

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

[SPCTS UMR CNRS 7315 ; EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies]

Thèse pour obtenir le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline/spécialité : Biologie, Matériaux

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie et matériaux céramiques et traitement de surface

Présentée et soutenue par

Marie-Michèle GERMAINI

Le 24/01/2017

Elaboration de céramiques phosphocalciques pour l'ingénierie tissulaire osseuse : étude de l'influence des propriétés physico-chimiques des matériaux sur le comportement biologique *in vitro*

Thèse dirigée par M. Eric CHAMPION et M. Fabrice LALLOUE

Président du jury

Mme. Hélène BOEUF

Rapporteurs

M. Christophe DROUET, Chargé de Recherche CNRS, HDR, INP Toulouse, ENS des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques, CIRIMAT, CNRS UMR 5085

Mme. Delphine LOGEART, Chargée de Recherche CNRS, HDR, Université de Paris DIDEROT B2OA, CNRS UMR 7052

Examineurs

M. Didier BERNACHE-ASSOLLANT, Professeur ENS des Mines de Saint-Etienne, SAINBIOSE, INSERM U1026

Mme. Hélène BOEUF, Directrice de Recherche CNRS Université de Bordeaux Bio Tis, INSERM U1026

M. Joël BRIE, Professeur Associé CHU de Limoges, SPCTS, CNRS UMR 7315

M. Eric CHAMPION, Professeur Université de Limoges, SPCTS, CNRS UMR 7315

M. Fabrice LALLOUE, Professeur Université de Limoges, HCP, EA 3842

Mme. Amandine MAGNAUDEIX, Docteure, Université de Limoges, SPCTS, CNRS UMR 7315

Je puis tout par celui qui me fortifie (philippiens 4 : 13)

Remerciements

Cette thèse financée par la région Limousin et la chaire d'excellence SigmaLim a été effectuée au sein du laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface (SPCTS UMR CNRS 7315) à Limoges.

Mes remerciements s'adressent premièrement à mes encadrants, Messieurs les professeurs Eric Champion et Fabrice Lalloué.

Je remercie le Dr Christophe Drouet et le Dr Delphine Logeart d'avoir bien voulu être rapporteur de cette thèse. Vos commentaires, suggestions, remarques, corrections ont contribué à la qualité de ce manuscrit. Merci au Dr Hélène BCEUF pour avoir présidé mon jury de thèse. Merci également aux autres membres du Jury : M. Bernache Assolant, M. Joel Brie et Mme. Amandine Magnaudeix.

Je remercie la Chaire d'Excellence LabEx SigmaLim qui m'a permis de bénéficier d'une aide financière pour une mobilité jeune chercheur que j'ai effectuée dans le laboratoire du Professeur Bocaccini que je remercie pour son accueil.

Je remercie grandement le Dr Haidar avec qui je n'ai pas eu le privilège d'une longue collaboration, mais qui m'a fait confiance en m'acceptant en thèse.

Je remercie le Dr Urda Rüdrieh qui m'a associée à la mise en place de la salle de culture au laboratoire SPCTS. Ce fut pour moi une belle expérience.

Je remercie le Dr. Rainer Detsch et Alina Grünwald pour m'avoir encadrée pendant ce stage de 2 mois passés dans le laboratoire du professeur Bocaccini.

Je remercie tout le personnel du SPCTS qui m'a formée aux différentes techniques de caractérisations des biomatériaux, qui m'étaient jusque-là inconnues.

Merci à Marina pour la formation BET 8 points, l'ICP/OES, l'analyse carbone.

Merci à Sandra, pour ses conseils sur l'ICP/OES.

Merci à Marion pour la formation sur les fours et tout ce que j'ai pu apprendre d'elle.

Merci à M. Jaoul pour m'avoir transmis ses connaissances concernant le fonctionnement et rôle du profilomètre.

Merci à Etienne pour la réalisation du calibrage du four sous flux de CO₂ et ses nombreuses interventions sur le réacteur.

Merci à l'équipe MEB : Ariane, Yann, Patrice, Pierre pour tout ce temps passé à me former et à me communiquer leur précieux savoir-faire.

Merci à Solange pour la formation dilatométrie et ATG.

Merci à Isabelle pour son aide et pour ses interventions pertinentes qui m'ont beaucoup apporté lors des réunions.

Je remercie également les stagiaires : Yessica, Alex, Alexandre, Jonathan, Nassria qui ont participé aux essais de frittage et de mise au point des protocoles.

Merci à Richard pour la formation DRX et à Julie pour la formation IRTF.

Merci aux post-docs Quiang et Luis que j'ai eu le privilège de côtoyer pendant mon stage en Allemagne et qui m'ont accordé de leur temps pour la formation zêta potentiel et angle de contact.

Merci à Emeline pour sa grande participation à la fabrication des pastilles nécessaires à la réalisation de cette thèse.

Merci à Nicole pour son efficacité dans la recherche des publications qui m'étaient utiles pour mon travail de thèse.

Merci à Marc et Moustapha pour leur présence à ma soutenance et les conseils judicieux qu'ils ont bien voulu m'apporter à cette occasion.

Merci à Eveline et à Cyrielle pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à Anthony de m'avoir formée à la synthèse par précipitation en voie aqueuse.

Merci à Claire pour son assistance, dépannage, SOS BET 8 points.

Je veux, en terminant, rendre hommage à ma défunte mère pour m'avoir soutenue tout au long de ce cycle en dépit de sa maladie. Je l'associe par la pensée à mon père et à mes deux sœurs à qui je dédie cette thèse.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Sommaire

Remerciements	4
Droits d’auteurs	7
Sommaire	8
Table des illustrations	14
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations	19
Glossaire	21
Avant-propos	24
Chapitre I. Etude bibliographique	32
I.1. La biologie du tissu osseux sain : définition, composition, structure et fonctions	32
I.1.1. Morphologie du tissu osseux	32
I.1.2. Composition de l’os	33
I.1.3. Principaux mécanismes de l’ostéogenèse	35
I.1.4. Remodelage osseux	41
I.1.4.1 Mécanisme d’action du remodelage osseux.....	42
I.1.4.2 Contrôle du remodelage osseux.....	50
I.1.4.2.1. Conséquences physiopathologiques induites par des anomalies du remodelage osseux.....	51
I.1.5. Principaux mécanismes susceptibles de réguler le métabolisme osseux	51
I.1.5.1 Les hormones.....	51
I.1.5.2 Les facteurs de croissance.....	54
I.1.5.2.1. Régulation de l’activité ostéoclastique.....	54
I.1.6. Le tissu osseux sain : propriétés mécaniques	56
I.1.7. Interaction cellules osseuses / biomatériaux	58
I.1.7.1 Voie directe d’activation de l’adhésion des cellules osseuses.....	59
I.1.7.2 Interaction ostéoblastes et biomatériaux : influence de la composition chimique et de la microstructure.....	63
I.1.7.3 Interaction ostéoclastes et biomatériaux : influence de la composition chimique et de la microstructure.....	66
I.2. Biomatériaux et régénération osseuse	70
I.2.1. Les matériaux : définition, catégorie, propriétés chimiques et physiques	71
I.2.1.1 Les biocéramiques.....	72
I.2.1.1.1. Les biocéramiques de phosphate de calcium.....	72
I.2.1.2 Les bioverres.....	76
I.2.1.3 Les métaux.....	77
I.2.1.4 Les polymères.....	78

I.2.1.5 Les matériaux composites	79
I.2.2. Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse : de la première à la troisième génération	79
I.2.2.1 Composition chimique des céramiques de phosphate de calcium	82
I.2.2.1.1. Substitution en ions silicates dans l'hydroxyapatite	82
I.2.2.1.1.1. L'intérêt du silicium	82
I.2.2.1.1.2. Biodisponibilité du silicium	84
I.2.2.1.1.3. Substitution en ions silicates dans l'HA	84
I.3. Conclusion	92
Chapitre II. Les biomatériaux céramiques de phosphate de calcium : de la synthèse à la caractérisation physico-chimique	95
II.1.1. Synthèse par précipitation en voie aqueuse	95
II.1.1.1 Synthèse d'hydroxyapatite stœchiométrique (HA)	96
II.1.1.2 Synthèse d'hydroxyapatite silicatée (SiHA).....	97
II.1.1.3 Synthèse d'hydroxyapatite carbonatée (CHA)	97
II.1.1.4 Caractérisation des poudres	98
II.1.1.5 Mise en forme et frittage des céramiques	104
II.1.2. Caractérisations des pastilles frittées.....	106
II.1.2.1 Composition chimique des pastilles	107
II.1.2.2 Microstructure	111
II.1.2.2.1. Observation MEB	111
II.1.2.2.3.1. Porosité ouverte.....	113
II.1.2.2.3.2. Distribution des pores	113
II.1.2.3 Caractérisation de la surface des céramiques	114
II.1.2.4 Surface spécifique.....	114
II.1.2.5 Topographie de surface	115
II.1.2.6 Potentiel zêta	117
II.1.2.7 Mouillabilité	118
II.1.2.8 Discussion.....	120
II.1.3. Conclusion sur la caractérisation des biomatériaux	126
Chapitre III. Approche biologique : matériel et méthode	130
III.1. Plan expérimental.....	130
III.2. Matériels et Méthodes	132

III.2.1. Milieux de culture	132
III.2.1.1 Milieu de culture pour la lignée MC3T3-E1	132
III.2.1.1.1. Milieu de culture de différenciation ostéogénique	132
III.2.1.2 Milieu de culture pour la lignée RAW 264.7	133
III.2.1.3 Conditions de culture	133
III.2.2. Interaction des cellules au contact des différents biomatériaux	133
III.2.2.1 Densité cellulaire.....	134
III.2.2.2 Adhésion cellulaire	134
III.2.3. Biocompatibilité des biomatériaux	137
III.2.3.1 Viabilité des cellules ostéoblastiques	137
III.2.3.1.1. Principe de l'expérience du marquage à la calcéine	137
III.2.3.2 Viabilité des cellules ostéoclastiques	138
III.2.3.2.1. Test WST-8.....	138
III.2.4. Etude de la mort des cellules MC3T3-E1	138
III.2.5. Test d'activité métabolique des RAW 264.7	139
III.2.6. Tests fonctionnels	140
III.2.6.1 Prolifération des cellules MC3T3-E1	140
III.2.6.2 Prolifération des cellules RAW 264.7	140
III.2.6.3 Différenciation des cellules ostéoblastiques.....	140
III.2.6.3.1. Etude de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique par qRT-PCR	141
III.2.6.3.1.1. <i>Méthode de quantification de l'expression génique</i>	142
III.2.6.3.2. Etude de l'expression des protéines impliquées dans la différenciation ostéoblastique par western blot	143
III.2.6.4 Différenciation des cellules ostéoclastiques.....	146
III.2.7. Dissolution et précipitation	147
III.2.7.1 Mesure de la quantité en calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoblastique.....	147
III.2.7.2 Mesure de la quantité en calcium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoclastique et mesure du pH.....	147
III.2.8. Test ELISA en vue de la détection de la protéine VEGF-A sécrétée par les cellules RAW 264.7	148
III.3. Analyses statistiques	148
III.3.1. Anova	148
III.3.2. Analyses en composantes principales (ACP)	149
Chapitre IV. Résultats et discussions	152

IV.1. Etude de l'influence de la composition chimique et de la microstructure de céramiques de phosphate de calcium sur la réponse cellulaire ostéoblastique et ostéoclastique : approche statistique par analyse en composantes principales	152
IV.1.1. Contexte et objectif de l'étude	152
IV.1.1.1 Approche expérimentale	152
IV.1.2. Réponse cellulaire ostéoblastique	154
IV.1.3. Réponse cellulaire ostéoclastique	156
IV.1.4. Corrélation des concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques	158
IV.1.5. Conclusion de l'étude	160
IV.2. Influence de la substitution en ions silicates et de la microstructure des céramiques d'hydroxyapatite sur l'activité ostéoblastique	161
IV.2.1. Contexte et objectif de l'étude	161
IV.2.2. Résultats	162
IV.2.2.1 Examen morphologique et adhésion cellulaire	162
IV.2.2.1.1. Images en MEB	162
IV.2.2.1.2. Images d'immunofluorescences	165
IV.2.2.2 Apoptose et viabilité cellulaire	171
IV.2.2.2.1. Mesure de l'apoptose cellulaire	171
IV.2.2.2.2. Test de la calcéine	171
IV.2.2.2.3. Densité cellulaire	172
IV.2.2.2.4. Tests fonctionnels	173
IV.2.2.2.5. Etude de l'expression de protéines ostéogéniques	174
IV.2.2.2.5.1. Analyse de l'expression de protéines ostéogéniques selon la nature du biomatériau	174
IV.2.2.2.5.1.1. RUNX2	174
IV.2.2.2.5.1.2. Ostéopontine	176
IV.2.2.3 Mesure des éléments silicium et calcium dans le milieu de culture	178
IV.2.3. Discussions	180
IV.2.3.1 Adhésion et comportement des ostéoblastes au contact des biomatériaux	180
IV.2.3.2 Biocompatibilité	182
IV.2.3.2.1. Fonctionnalité des cellules au contact des biomatériaux	184
IV.2.3.2.1.1. Prolifération et différenciation cellulaire	184
IV.2.4. Conclusion de l'étude	188
IV.3. Réponse ostéoblastique et ostéoclastique au biomatériau d'hydroxyapatite carbonatée de type A/B	191
IV.3.1. Contexte et objectif de l'étude	191

