensibles soient déjà produits sous-tendus par la tendance à la diminution du nombre de lacunes d'Ocy vides en REC. L'exploration sur des coupes histologiques par immunohistochimie de l'activité des ostéocytes devrait permettre de confirmer cette hypothèse. Au niveau tissulaire, il avait été montré que le nombre d'AD médullaires augmentent en vol et persistent après REC, ce qui a été confirmé par l'expression génique (PPARY +37,3% (\*\*), C/EBP $\alpha$  +90,8% (\*\*), Leptine +115%). Ce phénomène s'accompagne d'une régulation à la hausse des marqueurs précoces de la différenciation OB (RunX2 +42% (\*\*), Ostx +26,3%) qui se normalise en REC avec une augmentation de l'ostéocalcine (+58,8% (p=0.15)) qui pourrait être le signe d'une ostéoblastogenèse bloquée précocement en vol.

En conclusion, la présence d'AD médullaire et/ou la dérégulation de la différenciation des cellules souches squelettiques (cf. mission Invitrobone) pourraient bien retarder et/ou empêcher la récupération de la masse osseuse post-vol et être plus décisive que la perte de sensibilité des Ocy.

Mots clés : Microgravité, BionM1, Récupération

### **P39 La mutation f508del du gène *CFTR* dérégule la différenciation et l'activité fonctionnelle des ostéoclastes**

ML Jourdain<sup>1</sup>, C Guillaume<sup>1</sup>, J Braux<sup>1</sup>, D Hubert<sup>2</sup>, F Velard<sup>1</sup>, J Jacquot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 4691 BIOS, Université Reims Champagne Ardenne, Reims, France ; <sup>2</sup>Service de pneumologie, CRCM, Hôpital Cochin, Paris, France

La pathologie osseuse est une des comorbidités majeures avec le diabète affectant les patients atteints de mucoviscidose (CF). Il a été démontré qu'il existe une dérégulation de l'expression des récepteurs de RANK-L et M-CSF impliqués dans la différenciation des précurseurs monocytaires en ostéoclastes (OCs) (Velard F et al. AJRCCM, 2018). Notre hypothèse est que la mutation F508del de *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) pourrait altérer la différenciation et l'activité fonctionnelle des OCs.

La différenciation en ostéoclastes de monocytes issus du sang de patients CF-F508 homozygotes (n=7) et hétérozygotes (n=10) et de monocytes de sujets sains contrôles (non-CF, n=8, âgés de 36 à 68 ans) en présence ou non d'un inhibiteur de *CFTR* (*CFTR*-Inh172, 10  $\mu$ M), a été analysée après 7-14-21 jours de culture (Abdallah et al. 2018). Le nombre d'OCs formés, leur taille et leur activité de résorption sur dentine ont été analysés. L'expression des gènes codant deux récepteurs à la S1P (*S1PR1* et *S1PR2*) a été évaluée par RTqPCR. La S1P a été dosée par ELISA dans les sera de patients CF-F508 (n=5) et de sujets sains (n= 3) ainsi que dans les surnageants de culture d'OCs.

Nos résultats mettent en évidence que la mutation F508del de *CFTR* réduit significativement le nombre d'OCs formés à partir des monocytes de patients CF-F508 comparativement à ceux issus des monocytes sains non-CF. Cette réduction d'OCs formés s'accompagne d'une augmentation de leur taille et d'une diminution de leur capacité fonctionnelle à former des tranchées de résorption, qui est également retrouvée à partir de monocytes sains traités par l'inhibiteur Inh172. Dans les sera des patients CF-F508, les concentrations sériques de S1P sont augmentées par rapport aux sera des sujets sains. Par contre, la production de S1P par les OCs CF-F508 est réduite ainsi que pour les OCs sains traités par l'Inh172, comparativement à des OCs sains non traités. Le récepteur *S1PR1* est surexprimé en présence d'Inh172 à un temps précoce (J7) puis est sous-exprimé au temps tardif de la différenciation (J21) par rapport aux OCs sains non traités.