IV.3.2. Résultats	192
IV.3.2.1 Comportement des MC3T3-E1 au contact des différents biomatériaux.....	192
IV.3.2.2 Mesure en calcium du milieu de culture.....	197
IV.3.2.3 Comportement cellulaire des RAW 264.7 au contact des différents biomatériaux	198
IV.3.2.3.1. Adhésion et différenciation cellulaire.....	198
IV.3.2.3.1.1. Immunofluorescence	198
IV.3.2.3.1.2. MEB	200
IV.3.2.3.1.3. Estimation quantitative de l'adhésion et de la différenciation.....	201
IV.3.2.3.2. Viabilité cellulaire.....	202
IV.3.2.3.5.1. Mesure du calcium	206
IV.3.2.3.5.2. Mesure du pH.....	207
IV.3.3. Discussions	208
IV.3.3.1 Réponse cellulaire ostéoblastique au contact des biomatériaux	208
IV.3.3.2 Influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux sur la dissolution des biomatériaux .	209
IV.3.3.3 Réponses cellulaires ostéoclastiques au contact des biomatériaux	209
IV.3.3.3.1. Adhésion et différenciation des précurseurs ostéoclastiques	209
IV.3.3.3.2. Viabilité cellulaire et tests fonctionnels (Figure 66, Figure 67)	210
IV.3.3.3.3. Dissolution physico-chimique, biorésorption et mesure du calcium et du pH du milieu de culture (Figure 68, 69 et 70).....	213
IV.3.4. Conclusions de l'étude	214
IV.4. Influence des propriétés physico-chimiques des biocéramiques de phosphate de calcium sur l'activité de biorésorption des cellules RAW 264.7 : corrélation avec l'expression du VEGF-A	216
IV.4.1. Contexte de l'étude	216
IV.4.2. Contexte bibliographique	216
IV.4.2.1 Le VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	216
IV.4.2.2 TRAP 5b.....	218
IV.4.3. Objectif de l'étude	219
IV.4.4. Résultats	220
IV.4.4.1 Culture cellulaire dans le milieu différenciant : contrôle interne de la lame de verre	220
IV.4.4.2 Marquage de TRAP	221
IV.4.4.3 MEB.....	222
IV.4.4.4 Immunofluorescence	224
IV.4.4.5 Mesure du calcium et du pH du milieu de culture	225
IV.4.4.6 viabilité des cellules RAW 264.7	227

IV.4.4.7 Etude de la prolifération et de la différenciation des cellules RAW 264.7, en fonction de la nature des biomatériaux	228
IV.4.4.8 Lacunes de résorption	229
IV.4.4.9 Etude de la variation de la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes en fonction de la nature du biomatériau	234
IV.4.5. Discussions	235
IV.4.5.1 La différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclaste pourrait dépendre de la nature dense du biomatériau	235
IV.4.5.2 Dissolution physico-chimique et biorésorption par les ostéoclastes	236
IV.4.5.3 Viabilité cellulaire.....	238
IV.4.5.4 L'activité enzymatique de TRAP 5b et VEGF-A confirme le processus de résorption osseuse.....	239
IV.4.5.4.1. L'activité enzymatique de TRAP 5b	239
IV.4.5.4.2. Sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes	241
IV.4.1. Conclusion de l'étude.....	242
Conclusions générales	245
Références bibliographiques	251
Annexes.....	264

Table des illustrations

Figure 1 : image d'une coupe d'os (modifiée selon la banque d'image <i>Medical Art Servier</i>)	33
Figure 2 : différenciation des cellules mésenchymateuses multipotentes.	35
Figure 3 : les phases du développement de la cellule souche mésenchymateuse à l'ostéoblaste mature, selon Barré, 2012	36
Figure 4 : expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique selon Barré, 2012.....	37
Figure 5 : schéma représentant les voies de signalisation des BMPs et leur régulation d'après (Rahman et al., 2015).....	40
Figure 6 : les 3 phases du remodelage osseux : résorption, transition et terminaison selon (Matsuo and Irie, 2008).....	41
Figure 7 : les 4 étapes de la réparation osseuse: processus de réparation osseuse : conséquences sur le délai de mise en contrainte.....	43
Figure 8 : les différentes étapes du remodelage osseux selon (Matsuo and Irie, 2008).....	44
Figure 9 : les cycles du remodelage osseux (banque d'images servier medical art).....	45
Figure 10 : morphologie d'un ostéoclaste. Image modifiée selon Cappariello <i>et al</i> , 2014.	46
Figure 11 : mécanisme d'acidification intervenant dans les lacunes de résorption selon Rouselle et Heymann, 2002, (Rousselle and Heymann, 2002)	48
Figure 12 : voie de différenciation des cellules hématopoïétiques en ostéoclastes multinucléés,	49
Figure 13 : contrôle hormonal du calcium et implication sur l'activité ostéoclastique	52
Figure 14 : lien entre ostéoclaste et système immunitaire. Image modifiée selon (Cappariello et al., 2014).....	55
Figure 15 : représentation de protéines cellulaires ostéoblastiques impliquées dans l'adhésion cellulaire au biomatériau selon Anselme, 2000.	59
Figure 16 : voie de signalisation cellulaire médiée par l'interaction avec les intégrines selon.....	62
Figure 17 : photographie du réacteur utilisé pour les synthèses au laboratoire SPCTS.	96
Figure 18 : diffractogramme des poudres calcinées	99
Figure 19 : spectres IRTF des poudres calcinées	102
Figure 20 : courbes de dilatométrie des pastilles CHA et HA	105
Figure 21 : ensemble des caractérisations physico-chimiques réalisées sur les 6 variantes de biomatériaux frittés	107
Figure 22 : diffractogrammes des pastilles frittées	108
Figure 23 : spectre IRTF des pastilles frittées	109
Figure 24 : images en microscopie électronique à balayage des pastilles frittées	111
Figure 25 : distribution des pores	114
Figure 26 : schéma représentant les grandeurs RA : rugosité moyenne, RZ : moyenne des bosses, RV : moyenne des creux	116
Figure 27 : exemples de profils obtenus au profilomètre pour chaque composition et microstructure de biomatériau	116
Figure 28 : schéma représentant le paramètre θ mesuré.	119
Figure 29 : analyse ACP des caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux.	124
Figure 30 : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée pré-ostéoblastique MC3T3-E1	131

Figure 31 : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée de monocytes/macrophages RAW 264.7	132
Figure 32 : principe de la réaction enzymatique de la lactate déshydrogénase.	139
Figure 33 : plan de recherche pour étudier la différenciation cellulaire ostéoblastique	141
Figure 34 : plan expérimental des évaluations biologiques pour étudier la réponse cellulaire ostéoblastique et ostéoclastique aux 6 biocéramiques	153
Figure 35 : réponse biologique des ostéoblastes aux 6 biocéramiques	154
Figure 36 : réponse biologique des ostéoclastes aux 6 biocéramiques	156
Figure 37 : analyses ACP englobant les valeurs des mesures de la concentration calcique du milieu de culture contenant les 6 biomatériaux cultivés (+) ou non (-) avec les cellules ostéoblastiques.....	158
Figure 38 : analyses ACP englobant les valeurs des mesures de la concentration calcique du milieu de culture contenant les 6 biomatériaux cultivés (+) ou non (-) avec les cellules ostéoclastiques.....	159
Figure 39 : images en microscopie électronique à balayage (MEB) des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture	163
Figure 40 : images en MEB des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après	164
Figure 41 : images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture.	165
Figure 42 : images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 24 h de culture.	166
Figure 43 : images des immunofluorescences des cellules MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture.	167
Figure 44 : (a) images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux après 24 h de culture : en bleu les noyaux, en vert l'actine et en rouge la vinculine. (b) grossissement (X40) de la zone entourée en gris	169
Figure 45 : analyse quantitative de l'adhésion des cellules aux biomatériaux.	170
Figure 46 : viabilité des cellules cultivées à la surface des biomatériaux.	172
Figure 47 : densité cellulaire en surface des biomatériaux sur la cinétique d'1 h, 24 h et 48 h.	172
Figure 48 : analyse fonctionnelle des cellules.	173
Figure 49 : expression protéique de RUNX 2 par les cellules cultivées sur les pastilles, pendant 7 jours (+) et celles cultivées sur le plastique, autour des pastilles, pendant 7 jours (-). La quantification a été normalisée par la protéine β actine.	174
Figure 50 : membrane marquée au rouge ponceau	175
Figure 51 : expression protéique d'ostéopontine par les cellules cultivées 24 h, sur les pastilles.....	176
Figure 52 : expression protéique d'ostéopontine, par les cellules cultivées sur les pastilles, pendant 7 jours (+) et celles cultivées sur le plastique, autour des pastilles, pendant 7 jours (-).La quantification a été normalisée par la protéine β actine.	176
Figure 53 : expression génique de RUNX2, COLLI et ALP, à 7 jours de culture, par les cellules cultivées directement sur les pastilles.	177
Figure 54 : cinétique de relargage de l'élément silicium dans le milieu de culture complet par les pastilles SiHA denses et poreuses cultivées (+) ou non (-) avec des MC3T3-E1	178
Figure 55 : concentration en élément calcium dans le milieu de culture complet, en présence des pastilles HA et SiHA, denses et poreuses, cultivées (+) ou non (-) avec des MC3T3-E1	179
Figure 56 : schéma récapitulatif de l'influence de la microstructure et des ions silicates sur l'activité ostéoblastique.	190
Figure 57 : images en MEB des cellules MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux a) après 1 h de culture et b) après 48 h de culture.....	193

Figure 58 : images en microscopie à épifluorescence des cellules MC3T3-E1	194
Figure 59 : densité et viabilité des cellules MC3T3-E1 au contact des différents biomatériaux après	195
Figure 60 : analyses fonctionnelles (prolifération et différenciation) des MC3T3-E1, cultivées 24 h sur les biomatériaux.	196
Figure 61 : concentration en calcium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec les cellules (+) ou sans cellule (-), après 1 h et 24 h.....	197
Figure 62 : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7 cultivées sur les biomatériaux dans le milieu différenciant (M-CSF et RANK-L) après 14 jours de culture. a) faible grossissement (X10) et b) zoom sur une cellule multinucléée	199
Figure 63 : expression de TRAP dans les cellules RAW 264.7 cultivées sur différents biomatériaux, dans un milieu de culture différenciant.....	200
Figure 64 : images en MEB des cellules RAW 264.7 cultivées dans le milieu différenciant sur les biomatériaux pendant 14 jours	201
Figure 65 : analyse de la densité cellulaire et de la différenciation des cellules RAW 264.7. a) densité cellulaire et b), c), d), nombre de cellules multinucléées.	202
Figure 66 : tests de viabilité des RAW 264.7.....	203
Figure 67 : étude de la prolifération et de l'activité enzymatique de TRAP, (marqueur de différenciation ostéoclastique), dans les cellules RAW 264.7, cultivées sur différents matériaux.	204
Figure 68 : images en MEB des lacunes de résorption sur la surface des pastilles après 14 jours de culture	206
Figure 69 : variation de la concentration en calcium du milieu sur les biomatériaux, cultivés avec les cellules RAW 264.7, pendant 7 jours (7 jours +) et 14 jours (14 jours +), ou sur les biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours (7 jours -) et 14 jours (14 jours -).....	206
Figure 70 : mesure du pH du milieu de culture des biomatériaux cultivés avec les cellules, pendant 7 jours (7 jours +), ou pendant 14 jours, (14 jours +), ou bien du milieu de culture des biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours, (7 jours -), ou pendant 14 jours, (14 jours -).....	207
Figure 71 : schéma récapitulatif de la réponse ostéoblastique et ostéoclastique aux biomatériaux.	215
Figure 72 : images en contraste de phase des cellules RAW 264.7 cultivées sur lame de verre dans le milieu différenciant après 7 jours et 14 jours de culture	220
Figure 73 : images en microscopie optique des cellules RAW 264.7, cultivées sur les biomatériaux et préalablement marquées pour TRAP.....	221
Figure 74 : images MEB des cellules RAW 264.7, cultivées sur les six biomatériaux, en présence milieu différenciant, (RANK-L et M-CSF).....	223
Figure 75 : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7, cultivées sur les pastilles, après 14 jours de culture, dans le milieu de culture différenciant, (RANK-L et M-CSF).....	225
Figure 76 : mesure des concentrations en calcium dans le milieu de culture après 7 jours et 14 jours, avec les pastilles uniquement (7 jours -) et (14 jours -), ou avec les cellules cultivées sur les pastilles (7 jours +) et (14 jours +).	226
Figure 77 : mesure du pH de ces milieux de culture. Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD.	226
Figure 78 : viabilité cellulaire	227
Figure 79 : activité proliférative et différenciation des cellules RAW 264.7, après 14 jours de culture.	228
Figure 80 : images MEB des lacunes de résorption des six différents biomatériaux, après 14 jours de culture	233
Figure 81 : concentration en VEGF-A, libéré dans le milieu de culture, par les cellules ostéoclastiques cultivées sur les six différents biomatériaux et la lame de verre, utilisée comme contrôle interne.	234

Figure 82 : schéma récapitulatif de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des céramiques de phosphate de calcium, sur l'activité de résorption des ostéoclastes. VEGF-A et TRAP 5b : marqueur du taux de résorption. 244

Liste des tableaux

Tableau 1 : liste des protéines osseuses morphogéniques (BMP) découvertes chez l'humain selon Kang et al 2004.	38
Tableau 2 : relation entre le type d'os et les propriétés mécaniques selon (Barrère et al., 2006)	57
Tableau 3 : études bibliographiques de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur l'adhésion des cellules ostéoblastiques	65
Tableau 4 : études bibliographiques de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur l'adhésion des cellules ostéoclastiques	69
Tableau 5 : d'après Dorozhkin, 2010b, les différents composés de céramique d' (ortho) phosphate de calcium.....	73
Tableau 6 : d'après LeGeros, 2008, les différents phosphates de calcium retrouvés dans les environnements biologiques.....	74
Tableau 7 : résultats des évaluations biologiques réalisées sur des biomatériaux contenant des ions silicates.....	86
Tableau 8 : résultats des évaluations biologiques réalisées sur des biomatériaux contenant des ions carbonates.....	90
Tableau 9 : références des fiches PDF ICDD-PDF (<i>International Centre for diffraction Data-Powder Diffraction Files</i>).....	99
Tableau 10 : bandes d'absorbances communes aux biomatériaux HA, SiHA et CHA selon.....	100
Tableau 11 : bandes d'absorbances spécifiques des biomatériaux SiHA selon (Marchat et al., 2013)	101
Tableau 12 : bandes vibrationnelles des groupements carbonates dans l'HA selon (Rey et al., 2011)	101
Tableau 13 : résultats de l'analyse carbone réalisée sur les poudres CHA calcinées	104
Tableau 14 : surface spécifique des poudres calcinées	105
Tableau 15 : paramètre de frittage des 6 variantes de biomatériaux.	106
Tableau 16 : pourcentage en carbone (%C), en pourcentage massique d'ions carbonates (Wt.%CO ₃), et la valeur du x+y pour chaque microstructure de biomatériaux carbonatés (dense et poreuse).	110
Tableau 17 : taille des grains des pastilles frittées.	112
Tableau 18 : porosité des pastilles frittées.	113
Tableau 19 : taille médiane des pores pour chaque composition chimique	114
Tableau 20 : surface spécifique des pastilles frittées.	115
Tableau 21 : analyse de la topographie de surface des pastilles frittées.	117
Tableau 22 : potentiel zêta des pastilles frittées.....	118
Tableau 23 : valeur de l'angle de contact des pastilles frittées.	118
Tableau 24 : caractérisations physico-chimiques des 6 variantes de céramiques phosphocalciques synthétisées.....	120
Tableau 25 : liste des gènes utilisés pour la qPCR (TaqMan Applied Biosystem).....	142
Tableau 26 : liste des anticorps primaires utilisés	144
Tableau 27 : liste des anticorps secondaires utilisés	145

Liste des abréviations

Les abréviations sont des abréviations anglaises mais dans la liste des abréviations, la définition de l'abréviation anglaise est donnée en anglais et en français. Dans le manuscrit de thèse, la définition de l'abréviation n'est donnée qu'en français.

A

ACP: analyses en composantes principales
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
ALP: *alkaline phosphatase*/phosphatase alcaline
ALS: *amyotrophic lateral sclerosis*/sclérose latérale amyotrophique
ARNm: acide ribonucléique messenger
ARN antisens: acide ribonucléique antisens

B

BCP: biphasic calcium phosphate/phosphate de calcium biphasique
BMP: *bone morphogenetic protein*/protéine morphogénétique osseuse
BMU: *basic multicellular unit*/unité basique multicellulaire
BSP: *bone sialoprotein*/sialoprotéine osseuse
CaSR: *Calcium-sensing receptor*/récepteur membranaire sensible au calcium

C

CDHA: calcium deficient hydroxyapatite/hydroxyapatite déficiente en calcium
CDMP: *cartilage-derived morphogenic protein*/protéine morphogénique dérivée du cartilage
CFA: *carbonated fluoroapatite*/fluoroapatite carbonatée
CHA: *carbonated hydroxyapatite*/hydroxyapatite carbonatée
CHU: Centre Hospitalier et Universitaire
COLLI: collagène de type I
COPD: *chronic obstructive pulmonary disease*/bronchopneumopathie chronique obstructive (**BPCO**)

CPPD: *calcium pyrophosphate dihydrate*/pyrophosphate de calcium dihydraté
CSM: cellules souches mésenchymateuses

D

DCPA: *dicalcium phosphate anhydrous*/phosphate dicalcique anhydre
DCPD: *dicalcium phosphate dihydrate*/phosphate dicalcique dihydraté

F

FA: fluoroapatite
FCFC: *fibroblast colony-forming cells*/cellules fibroblastiques formant des colonies
FDA: food and drug administration/administration des aliments et des médicaments
FGF: *fibroblast growth factor*/facteur de croissance des fibroblastes
FN: fibronectine

G

GDF: *growth differentiation factor*/facteur de croissance de différenciation

H

HA: hydroxyapatite
HAS: haute autorité de santé
hESC: *human embryonic stem cell*/cellule souche humaine embryonnaire

I

IGF: *insulin like growth factor*/facteur de croissance qui ressemble à l'insuline
IL: interleukine

M

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*/protéines kinases activées par les mitogènes

MCPA: *monocalcium phosphate anhydre*/phosphate monocalcique anhydre

MCPM: *monocalcium phosphate monohydrate*/phosphate de calcium monohydraté

M-CSF: *macrophage colony stimulating factor*/facteur de croissance stimulant les macrophages

MEC: matrice extracellulaire

MGP: *Matrix Gla Protein*/protéine Gla de la matrice

MMP: métalloprotéase

O

OA: oxyapatite

OCP: *octacalcium phosphate*/phosphate octocalcique

OSC: ostéocalcine

OSP: ostéopontine

ONN: ostéonectine

OP-1: *osteogenic-protein 1*/protéine ostéogénique (autre nom de **BMP7**)

OPG: *osteoprotegerin*/ostéoprotégérine

P

PCA: phosphate de calcium amorphe/*amorphous calcium phosphate*

PDGF: *platelet derived growth factor*/facteur de croissance dérivé des plaquettes

PLGF: *placental growth factor* /facteur de croissance placentaire.

PEEK: polyétheréthercétone

PFA: paraformaldéhyde

PK: protéine kinase

PTH: *parathyroid hormone*/hormone parathyroïdienne

Q

qsp: quantité suffisante pour

R

RANK-L: *receptor activator of nuclear factor kappa b ligand* / ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa b

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2* également appelé (**Osf2**): *osteoblast specific factor 2* ou encore *core binding factor a1* (**Cbfa1**)

S

SBF: *simulated body fluid* (solution de composition similaire au sérum physiologique)

SiHA: hydroxyapatite silicatée

T

α TCP: *tricalcium phosphate alpha*/phosphate tricalcique alpha

β TCP: *tricalcium phosphate beta*/phosphate tricalcique bêta

TGFβ: *transforming growth factor bêta* /facteur de croissance transformant bêta

TRAP: *tartrate resistant acidic phosphatase*/phosphatase acide résistante à l'acide tartrique

TSP: thrombospondine

TTCP: *tetracalcium phosphate*/phosphate tricalcique

V

VEGF: *vascular endothelial growth factor*/facteur de croissance (des cellules) endothélial vasculaire

VFP: *vascular permeability factor*/facteur vasculaire de perméabilité

VN: vitronectine

Glossaire

Les mots indexés avec une étoile (*) dans le manuscrit de thèse sont expliqués dans le glossaire ci-dessous

ACP : analyses en composantes principales. Méthode de traitement de données par analyse statistique multivariée, qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites "corrélées" en statistique) en nouvelles variables décorréliées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées "composantes principales", ou axes principaux.

Anticorps : un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : les plasmocytes. En biologie moléculaire les anticorps recombinants sont en général couplés à des molécules fluorescentes, ou chemoluminescente pour détecter un site antigénique d'une protéine d'intérêt.

Dibotermine alpha : forme recombinante de la protéine BMP-2

Dilatométrie : la dilatométrie est la méthode à choisir pour la mesure très précise des variations dimensionnelles de solides, matériaux fondus, poudres et pâtes sous un programme de température et sous contraintes négligeables

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Technique biochimique utilisant des anticorps. Méthode de dosage immuno-enzymatique dans laquelle le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui a libéré un composé coloré détectable par spectroscopie.

Eptodermine alpha : forme recombinante de la protéine BMP-7/OP-1

Frittage : traitement thermique des matériaux qui permet de les consolider en soudant les grains entre eux. En modulant le temps et les températures du frittage il est possible d'obtenir des microstructures plus ou moins denses ou poreuses.

Immunocytochimie : l'immunocytochimie est une méthode d'analyse des cellules *in situ* par une technique d'immunofluorescence. L'immunocytochimie permet de révéler et cibler une molécule biologique à l'échelle cellulaire

depuis des anticorps spécifiques couplés à des fluorophores.

Lignée cellulaire : population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, ayant une capacité illimitée de division. Il s'agit en général de cellules cancéreuses transformées artificiellement par un oncogène (un gène immortalisant) ou encore dont les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont mutés.

MC3T3-E1: MC3T3-E1 est une lignée de cellules précurseur des ostéoblastes provenant de la calotte crânienne de souris. Un certain nombre de dérivés de cette souche ont été isolés pour sélectionner des niveaux de potentiel ostéogène variables et ont été largement utilisés comme modèles cellulaires en biologie osseuse. Il est admis que le sous-clone « MC3T3-E1 » est la lignée la plus avantageuse et physiologiquement pertinente pour l'étude du contrôle de la transcription dans les ostéoblastes de la calotte crânienne.

Méthode de Bradford : la méthode est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison aux acides aminés basiques présents dans la protéine. Le passage de la couleur rouge/marron du colorant non lié aux protéines à la couleur bleue du colorant lié à la protéine va se manifester par un changement d'absorbance de la molécule. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié aux protéines, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Méthode de Lowry : la méthode de Lowry est une autre méthode de dosage colorimétrique des protéines. Un réactif cuivrique alcalin (réactif de Gornall) est mis à réagir avec les protéines. Un second réactif, dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) est rajouté. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesure l'absorbance entre 650 et 750 nm. Cette technique bénéficie d'une forte sensibilité. Il est ainsi possible de réaliser des mesures dans des mélanges pauvres en protéines ou dans des solutions relativement diluées. Les

interférences dues aux détergents et aux lipides sont également supprimées.

Monocyte/macrophage RAW 246.7 : les cellules RAW 264.7 sont une lignée cellulaire de monocytes/macrophages de souris leucémique établie à partir de l'ascite d'une tumeur induite chez une souris mâle par injection intrapéritonéale du virus de la leucémie Abselon, AMuLV)

Multipotente : terme désignant une cellule capable de se différencier en plusieurs types de cellule appartenant à la même famille. Présentes dans l'embryon ou dans l'organisme adulte, elles sont à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées mais conservent leur capacité à s'autorenouveler. Les cellules souches multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules, mais elles sont déjà engagées dans une certaine direction. On dit que ce sont des cellules déterminées. Ce sont par exemple les cellules hématopoïétiques qui donnent les différents types cellulaires du sang : globule blanc, globule rouge, plaquette ou encore des cellules de la crête neurale qui donnent naissance aux neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique.