La S1P et son récepteur *S1PR1* jouent un rôle prépondérant dans la circulation des monocytes précurseurs d'OCs depuis le compartiment sérique vers le compartiment osseux via un gradient de concentration de S1P. La S1P est connu pour stimuler l'activité des ostéoblastes à former de l'os (Meshcheryakova A, 2017). Nos résultats mettent en évidence le rôle critique de la fonction de *CFTR* dans la production de S1P, la régulation du récepteur *S1PR1* et le potentiel de différenciation et de l'activité de résorption des OCs. Nos données suggèrent l'existence d'un découplage dans la communication entre les ostéoblastes et les OCs, via une réduction du nombre d'OCs formés et une production diminuée de S1P. Cela peut se traduire par une réduction de l'activité des ostéoblastes et par conséquent, une diminution de la formation osseuse chez les patients CF.

Mots clés : Ostéoclastes, Mucoviscidose, Sphingosine-1-Phosphate

# PARTICIPANTS

**A**

Fani ANAGNOSTOU  
fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr  
B3OA CNRS UMR 7052, INSERM U 1271, Paris

Caroline ANDRIQUE  
caroline.andrique@parisdescartes.fr  
EA2496, Dental School, University Paris  
Descartes, Paris

Adrienne ANGINOT  
adrienne.anginot@inserm.fr  
INSERM U1160, Paris

Florence APPARAILLY  
florence.apparailly@inserm.fr  
INSERM U1183, Montpellier

Yetki ASLAN  
yetki.aslan@inserm.fr  
INSERM U1132 and Paris Diderot University,  
Paris

**B**

Sammy BADR  
sammy@badr.fr  
PMOI EA4490 Université de Lille, Lille

Claire BARDET  
claire.bardet@parisdescartes.fr  
EA2496, Dental School, University Paris  
Descartes, Paris

Laurent BECK  
laurent.beck@inserm.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

Sarah BECK CORMIER  
sarah.beck@univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

Hamanou BENACHOUR  
hamanou.benachour@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Morad BENSIDOUM  
morad.bensidoum@paris7.jussieu.fr  
B3OA UMR 7052, CNRS, Paris

Anne BLAIS  
blais@agroparistech.fr  
UMR PNCA, Agroparistech, INRA, Université  
Paris-Saclay, Paris

Frédéric BLANCHARD  
frederic.blanchard@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

Claudine BLIN  
blin@unice.fr  
LP2M, UMR7370 CNRS - Université Côte d'Azur

Edith BONNELYE  
edith.bonnelye@inserm.fr  
LaBCT-CNRS ERL 6001/ INSERM U1232, Saint-  
Herblain

Jérôme BOUCHET  
jerome.bouchet1@parisdescartes.fr  
EA2496, Dental School, University Paris  
Descartes, Paris

Carole BOUGAULT  
carole.bougault@univ-lyon1.fr  
CNRS UMR5246 ICBMS, Lyon

Marianne BOURGUIGNON  
marianneb\_fr@yahoo.fr  
CNRS UMR7052 INSERM U-1271 B3OA

Odile BROUX  
broux@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

René BUCHET  
rbuchet@univ-lyon1.fr  
ICBMS UMR 5246 CNRS Université Lyon 1,  
Villeurbanne

**C**

Robin CAIRE  
caire.robin@gmail.com  
INSERM U1059-SAINBIOSE, Université de  
Lyon, Saint-Etienne

Alexandre CANDELLIER  
alexandre.candellier@gmail.com  
Laboratoire MP3CV, EA 7517, Université de  
Picardie Jules Verne, Amiens