Iodure de propidium : molécule fluorescente lipophile qui s'intercalent dans les acides nucléiques (l'ADN ou l'ARN). L'iodure de propidium est couramment utilisé comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la nécrose). Cette molécule est donc utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire.

Non-union / pseudarthrose : terme médical qui définit l'incapacité de guérison d'une fracture osseuse. Une pseudarthrose est une « fausse » articulation d'un os à l'endroit d'une fracture résultant de la cicatrisation indépendante des pièces de la fracture. Une pseudarthrose peut également résulter d'un échec de développement.

Northern Blot : méthode d'analyse moléculaire permettant d'étudier les ARN. Par électrophorèse, les ARNs vont être séparés en fonction de leur taille et peuvent être identifiés par une sonde.

Phénotype : en génétique, le phénotype est l'ensemble des caractères observables d'un individu. On parle du phénotype cellulaire pour définir l'expression de protéines spécifiques à un type cellulaire.

Pluripotente : la pluripotence est la faculté de certaines cellules à se différencier en : cellules d'un des trois feuillet embryonnaires (le feuillet

externe : ectoderme, le feuillet intermédiaire : mésoderme et le feuillet interne : endoderme). Ce sont les cellules souches embryonnaires. Elles sont néanmoins incapables de produire un organisme entier à l'inverse des cellules totipotentes qui sont les ovules fécondés et les cellules issues des premières divisions de cet œuf.

Protéine recombinante : protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. Un gène codant une protéine d'intérêt est introduit dans le génome de l'espèce productrice (bactéries, cellules mammifères en culture, animaux transgéniques, etc.). Les protéines recombinantes peuvent être purifiées et utilisées à des fins thérapeutiques, industrielles ou encore dans les activités de recherche.

qRT-PCR : *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique. La première étape consiste à transformer des ARNm en ADNc par l'enzyme reverse transcriptase. L'étape suivante consiste en l'amplification exponentielle de l'ADNc par l'enzyme polymérase. La réaction se fait dans un thermocycler avec l'enzyme, le catalyseur de l'enzyme, des amorces et des nucléotides dans le cas de la méthode SyBerGren® ou avec une sonde dans le cas de la méthode TaqMan®. La réaction commence par la séparation du double brin d'ADNc, puis l'hybridation des amorces spécifiques et l'élongation. Chaque étape se fait à des températures adaptées. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

Rouge Ponceau : 0,1% de rouge ponceau (m/v), 5% acide acétique, qsp H₂O distillée

Tampon de dénaturation :

β-mercaptoéthanol (20 µL pour 1 mL). (La dénaturation peut aussi se faire avec du DTT 10 mM)

Bleu de bromophénol : 0.02% (soit 10 µL d'une solution à 10% pour 1 mL)

Tampon de déshybridation :

15 g Glycine, 1 g SDS 0.1% m/v, 10 mL Tween 20% v/v, qsp 1L H₂O, PH=2.2

Tampon Laemmli (2X) :

4 mL SDS 10% ([SDS] = 2% m/v)

2 mL de glycérol ([glycérol] = 10% v/v)

1.2 mL de Tris 1M (pH 6.8) ([Tris] = 60 mM)

2.8 mL d'eau distillée

⇒ pour le tampon 1X, diluer au 1/2 dans de l'eau distillée

Profilomètre : un profilomètre est un instrument utilisé pour mesurer le relief d'une surface, notamment dans le but d'en évaluer la rugosité ou la micro-géométrie.

Les profilomètres sont à leur origine dotés d'une pointe très fine en diamant qui lit l'altitude lorsqu'on la déplace le long de la surface. Les petits profilomètres dont la fonction est la mesure de l'état de surface en atelier sont en général désignés par le terme de rugosimètres. Il existe des profilomètres à contact ou des profilomètres optiques.

Surface spécifique : la surface spécifique désigne le rapport de la superficie de la surface réelle d'un objet (par opposition à sa surface apparente) et de la quantité de matière de l'objet (en général sa masse, parfois son volume apparent). On l'exprime donc généralement comme une aire massique, en unités de surface par unité de masse (mètres carrés par kilogramme (m^2/kg) ou un multiple comme le mètre carré par gramme $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1} = 1\,000 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$). Quand la surface spécifique est rapportée au volume (aire volumique) elle s'exprime en unités de surface par unité de volume, par exemple en mètres carrés par mètre cube, c'est-à-dire en m^{-1} ($= \text{m}^2/\text{m}^3$). La surface spécifique a une grande importance pour les phénomènes faisant intervenir les surfaces (adsorption, absorption, catalyse, échanges de chaleur). Elle est surtout intéressante pour les matériaux divisés (poudres, mousses, pailles métalliques), car c'est seulement pour ce type de matériaux qu'elle ne dépend pas de la masse de l'objet considéré, à l'instar des autres grandeurs spécifiques. Elle se mesure par la **Méthode BET** : Méthode Brunauer, Emmett et Teller, une méthode de mesure de la surface spécifique par adsorption d'un gaz.

Tampon de migration (1X) (Biorad) : 25mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % (w/V) SDS, pH=8.3

Tampon de Transfert pour 1 mL : 200 mL tampon de transfert 5X (Biorad), 600 mL eau ultrapure, 200 mL éthanol

Taqman : La sonde TaqMan consiste en un fluorophore attaché de manière covalente à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et en un désactivateur (*quencher*) à l'extrémité 3'. Ainsi, tant que le fluorophore et le désactivateur sont à proximité l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le désactivateur. Chaque sonde TaqMan est conçue de sorte à s'hybrider avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une

paire d'amorces spécifiques. Alors que la *Taq* polymérase élonge l'amorce et synthétise le brin néoformé de l'extrémité 3' vers 5' du brin complémentaire, l'activité exonucléase 5'-3' de cette même *Taq* polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice. La dégradation de la sonde relargue le fluorophore cassant ainsi la proximité existant avec le *quencher* et permettant l'expression de la fluorescence. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt présent dans le produit de PCR.

TBS 10X : 24.2G Tris base (200 mM), 80g NaCl, 38 mL HCl (1M) pH = 7.6, qsp 1L H₂O distillée

Western blot : méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques. Basé sur l'électrophorèse sur gel de polyacrilamide, les protéines préalablement dénaturées vont migrer en fonction de leur taille. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane puis détectées par un anticorps primaire. Un anticorps secondaire couplé à une enzyme émettant un signal photométrique, colorimétrique ou des photons servent à visualiser l'expression.

Avant-propos

Il est vrai que ce n'est pas le cœur, le siège des émotions, des sentiments, de la passion, l'organe moteur qui nous maintient en vie. Ce n'est pas non plus le cerveau, le centre intellectuel, l'organe qui nous permet de profiter pleinement de la vie. D'ailleurs, il n'est peut-être pas apprécié à sa juste valeur et est bien souvent subordonné à d'autres constituants du corps humain. Cependant, le tissu osseux assure de façon isolée ou associée, des fonctions qui participent indéniablement à une bonne qualité de vie et à l'autonomie d'un individu.

Il est composé du tissu compact ou cortical et du tissu trabéculaire ou spongieux (Barrère et al., 2006), (Stevens, 2008). Ces différences structurales sont étroitement associées à leur fonction. Alors que l'os compact/cortical possède par sa rigidité, une plus importante résistance mécanique, l'os spongieux/trabéculaire est plus particulièrement impliqué dans les échanges métaboliques.

Pour souligner l'importance de ce tissu, voici, quelques exemples de différents symptômes et pathologies graves, conséquences du dysfonctionnement du tissu osseux et de pathologies du squelette.

- l'ostéoporose, actuellement reconnue comme un problème de santé publique et responsable de nombreuses dépenses en santé. C'est une maladie fragilisant le tissu osseux consécutif à une perte osseuse exposant les personnes touchées à des risques de fractures, (Tarride et al., 2012), (Kanis et al., 2013).

- Le pectus excavatum (ou thorax en entonnoir) est la déformation la plus fréquente du thorax. Il est à l'origine d'impacts physiques (compression cardiaque et difficulté respiratoire) sans parler des défauts esthétiques qui peuvent provoquer des impacts psychologiques.

- Plus rarement répandu, la maladie osseuse de Paget est une ostéodystrophie et se traduit par un renouvellement anarchique du tissu osseux et une myélofibrose – un durcissement de la moelle osseuse –. Les symptômes prennent plusieurs formes : douleurs lombaires, boiterie, déformation osseuse, élargissement crânien, fissuration ou fracture d'un os et perte progressive de l'audition.

- Le rachitisme chez le nourrisson et le jeune enfant ou bien l'ostéomalacie chez l'adulte est une décalcification de l'os due à un défaut de minéralisation qui provoque douleurs musculaires et osseuses, hypotonie musculaire, fractures osseuses, fatigabilité rapide, os mous et déformations osseuses, altération du développement et de la minéralisation des dents chez le nourrisson...

- De façon plus indirecte, il est aussi connu que les maladies du sang (hémopathies) causées par un dysfonctionnement de la moelle osseuse engendrent la déminéralisation et la lyse osseuse.

- Toujours de façon indirecte, les ostéomes et les ostéoblastomes (également appelés les ostéosarcomes), tumeurs primitives respectivement bénignes et malignes ou encore les métastases osseuses qui sont les tumeurs secondaires les plus fréquentes, déclenchent : douleurs osseuses, perte de l'os et remplacement par un tissu tumoral mou, fractures, perte de la force musculaire et de la sensibilité pouvant entraîner une paralysie définitive.

Chez des individus jeunes et en bonne santé, l'intégrité du squelette, le comblement des fissures et l'homéostasie phosphocalcique qui permettent d'assurer toutes les fonctions métaboliques, mécaniques et de protection des organes vitaux sont permis par la capacité d'auto-régénération ou de renouvellement du tissu osseux. C'est en effet l'un des rares tissus du corps humain à posséder ces qualités. Dans de nombreuses pathologies à l'origine de perte osseuse de taille critique, (ablation osseuse à la suite d'un cancer, maladies dégénératives, traumatismes, accidents...), la seule autorégénération du tissu osseux n'est plus suffisante. Le tissu osseux altéré doit être substitué, (Baino and Vitale-Brovarone, 2011).

A ce jour, deux méthodes existent : l'utilisation de greffes osseuses ou d'implants synthétiques, (Baino and Vitale-Brovarone, 2011).

Les greffes osseuses peuvent provenir du patient (autologue), d'un donneur X vivant ou décédé (allogénique) ou d'espèce animale (xénogreffe).

L'usage des greffes allogéniques et des xénogreffes est limité, voir interdit dans certains cas, en raison des risques de réactions inflammatoires et de transmissions de maladies virales, (Lemée et al., 2013).

Les autogreffes, se sont présentées comme la solution à tous ces problèmes puisqu'elles sont parfaitement tolérées par le système immunitaire du receveur et s'intègrent parfaitement dans le tissu hôte environnant. Elles possèdent trois attributs: elles sont ostéogéniques (elles contiennent déjà des cellules vivantes osseuses), ostéoinductives (ses cellules sont capables de se différencier en ostéoblastes) et ostéoconductives (elles servent d'échafaudage, de support et de matrice 3D pour accueillir le tissu osseux nouvellement formé), (Lichte et al., 2011).

Les implants, quant à eux, sont des biomatériaux synthétiques entièrement réalisés par l'homme dans un but de substitution (remplacement) lorsqu'il s'agit en particulier de prothèse ou bien pour la régénération osseuse lorsque ces implants présentent des propriétés de résorption. L'expression « biomatériaux » (ou matériaux médicaux) est utilisée lorsqu'il s'agit de matériaux synthétiques ou naturels utilisés pour le remplacement d'une partie du système vivant ou qui fonctionne en contact intime avec les tissus vivants, (Dorozhkin, 2010a).

En fonction de l'objectif thérapeutique souhaité, les implants doivent répondre à différents critères ayant fait l'objet de nombreuses études dans la littérature scientifique (Annexe 1 page 266). Ces propriétés incluent également leur capacité à répondre aux normes internationales de stérilisation et de fabrication pour une commercialisation et une utilisation clinique, (Hench and Polak, 2002), (Cheung et al., 2007), (LeGeros, 2008), (Porter et al., 2009), (Baino and Vitale-Brovarone, 2011), (Lichte et al., 2011), (Bose et al., 2012).

La greffe d'os, présente des avantages et des inconvénients. Elle nécessite plusieurs opérations augmentant les risques de complications post opératoires chez les patients et l'altération du tissu sain environnant le site donneur est constatée dans certains cas. L'analyse du rapport bénéfice risque dissuade donc de plus en plus les chirurgiens, du bien-fondé de l'utilisation de greffes autologues, (Ozdemir et al., 2013), (Annexe 2 page 267). Et, force est de constater que l'utilisation de biomatériaux a pris de l'ampleur, (Lichte et al., 2011).

En 2013, les implants synthétiques représentaient 10% du marché de la greffe osseuse, (Ozdemir et al., 2013). Différentes classes de biomatériaux sont utilisées en ingénierie tissulaire : les biocéramiques, les métaux, les polymères et les matériaux

composites, (Annexe 5 page 270). Dans le cadre de cette thèse, l'attention sera particulièrement portée sur les biomatériaux céramiques de phosphate de calcium.

En effet, dans l'optique de réparer le tissu osseux, c'est une céramique de phosphate de calcium appelée l'hydroxyapatite qui est la plus utilisée en clinique, en raison de sa formule chimique : $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, proche de la phase minérale osseuse qui la rend biocompatible et ostéoconductrice, (LeGeros, 2002), (Dorozhkin, 2010a).

Quelques exemples de biomatériaux phosphocalciques actuellement commercialisés sont présentés dans le tableau 3, (Annexe 3 page 268).

La stratégie de réparation osseuse (remplacement ou régénération) doit prendre en compte un ensemble de facteurs (sociaux, économiques, mécaniques, esthétiques, médicaux, biologiques...), (Moreira-Gonzalez et al., 2003). Toujours est-il que, la stratégie qui prime est de synthétiser un substitut osseux qui se comporte le plus possible comme l'os naturel. Cela n'est pas toujours envisageable, mais le grand challenge pour un ensemble d'acteurs de la communauté scientifique est au delà de la réparation du site osseux altéré par le **remplacement** de ce dernier par des prothèses. L'objectif ultime est de stimuler la capacité propre du tissu osseux à s'auto-réparer : il s'agit alors de **régénération osseuse** ou de renouvellement osseux.

Dans ce contexte, ma thèse a consisté à étudier l'influence des propriétés physico-chimiques de biocéramiques de phosphate de calcium dans le processus de régénération osseuse.

En effet, en analysant certains travaux de recherche, on peut observer que de nombreuses conclusions sont émises concernant le rôle des propriétés physico-chimiques des céramiques phospho-calciques sur les réponses des cellules osseuses. Les résultats obtenus n'étant pas toujours reproductibles et parfois même contradictoires car complètement opposés d'une étude à une autre....il a donc été déduit que les matériaux utilisés ne sont tout simplement pas comparables. Un manque d'information ou bien même des caractéristiques erronées, (Pellenc et al., 2006), nuisent à la bonne compréhension du rôle de la composition chimique ou de la microstructure des biomatériaux sur la réponse cellulaire osseuse.

- La première étape de cette thèse a donc consisté à synthétiser des biomatériaux de phosphate de calcium caractérisés et exempts de phase secondaire.

- La deuxième étape a consisté à cultiver, séparément, directement sur ces biomatériaux, les deux types de cellules qui interviennent dans le mécanisme de régénération osseuse : ostéoblastes et ostéoclastes.

Cela, afin de répondre à la problématique posée : corréler les propriétés physico-chimiques des biomatériaux avec un comportement cellulaire spécifique. Ainsi, en ne faisant varier qu'une seule variable (le taux de porosité ouverte pour une même composition chimique) et en identifiant les propriétés de surface, nous avons voulu corréler l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux au comportement cellulaire observé.

Mais avant toutes choses, l'étape incontournable mais néanmoins motivante car primordiale : la synthèse des biomatériaux, a été réalisée sur la base de travaux de recherches menés au laboratoire, par un procédé de précipitation aqueuse.

Le choix s'est porté sur trois compositions chimiques de céramiques phosphocalciques :

- l'Hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique qui a servi de matériau de référence car déjà couramment utilisée en clinique.

- l'Hydroxyapatite silicatée, car bien que controversé, le rôle du silicium a été identifié dans la littérature pour favoriser la minéralisation osseuse, (Carlisle, 1970), (Carlisle, 1972), (Carlisle, 1980), (Bohner, 2009).

- l'Hydroxyapatite carbonatée, car les ions carbonates sont les principaux ions substituant l'apatite osseuse naturelle et favoriseraient la résorption de l'implant, (Doi et al., 1998), (LeGeros, 2008).

Ces biomatériaux ont été frittés pour obtenir des céramiques possédant une microstructure dense ou poreuse pour chacune des compositions chimiques. Au total, 6 variantes de biomatériaux de phosphate de calcium ont été étudiées.

Elles ont été caractérisées pour vérifier la pureté et l'absence de phase secondaire supplémentaire. Une caractérisation physique et chimique de leur surface a ensuite été réalisée : topographie, taille des grains, mouillabilité, potentiel zêta, porosité, distribution et taille des pores.

Chacune des six variantes de biomatériaux a été mise en culture *in vitro* avec une lignée cellulaire murine de pre-ostéoblaste MC3T3-E1 et une lignée cellulaire murine de monocyte/macrophage RAW 264.7 pour évaluer les mécanismes globaux de régénération osseuse qui englobent la synthèse osseuse. La résorption du biomatériau a également été analysée dans cette thèse.

En effet, le processus physiologique de régénération osseuse n'est pas assuré par le seul mécanisme de synthèse osseuse *de novo*. Il s'agit d'un équilibre continu cyclique entre synthèse et résorption du tissu osseux. Différents critères et tests fonctionnels ont donc été réalisés : adhésion, viabilité, prolifération et différenciation cellulaire.

Des analyses statistiques multivariées, en composante principale (ACP) ont été utilisées pour corrélérer les caractéristiques du biomatériau avec l'activité biologique observée.

Les travaux de cette thèse ont donc pour objectif d'apporter une contribution à la compréhension de l'influence de la composition et de la microstructure de céramiques de phosphate de calcium dans le processus de régénération osseuse.

Les problématiques posées étaient les suivantes :

- Sachant que la régénération osseuse est un mécanisme finement contrôlé par deux types de cellules osseuses, les ostéoblastes et les ostéoclastes qui régulent respectivement la synthèse osseuse et le taux de résorption osseuse; y aurait-il une substitution ionique plus adaptée pour favoriser la régénération osseuse et l'orienter de préférence vers une synthèse, une résorption ou bien un équilibre ?
- Quel est le rôle respectif des ions silicates et des ions carbonates dans l'attachement, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la viabilité des ostéoblastes et des ostéoclastes ? Le silicium ou les ions carbonates

favoriseraient-ils l'activité d'un type cellulaire ou de l'autre ? Ces ions exercent-ils le même effet sur les deux types de cellules ? Sachant que la microstructure et plus particulièrement la porosité influencent les propriétés des biomatériaux. Quelle est l'influence de la microstructure sur les caractéristiques des matériaux et comment module t-elle la réponse des ostéoblastes et des ostéoclastes ?

- Quelle est l'importance jouée par la microstructure dans la biodégradation des matériaux et dans quelle mesure le calcium, le silicium et les ions carbonates libérés par ce processus influencent-ils l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes ?

Chapitre I

étude bibliographique

Chapitre I. Etude bibliographique

Les connaissances sur le développement osseux sont permises grâce à l'expérimentation sur des modèles animaux. L'utilisation de souris *Knockout* génétiquement modifiées pour inactiver un ou plusieurs gènes, permet d'identifier et d'étudier le rôle de gènes d'intérêt dans le développement osseux. Ainsi, l'étude et la compréhension de pathologies touchant le squelette telles que la dysostose (malformation congénitale grave et très rare d'un ou de plusieurs os, responsables d'une anomalie du développement de l'os (Olszta et al., 2007), (Olsen et al., 2000)) ont pu être réalisées. C'est entre autre, grâce à cela, que la structure et les différents constituants du tissu osseux, tout comme leurs fonctions ont pu être identifiés et communément admis. Dans cette partie, après avoir succinctement rappelé la définition et les fonctions d'un tissu osseux sain, la description et les analyses de l'interaction cellules osseuses/biomatériaux seront présentées.

I.1. La biologie du tissu osseux sain : définition, composition, structure et fonctions

La connaissance du tissu osseux et de son mécanisme de régénération sont l'objet de beaucoup d'attention. En dehors des aspects pathologiques, la macro et microstructure ainsi que la composition chimique des os sont affectées par des contraintes mécaniques, la génétique, le métabolisme et le degré de calcification de l'os. Ceci est à l'origine d'une importante diversité entre différents individus (Bigi et al., 1997), (Barrère et al., 2006). Toujours est-il que des généralités sont communément admises sur le tissu osseux. La composition et la fonction du tissu osseux sont connues depuis de nombreuses décennies. Il s'agit d'un tissu vivant conjonctif en perpétuel renouvellement (Manolagas, 2000), (Couret, 2004).

I.1.1. Morphologie du tissu osseux

Tous les os sont constitués d'une double couche variant en épaisseur en fonction de leur rôle. Une couche externe lisse dense et continue recouvre l'os. C'est l'os cortical ou compact. A l'intérieur se trouve l'os spongieux ou trabéculaire renfermant de

nombreux espaces, les pores, qui renferment la moelle osseuse mais aussi des vaisseaux sanguins. L'os compact est formé de plusieurs sous-unités qui sont formées de lamelles osseuses concentriques appelées les ostéons. Au cœur de ces ostéons se trouvent des cavités, les canaux de Havers contenant des vaisseaux sanguins (Barrère et al., 2006), (Figure 1).

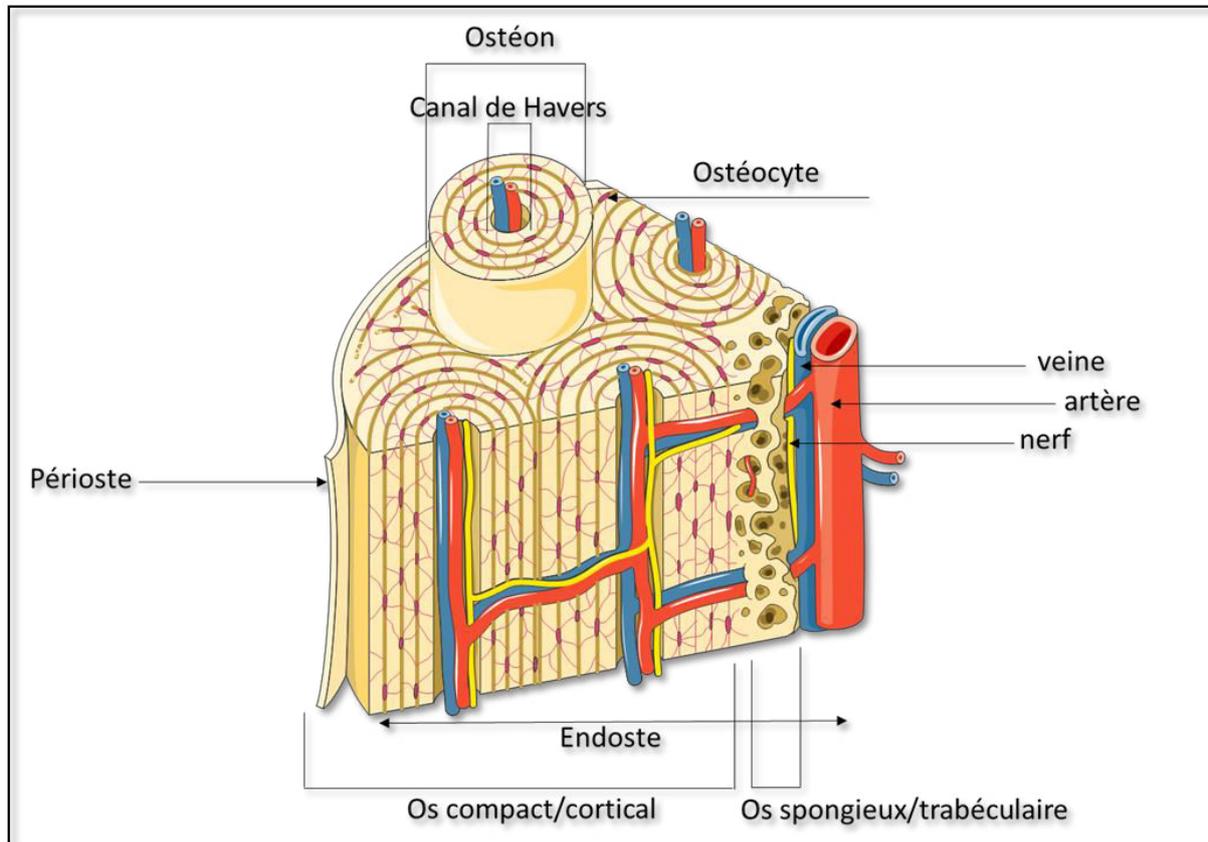


Figure 1 : image d'une coupe d'os (modifiée selon la banque d'image *Medical Art Servier*)

L'os cortical est constitué en sa périphérie d'une couche lisse et rigide, le périoste, qui recouvre l'endoste. L'endoste tapisse l'os compact (endoste cortical), les travées osseuses de l'os spongieux qui bordent la moelle osseuse (endoste trabéculaire) ainsi que les canaux de Havers. Le système de Havers correspond au canal nourricier de l'os; il comprend les vaisseaux nourriciers de l'os et les nerfs afférents. Ce système se trouve au milieu de l'ostéon, qui est une structure de l'os compact, formée d'une demi-douzaine de lamelles osseuses concentriques.