Georges CARLE  
carle@unice.fr  
TIRO-MATOs UMR E4320 CEA/UNS - BIAM

Sevde CELIK  
sevde.celik@univ-reims.fr  
EA 4691 Biomatériaux et Inflammation en Site  
Osseux (BIOS), SFR CAP Santé (FED4231),  
Université de Reims, Champagne-Ardenne

Catherine CHAUSSAIN  
catherine.chaussain@parisdescartes.fr  
EA2496, Dental School, University Paris  
Descartes, Paris

Christophe CHAUVEAU  
chauveau@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Hawa CINAR  
havvacinar4@hotmail.com  
INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE St Etienne

Aline CLABAUT  
aline.clabaut@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Xavier COUTEL  
xavier.coutel@univ-lille.fr  
PMOI EA4490 Université de Lille, Lille

**D**  
Emilie DAMBROISE  
emilie.dambroise@institutimagine.org  
Institut Imagine, INSERM U1163, Paris

Souvik DAS  
souvik.das710@gmail.com  
MP3CV University Centre for Health Research,  
Amiens

Séverine DELPLACE  
delplace@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Mélanie DHAYER  
melanie.dhayer@gmail.com  
INSERM U1059 LBTO St Etienne

Ahmad Moustapha DIALLO  
ahmadmdiallo@gmail.com  
Laboratoire Biologie, Bioingénierie et  
Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA) CNRS  
UMR 7052, INSERM U 1271, Paris

Mamadou DIALLO  
mamadoutidian@yahoo.fr  
EA 2496, Laboratory Orofacial Pathologies,  
Imaging and Biotherapies, Paris Descartes  
Dental School, Université de Paris, Paris

**E**  
Laura ENTZ  
laura.entz@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

**F**  
Guillaume FALGAYRAC  
guillaume.falgayrac@univ-lille.fr  
PMOI EA4490 Université de Lille, Lille

Nadia FLISSI  
nadouph91@gmail.com  
Centre Universitaire de Recherche en Santé,  
Laboratoire EA7517, Université de Picardie  
Jules Verne, Amiens

Giulia FRANGI  
giulia.frangi@etu.univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

**G**  
Marlène GALLET  
marlene.gallet@u-picardie.fr  
M3PCV EA7517, Amiens

Angélique GALVANI  
angelique.galvani@univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

Philippe GANOT  
pganot@centrescientifique.mc  
Centre Scientifique de Monaco, Monaco

Joël GAUTRON  
joel.gautron@inra.fr  
BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly



Valérie GEOFFROY  
valerie.geoffroy@inserm.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

Olfa GHALI  
olfa.ghali@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Dorothee GIRARD  
dorothee.girard@inserm.fr  
Institut de Recherche Biomédicale des Armées,  
INSERM UMRS-MD 1197, Clamart

Stéphanie GOBERT  
stephanie.gobert@ibcp.fr  
UMR5305 CNRS, Université Lyon 1

Marie-Emmanuelle GORIOT  
marie-emmanuelle.goriot@inserm.fr  
UMRS-MD 1197, Clamart

Henri GRANEL  
henri.granel@inra.fr  
Université Clermont Auvergne; INRA UMR  
1019, Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand

Jérôme GUICHEUX  
jerome.guicheux@univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

Alain GUIGNANDON  
alain.guignandon@univ-st-etienne.fr  
U1059, Saint-Etienne

Pierre GUIHARD  
pierre.guihard@univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

**H**  
Pierre HARDOUIN  
pierre.hardouin@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Eric HAY  
eric.hay@inserm.fr  
INSERM U1132, Paris

Lucie HENAUT  
lucie.henaut@u-picardie.fr  
MP3CV University Centre for Health Research,  
Amiens

Paul HUMBERT  
paul.humbert@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

**J**  
Ilhem-Lilia JAABAR  
ilhemplilia.jaabar@gmail.com  
Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA),  
INSERM UMRS-938 Sorbonne Université, Paris  
/ Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS),  
CNRS UMR-7197 Sorbonne Université, Paris