I.1.2. Composition de l'os

Constituant majeur du squelette avec le cartilage, le tissu osseux est un tissu conjonctif. C'est un tissu vascularisé, minéralisé et dynamique. Ce dernier est composé des cellules osseuses :

- ostéoblastes qui synthétisent le tissu,
- ostéoclastes qui le résorbent,
- ostéocytes logés dans les cavités osseuses (ostéoplaste),
- cellules bordantes en surface du tissu, moins actives que les ostéoblastes dont elles dérivent mais qui participent néanmoins au maintien du tissu avec également une fonction de senseur mécanique.

Ces cellules sont encastrées dans une substance fondamentale plus ou moins dense selon le fait qu'il s'agisse d'un os compact ou cortical. Cette substance fondamentale ou matrice extracellulaire (MEC) est composée d'une partie organique et minérale.

La partie organique est composée de 90% de protéines collagéniques principalement de type I et de 10% des protéines non collagéniques telles que la sialoprotéine osseuse/*bone sialoprotein* (BSP), l'ostéocalcine (OSC), l'ostéopontine (OSP), l'ostéonectine (ONN) et la fibronectine (FN). Une faible quantité de lipide compose également la MEC (Anselme, 2000), (Manolagas, 2000), (LeGeros, 2008), (Karageorgiou and Kaplan, 2005).

La phase non organique et minérale est constituée principalement de cristaux d'apatites dont la taille est de l'ordre de la centaine de nanomètres (Weiner and Price, 1986). Ces cristaux sont semblables aux cristaux d'hydroxyapatite de formule : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mais l'apatite naturelle osseuse n'est pas une hydroxyapatite stœchiométrique pure et contient des traces d'autres éléments tels que du carbonate (CO_3) en majorité, mais aussi du magnésium (Mg), du sodium (Na), du chlore (Cl)...(Bigi et al., 1997), (Anselme, 2000), (Olszta et al., 2007), (LeGeros, 2008). Le caractère non stœchiométrique de l'apatite affecte notamment ses propriétés thermodynamiques et donc sa solubilité en lien avec sa résorbabilité. Concernant les substitutions, Les ions silicates peuvent également être retrouvés en faible quantité dans les os matures en phase de calcification. Malgré son abondance en géologie, (huitième élément le plus abondant du système solaire et 27,7 % massique de la couche terrestre), le silicium est très peu retrouvé en biologie (<0.01% massique dans l'os humain, 5-20 μM dans le plasma). La quantité de silicium dans l'os varie avec l'âge et le genre d'un individu. Il varie également en fonction du type d'os (Henstock et al., 2015). Le silicium n'est pas distribué de façon homogène dans les sites d'ossification. A la limite de l'os trabéculaire le silicium atteint un taux de 0,08 à 1%, alors que son

niveau est faible dans le périoste mais élevé dans les ostéoïdes (tissu osseux non minéralisé). Dans les tissus où le niveau de calcium est inférieur à 0,1% le niveau de silicium est faible. Le niveau de silicium augmente lorsque la calcification commence. Dans la phase précoce de calcification quand le calcium augmente, le silicium augmente simultanément. A une phase plus tardive le silicium diminue (Carlisle, 1970). Le silicium peut être retrouvé dans les os matures en phase de calcification.

I.1.3. Principaux mécanismes de l'ostéogenèse

L'ostéogenèse est assurée par les ostéoblastes matures. Ces cellules proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses multipotentes (Figure 2, Figure 3).

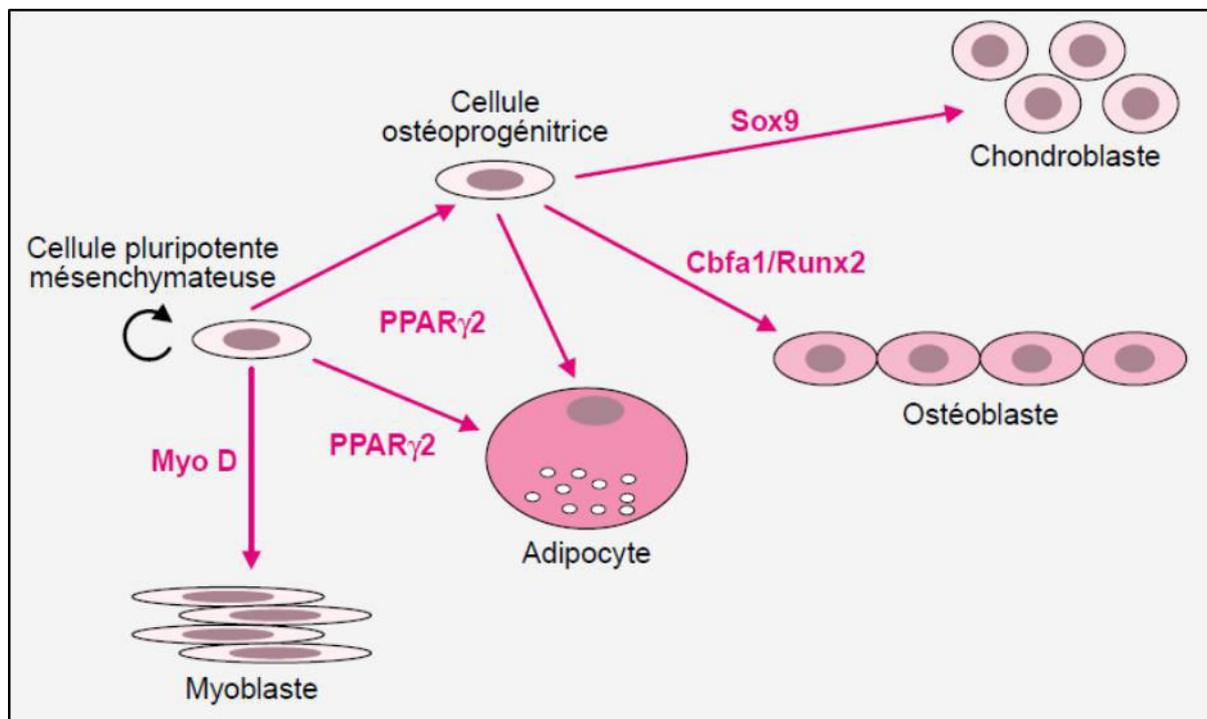


Figure 2 : différenciation des cellules mésenchymateuses multipotentes.

La différenciation vers un type de cellules donné nécessite l'expression de facteurs de transcription spécifiques. L'expression de MyoD induit la voie myoblastique. L'expression de Sox-9 induit la voie chondroblastique, celle de PPAR γ 2 induit la différenciation adipocytaire alors que l'expression de Cbfa/Runx2 est nécessaire pour la différenciation ostéoblastique. Selon Marie *et al* 2011.

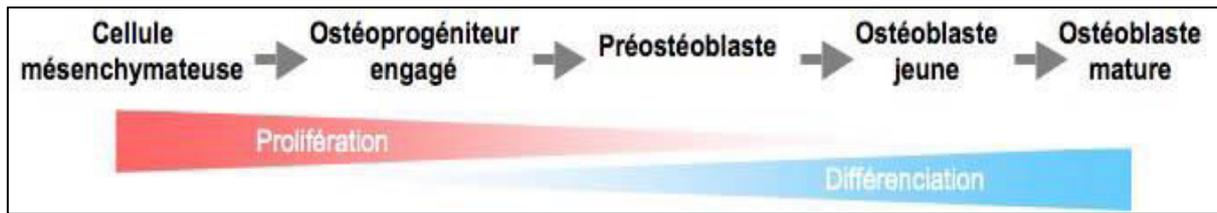


Figure 3 : les phases du développement de la cellule souche mésenchymateuse à l'ostéoblaste mature, selon Barré, 2012

La synthèse osseuse par les ostéoblastes s'effectue en trois étapes :

- la prolifération des cellules ostéoprogénitrices,
- la maturation de la MEC osseuse
- sa minéralisation.

Cette synthèse est régulée par deux points de restriction au niveau des deux étapes critiques : prolifération et minéralisation de la MEC.

La régulation de la prolifération des ostéoblastes est associée à la baisse d'expression des gènes impliqués dans le développement de la MEC osseuse alors que l'expression des gènes impliqués dans la prolifération diminue lors de la phase de la formation de la MEC et de sa minéralisation. Ainsi, les gènes ostéogéniques sont exprimés de façon séquentielle et temporelle en fonction d'une phase plus ou moins précoce ou tardive du développement ostéoblastique et de la synthèse osseuse. Les cellules en prolifération expriment la fibronectine. L'expression de la phosphatase alcaline (PAL/ALP) est augmentée immédiatement après la phase de prolifération, suivie de l'expression plus tardive de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse (BSP) avec l'apparition de la minéralisation ([Figure 4](#)), (Owen et al., 1990), (Marie, 2001), (Barré, 2012).

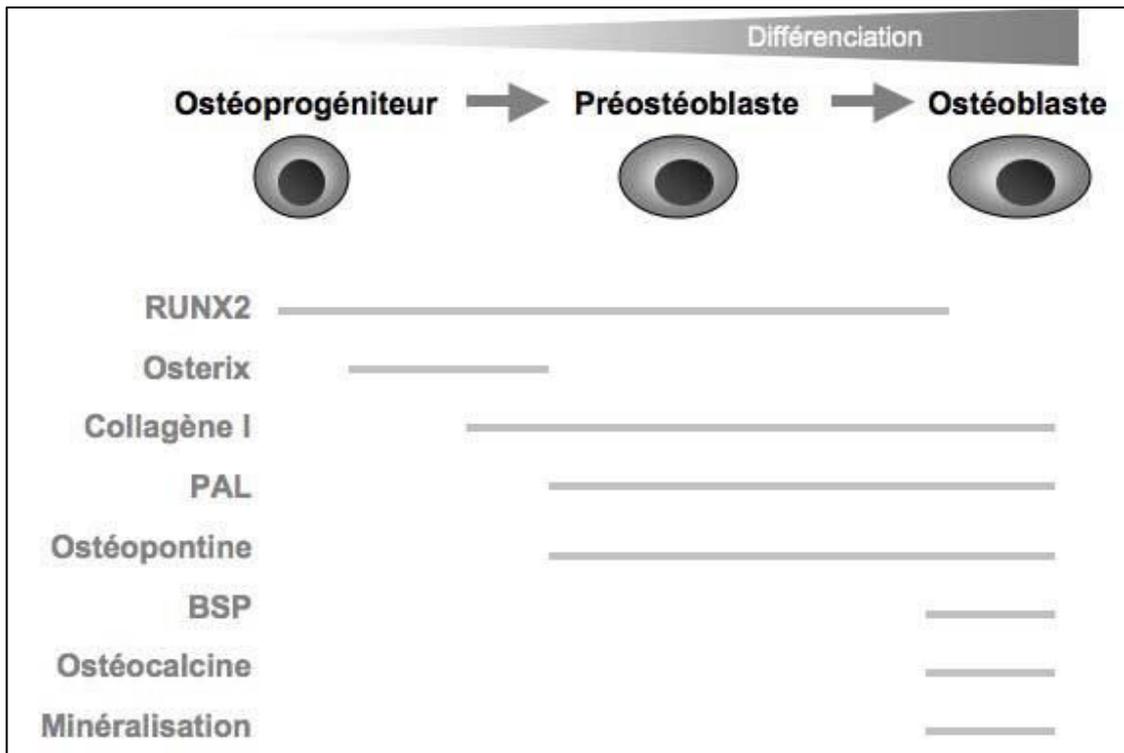


Figure 4 : expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique selon Barré, 2012

Parmi les protéines ostéogéniques (celles qui initient la formation osseuse), les BMP sont les mieux caractérisées (elles appartiennent à la famille des $TGF\beta$: *Transforming Growth Factor β*). Ce sont les seules (en particulier la BMP-7 (Osigraft[®], Stryker-Biotec, USA)* et la BMP-2 (InductOs[®], Wyeth, UK)*) à être autorisées par la Haute Autorité de Santé (HAS) en France et la *Food and Drug Administration* (FDA) en Amérique pour des utilisations en clinique et à être administrées à des patients en chirurgie orthopédique et traumatologique pour la régénération osseuse, (Kuboki and Takita, 2003), (Janicki and Schmidmaier, 2011).

Chez l'humain 14 BMP ont été identifiées (Kang et al., 2004), (Tableau 1). BMP2, BMP4 et BMP7 joueraient un rôle particulier dans le développement osseux embryonnaire cranio-facial et des membres, (Wan and Cao, 2005).

Types de BMP	Autres dénominations
BMP2	BMP-2A
BMP3	Ostéogénine
BMP4	BMP-2B
BMP5	ϕ
BMP6	Vgr-1
BMP7	OP-1
BMP8	OP-2
BMP9	GDF2
BMP10	GDF7 ou CDMP-3
BMP11	GDF11
BMP12	GDF7 ou CDMP-3
BMP13	GDF6 ou CDMP2
BMP14	GDF5 ou DCMP-1
BMP15	GDF9

Tableau 1 : liste des protéines osseuses morphogéniques (BMP) découvertes chez l'humain selon Kang et al 2004.

Vgr-1 a mammalian gene related to Xenopus Vg-1, CDMP: Cartilage-Derived Morphogenic Protein (protéine morphogéniques dérivée du cartilage), GDF: Growth Differentiation Factor (facteur de croissance de différenciation), OP 1-2: Osteogenic Protein 1-2 (protéine ostéogénique).

Des cascades de signalisation via la voie Smad dépendant et Smad indépendant (voie de signalisation des MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*, protéines kinases activées par les mitogènes) ont été identifiées dans le développement osseux suite à la liaison des BMP avec leurs ligands. Le facteur de croissance BMP et plus particulièrement BMP2 et BMP4 induisent l'ostéoblastogenèse (formation des ostéoblastes) en orientant la différenciation de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse non engagées vers une voie de différenciation ostéoblastique. Les BMPs activent le facteur de transcription ostéoblastique *Osf2* : *osteoblast specific factor 2* encore appelé *core binding factor a1 (Cbfa1)* ou *RUNX2* : *Run-related transcription factor 2*. Ce facteur de transcription va cibler un promoteur commun de plusieurs autres gènes codant des protéines ostéogéniques: l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, le collagène de type I, et l'ostéocalcine, (Olsen et al., 2000), (Manolagas, 2000). Le signal commence par l'interaction du ligand BMP avec le complexe récepteur sérine/thréonine BMPR de type I : BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), et ActR-IA (ALK-2) ou de type II : BMPR-II. Les récepteurs de type I reconnaissent des ligands de plusieurs types cellulaires alors que les récepteurs de

type II ne reconnaissent que les ligands de type BMP. Ce sont des complexes transmembranaires hétérodimériques. Une fois le récepteur activé, celui-ci phosphorylera et activera les voies de signalisation Smad ou MAPK.

- Les protéines Smad sont classées en trois groupes et peuvent activer la transcription de gènes cibles ostéogéniques grâce à l'action d'autres co-activateurs, (Kang et al., 2004), (Wan and Cao, 2005).
- L'activation de la voie de signalisation MAPK par les molécules BMP2 et BMP4 via les molécules ERK1/2, p38 et *stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase* provoque l'expression de l'alcaline phosphatase et de l'ostéocalcine par les cellules ostéoblastiques. BMP4 est aussi identifiée dans l'activation du gène codant le facteur de transcription *distal-less 5* (Dlx5) qui contient un motif à homéobox et qui en interagissant avec Msx2 va contrôler l'expression des gènes ostéogéniques (ostéocalcine et alcaline phosphatase), ainsi que la minéralisation, (Manolagas, 2000), (Figure 5).

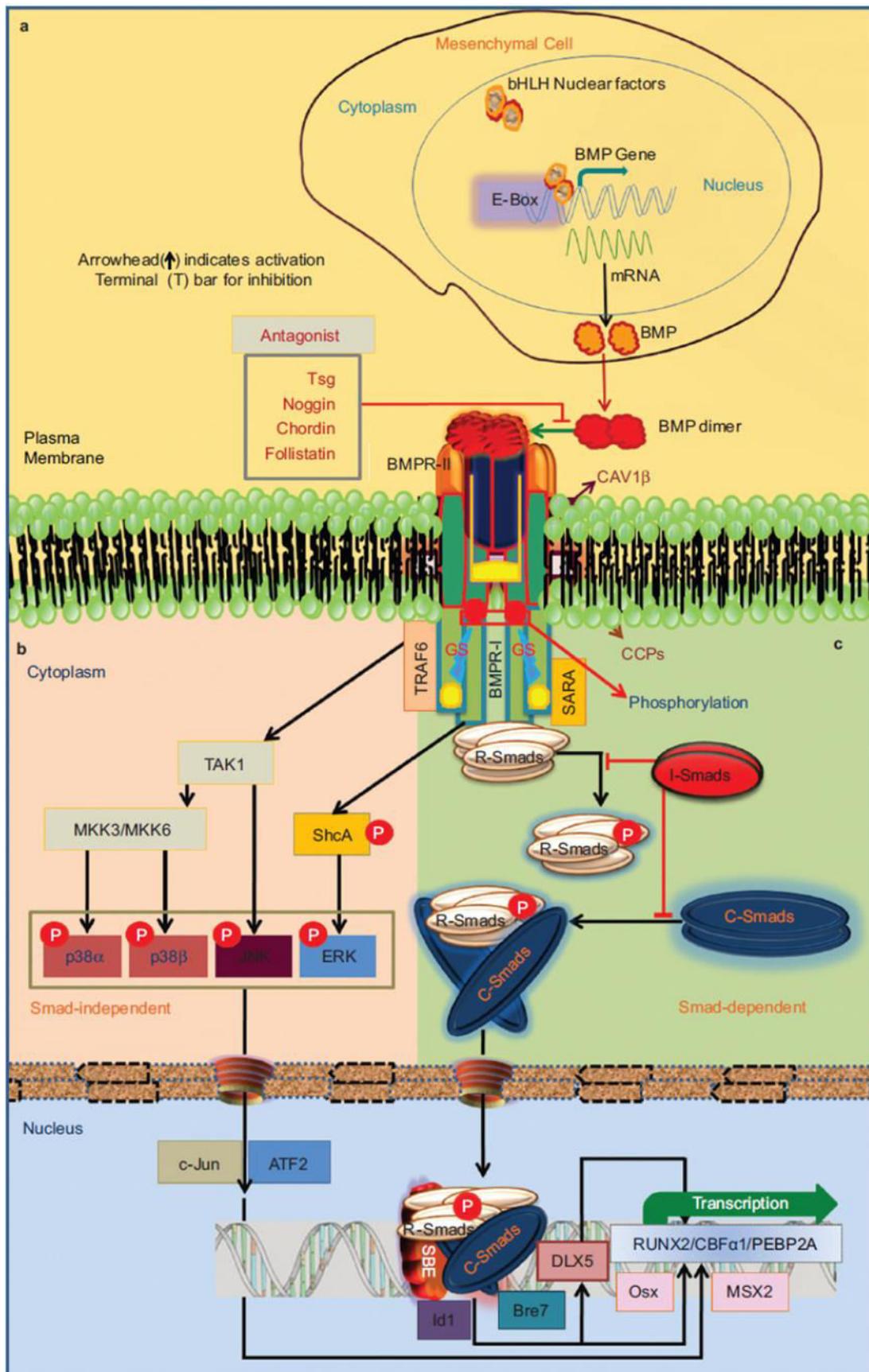


Figure 5 : schéma représentant les voies de signalisation des BMPs et leur régulation d'après (Rahman et al., 2015)

Par contre, à l'exception des BMPs, les autres facteurs de croissance tels que le facteur *insulin-like Growth Factor* (IGF-1), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et toutes les molécules membres de sa famille, facteur de croissance transformant β (TGF β) peuvent induire la différenciation de cellules progénitrices ostéoblastiques en ostéoblastes (Manolagas, 2000).

I.1.4. Remodelage osseux

L'os est un tissu vivant en perpétuel remaniement durant la vie d'un individu, (Manolagas, 2000), (Couret, 2004). Le remodelage osseux est assuré par l'action couplée de deux types de cellules distincts : ostéoblastes qui synthétisent le tissu osseux et ostéoclastes qui le résorbent. Cette action se réalise au sein d'un site appelé (BMU : unité multicellulaire basique). Il s'agit d'une entité spatiale de 1-2 mm de long et de 0,2 à 0,4 mm de large, comprenant une équipe d'ostéoclastes à l'avant, une équipe d'ostéoblastes à l'arrière, un capillaire central vasculaire et des nerfs associés à du tissu conjonctif. Chaque BMU est active en un lieu et une période particulière de temps, il s'agit de l'origine / l'initiation du remodelage osseux. Ce phénomène progresse vers une cible, qui est une région de l'os ayant besoin d'être remplacée, c'est la progression ou transition. Finalement, les cellules deviennent inactives, c'est la terminaison, (Figure 6).

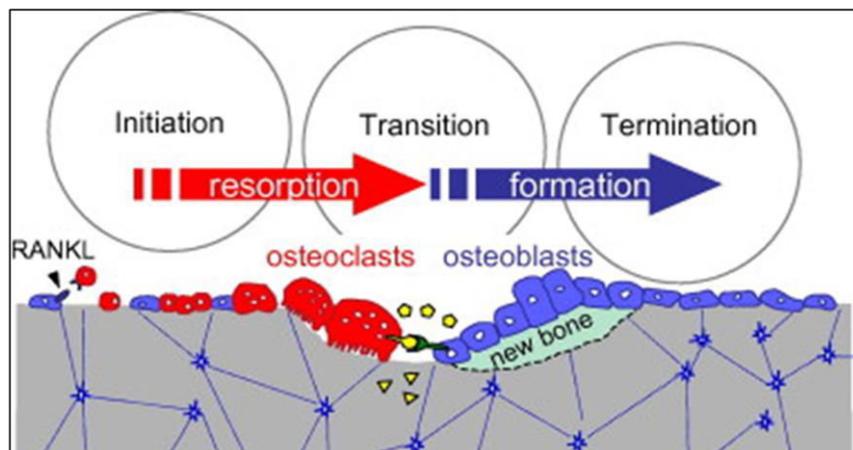


Figure 6 : les 3 phases du remodelage osseux : résorption, transition et terminaison selon (Matsuo and Irie, 2008).

Chez un adulte en bonne santé, 3-4 millions de BMU sont initiées par an et environ 1 million fonctionnent à n'importe quel moment. La durée de vie d'une BMU est de 6-9

mois et sa vitesse d'action de l'ordre de 25 μm par jour. La durée de vie des ostéoclastes est de 2 semaines alors que celle des ostéoblastes actives de 3 mois. L'intervalle entre les événements de remodelage successif au même emplacement est de 2-5 ans. Le volume osseux remplacé par une seule BMU est d'environ 0,025 mm^3 . Le taux de renouvellement du squelette est égal à 100% dans les premières années de vie puis il diminue pour être de l'ordre de 10% par an, (Raisz, 1999), (Courret, 2004), (Matsuo and Irie, 2008).

I.1.4.1 Mécanisme d'action du remodelage osseux

L'os est un tissu dont la réparation physiologique permet d'aboutir à un os normal. Ce processus peut être mis en défaut si les conditions locales (vascularisation, atteinte des parties molles, stabilité mécanique) et/ou le volume de la perte de substance osseuse font que ses capacités de réparation sont dépassées. Les mécanismes et les facteurs biologiques responsables de ce remodelage osseux sont à présent mieux connus. La régénération osseuse reste un processus complexe qui implique la coordination de différents événements en conditions normales ou pathologiques.

Remodelage osseux suite à une pathologie

Dans des situations pathologiques, suite à une fracture osseuse par exemple, on parlera davantage de réparation osseuse et de consolidation osseuse. Ce processus comprend quatre étapes qui se superposent en partie :

- 1- réponse inflammatoire initiale
- 2- formation osseuse
- 3- vascularisation
- 4- remodelage osseux

Pendant la réparation osseuse, les cellules de l'environnement (cellules inflammatoires, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules de la moelle osseuse, ostéoblastes), fournissent des facteurs de croissance qui vont activer le remodelage osseux, (Cappariello et al., 2014), (Detsch and Boccaccini, 2014).