Yohan JOUAN  
yohann.jouan@inserm.fr  
Paris Diderot Université, Paris, , 2Inserm 1132,  
Paris

Marie-Laure JOURDAIN  
marie-laure.jourdain@univ-reims.fr  
EA4691 BIOS, Reims

**K**  
Saïd KAMEL  
said.kamel@u-picardie.fr  
MP3CV University Centre for Health Research,  
Amiens

Hervé KEMPF  
herve.kempf@inserm.fr  
IMoPA, Vandoeuvre-les-Nancy

**L**  
Jérôme LAFONT  
jerome.lafont@ibcp.fr  
Université Claude Bernard Lyon1 & UMR 5305

François LAMOUREUX  
francois.lamoureux@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

Damien LE NIHOUANNEN  
damien.le-nihouannen@u-bordeaux.fr  
1-INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-  
33076 Bordeaux, / 2-Université de Bordeaux,  
Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33076  
Bordeaux

Laurence LEGEAI-MALLET  
laurence.legeai-mallet@inserm.fr  
INSERM U1163, Paris

Alice LEROUX  
alice.leroux63@gmail.com  
Bioingénierie Tissulaire (BioTis), INSERM  
U1026, Université de Bordeaux, Bordeaux

Jean-Guillaume LETAROUILLY  
jeanguillaume.letarouilly@gmail.com  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Damien LETERME  
damien.leterme@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Delphine LOGEART  
delphine.logeart@cnsr.fr  
B3OA CNRS UMR7052

Stéphanie LUCAS  
stephanie.lucas@univ-littoral.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

## M

Mathieu MAALOUF  
mathieu.maalouf@univ-st-etienne.fr  
INSERM U1059 LBTO-SAINBIOSE St Etienne

Maria-Bernadette MADEL  
maria-bernadette.madel@univ-cotedazur.fr  
CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de Médecine,  
Nice

David MAGNE  
david.magne@univ-lyon1.fr  
ICBMS, UMR CNRS 5246, Lyon

Sophie MAILLARD  
sofywell@gmail.com  
Faculté de Chirurgie Dentaire - Paris Descartes,  
EA2496 Laboratoires Pathologies, Imagerie et  
Biothérapies orofaciales, Montrouge

Luc MALAVAL  
luc.malaval@univ-st-etienne.fr  
INSERM U1059 SAINBIOSE, St Priest en Jarez

Frédéric MARIN  
frederic.marin@u-bourgogne.fr  
UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de  
Bourgogne - Franche-Comté, Dijon

Delphine MAUREL  
delphine.maurel@u-bordeaux.fr  
BIOTIS - INSERM U1026, Bordeaux

Romuald MENTAVERRI  
romuald.mentaverri@u-picardie.fr  
MP3CV University Centre for Health Research,  
Amiens

Dominique MODROWSKI  
dominique.modrowski@inserm.fr  
INSERM U1132, Paris

Aurélie MONIOT  
aurelie.moniot@univ-reims.fr  
URCA, EA 4691 " Biomatériaux & inflammation  
en site osseux " (BIOS), Reims

Brice MOUKENGUE  
brice.moukengue@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

David MOULIN  
david.moulin@univ-lorraine.fr  
UMRS 938 Sorbonne/Inserm, Paris

## O

Cécile OLEJNIK  
cecile.olejnik@univ-lille.fr  
PMOI EA4490 Université de Lille, Lille

## P

Guillaume PENEL  
guillaume.penel@univ-lille.fr  
PMOI EA4490 Université de Lille, Lille

Maria-Luisa PEREZ LOZANO  
mluisa.perez@inserm.fr  
Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA),  
INSERM UMRS-938 Sorbonne Université, Paris  
/ Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS),  
CNRS UMR-7197 Sorbonne Université, Paris

Laura PEURIERE  
peuriere.laura@gmail.com  
INSERM, U1059, Université de Lyon, Saint-  
Etienne

Olivier PEYRUCHAUD  
olivier.peyruchaud@inserm.fr  
INSERM UMR 1033, Lyon

Anne POLIARD  
anne.poliard@parisdescartes.fr  
EA 2496 Orofacial Pathologies, Imagery and  
Biotherapies, Dental School Faculty, University  
Paris, Descartes, Montrouge

Sylvain PROVOT  
sylvain.provot@inserm.fr  
INSERM U1132, Paris

## Q

Thibaut QUILLARD  
thibaut.quillard@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

## R

Sandy RIBES  
sandy.ribes@parisdescartes.fr  
EA2496, Montrouge

Sébastien RIZZO  
sebastien.rizzo89@gmail.com  
INSERM UMR 1033, Lyon

Marthe ROUSSEAU  
marthe.rousseau@univ-st-etienne.fr  
U1059 INSERM/Université de Lyon,  
SAINBIOSE, Saint Etienne

## S

Jérémy SADOINE  
jeremy.sadoine@parisdescartes.fr  
EA2496, Dental School, University Paris  
Descartes, Paris

Jorune SAKALAUŠKAITE  
jorune.sakalauskaite@unito.it  
University of Turin, Italy & UMR CNRS 6282  
Biogéosciences, Dijon

Johan SERGHERAERT  
johan.sergheraert@etudiant.univ-reims.fr  
URCA, EA 4691 « Biomateriaux Inflammation  
en Site Osseux » (BIOS), Reims

Diana SILVA  
dianaimsilva@gmail.com  
LP2M, CNRS UMR7370, Université Côte d'Azur,  
Nice

Isabelle SIX  
isabelle.six@u-picardie.fr  
MP3CV University Centre for Health Research,  
Amiens

Lotfi SLIMANI  
lotfi.slimani@parisdescartes.fr  
Laboratoire EA2496 - "Pathologie, Imagerie &  
Biothérapies Orofaciales" Faculté de Chirurgie  
Dentaire, Montrouge

Lilian STAPANE  
lilian.stapane@inra.fr  
BOA, INRA, Université de Tours, Nouzilly

## T

Sylvie TAMBUTTE  
stambutte@centrescientifique.mc  
Centre Scientifique de Monaco, Monaco

Joëlle TCHICAYA-BOUANGA  
joelle.tchicaya-bouanga@inserm.fr  
INSERM UMR 1132 BIOSCAR, Paris

Indira TOILLON  
indira.toillon@inserm.fr  
Sorbonne Université, INSERM, Centre de  
Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012,  
Paris

Adrien TONIONE  
adri.tonione@yahoo.fr  
PMOI EA4490 ULCO, Boulogne sur Mer

Valérie TRICHET  
valerie.trichet@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

## V

Frédéric VELARD  
frederic.velard@univ-reims.fr  
EA 4691 « BIOS », Université de Reims  
Champagne-Ardenne, Reims

Franck VERRECCHIA  
franck.verrecchia@univ-nantes.fr  
Phy-Os, Inserm UMR1238, Nantes

Claire VINATIER  
claire.vinatier@univ-nantes.fr  
Inserm U1229-RMeS, Nantes

**W**

Abdelilah WAKKACH  
wakkach@unice.fr  
LP2M UMR7370 CNRS-Université Côte d'Azur

Yohann WITTRANT  
yohann.wittrant@inra.fr  
INRA, St Genes Champanelle

**Z**

Natalia ZAPATA-LINARES  
nzapata@alumni.unav.es  
Centre de Recherche Saint Antoine-UMRS\_938,  
Paris

Mylène ZARKA  
mylene.zarka@inserm.fr  
INSERM U1132, Paris

Olga ZHUKOUSKAYA  
Volha.zhukouskaya@unina.it  
Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging  
and Biotherapies EA 2496, Paris Descartes  
Dental School, Université de Paris, Paris