En effet, la réparation osseuse mobilise de nombreux types cellulaires. Ceux impliqués dans la réponse inflammatoire ou dans l'angiogenèse ne sont pas impliqués directement dans la production de tissu osseux, mais sont indispensables à son déroulement. L'inflammation joue un rôle très important au début du processus par

l'intermédiaire des cytokines proinflammatoires (interleukines : IL-1 β et IL-6, TNF- α), libérées à la suite du traumatisme et qui, par leur effet chimiotactique, mobilisent les cellules de l'inflammation et stimulent l'angiogenèse au niveau du site fracturaire. Ensuite, les cellules plus spécifiques de la réparation osseuse interviennent. Ces cellules secrètent des cytokines et des facteurs de croissance (PDGF, BMPs, VEGF, interleukines) qui vont mobiliser et activer les cellules souches mésenchymateuses (CSM) responsables de la réparation osseuse (Rosset et al., 2014). Selon Schindeler, ce processus dynamique complexe nécessite la coordination d'événements différents au cours de quatre étapes se chevauchant et décrites à partir de l'histologie : réponse inflammatoire, formation d'un cal « mou » cartilagineux puis d'un cal « dur » osseux, consolidation et remodelage osseux (Schindeler et al., 2008).

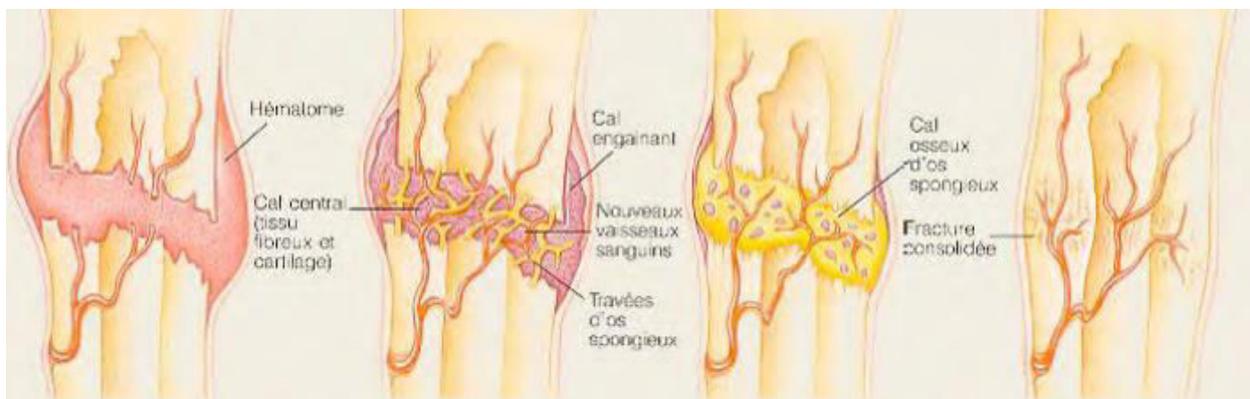


Figure 7 : les 4 étapes de la réparation osseuse: processus de réparation osseuse : conséquences sur le délai de mise en contrainte

Selon le cours de Yann Macé (Service de rééducation et de réadaptation de l'appareil locomoteur et des pathologies du rachis, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris : (Module Médecine Physique et de Réadaptation et pathologies médicales et chirurgicales de l'appareil locomoteur (www.cofemer.fr/UserFiles/File/Reparationosseuse.pdf))

Processus naturel du maintien de l'intégrité du tissu osseux

A la suite de l'ostéogenèse, le tissu osseux va subir un réarrangement permanent, induit notamment par la stimulation mécanique. Ce phénomène est un phénomène physiologique qui se produit chez l'adulte afin d'assurer l'intégrité du tissu osseux. Au cours du processus naturel de maintien de l'intégrité du tissu osseux, l'étape du remodelage osseux est le processus métabolique prédominant qui régule la structure et la fonction osseuse pendant la vie adulte. Le remodelage se produit en réponse à différents stimuli (fissure osseuse, perte des contraintes mécaniques, faible taux du calcium sanguin, altération du taux d'hormones et de cytokines dans les fluides). Sa durée est d'environ 4 mois et comprend une phase de résorption et de formation plus

longue. Ces 2 phases impliquent l'action orchestrée de deux types cellulaires. La phase initiale débute par l'activation des ostéoclastes dont le rôle principal est la dégradation de la partie organique par l'action d'enzymes telles que la cathepsine et les collagénases ainsi que la dissolution de la partie minérale par la formation d'un environnement acide par l'action de pompes à protons. Lorsque la lacune de résorption osseuse est creusée, l'action des ostéoclastes est terminée et ils meurent par apoptose puis sont remplacés par des macrophages qui sont chargés de nettoyer le fond de la lacune de résorption. Cette phase du remodelage s'appelle la phase d'inversion. Au cours de la seconde phase du remodelage osseux, les macrophages vont être remplacés par des cellules souches mésenchymateuses (CSM), résidant dans la moelle osseuse qui se différencient alors en ostéoblastes. Une fois les ostéoblastes formés, ces derniers synthétisent la matrice osseuse et la minéralisent. Après synthèse de la matrice organique par les ostéoblastes, celle-ci se minéralise progressivement par dépôt d'hydroxyapatite biologique entre les fibrilles de collagène, (Blair et al., 1986), (Rousselle and Heymann, 2002) (Figure 8, Figure 9).

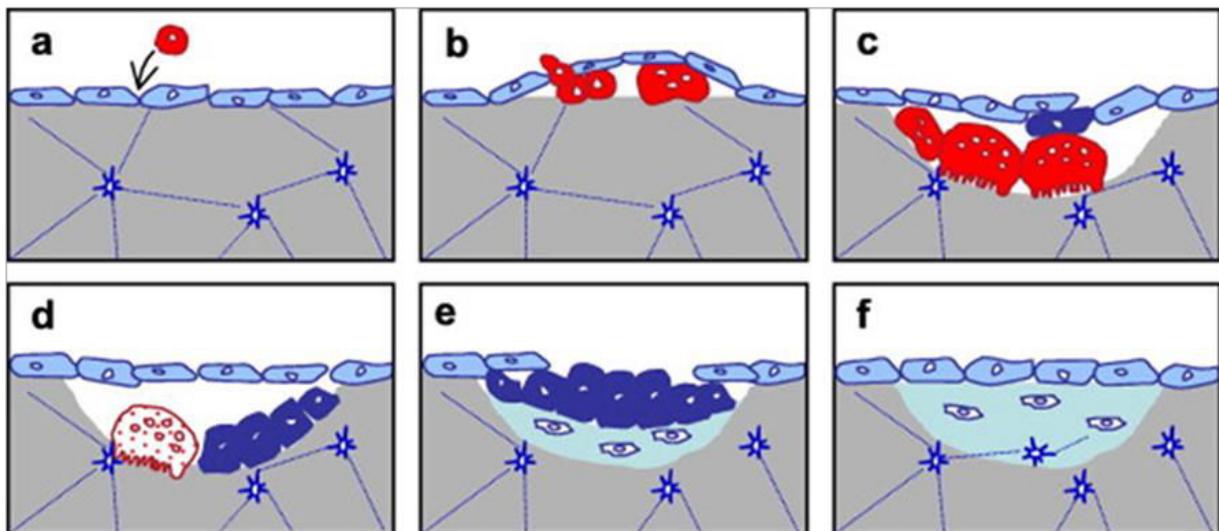


Figure 8 : les différentes étapes du remodelage osseux selon (Matsuo and Irie, 2008)

- a) recrutement des précurseurs des ostéoclastes dans la phase d'initiation précoce**
- b) différenciation des ostéoclastes sur la surface de l'os sous les cellules de revêtement (bleu clair) dans la phase d'initiation.**
- c) résorption osseuse par les ostéoclastes multinucléés qui induisent la différenciation des ostéoblastes (bleu foncé) dans la phase de transition.**
- d) apoptose des ostéoclastes dans la lacune de résorption durant la phase de transition**
- e) formation osseuse par les ostéoblastes et ostéocytes et la production d'ostéoïde (matrice osseuse non minéralisée) dans la phase de terminaison**

f) entrée en quiescence des ostéoblastes dans la phase de terminaison qui deviennent des cellules bordantes.

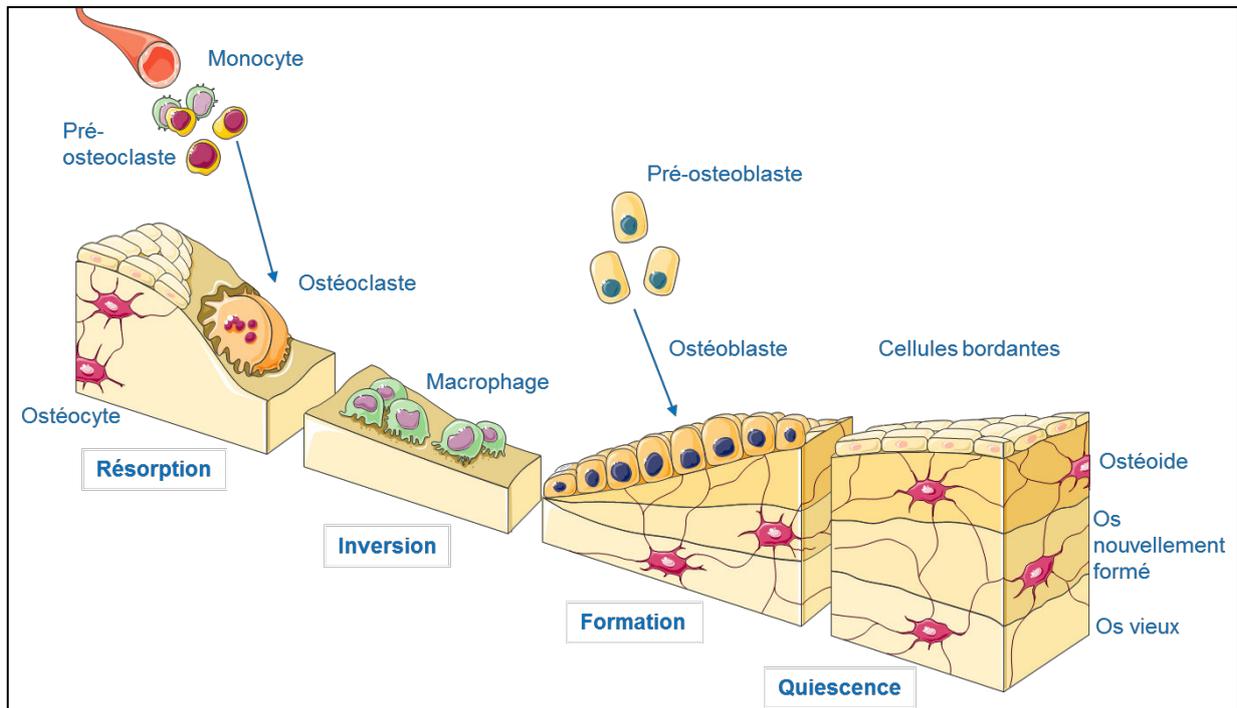


Figure 9 : les cycles du remodelage osseux (banque d'images servier medical art).

1) La phase d'initiation du remodelage osseux

Cette étape est activée par des signaux mécaniques. Les ostéocytes interconnectés dans la matrice extracellulaire osseuse sur un réseau s'étendant sur 130-390 nm de diamètre ressentent la perte de contraintes mécaniques dues aux fissures. Les fissures osseuses provoquent alors l'apoptose des ostéocytes, induisant la sécrétion de facteurs chemoattractants tels que M-CSF (*Macrophage-colony stimulating factor*), RANK-L par les ostéocytes et les ostéoblastes qui vont stimuler la différenciation des ostéoclastes en interagissant avec le récepteur RANK exprimé sur ces derniers puis vont les recruter.

En effet, les ostéoclastes sont des cellules multinucléées issues de la lignée hématopoïétique macrophages/monocytes. Ces cellules ont été décrites pour la première fois par Albert Kölliker en 1873 comme des cellules géantes multinucléées qui résorbent le tissu osseux, (Figure 10). Ces cellules multinucléées ont la capacité de dissoudre la phase minérale osseuse par l'action de l'anhydrase carbonique. Cet enzyme catalyse la conversion du dioxyde de carbone et de l'eau en acide carbonique : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$.

Une pompe à protons $H^+/ATPase$ (adénosine triphosphatase) va également créer un compartiment acide dans la zone d'intérêt à dissoudre, par la libération de proton H^+ dans le milieu.

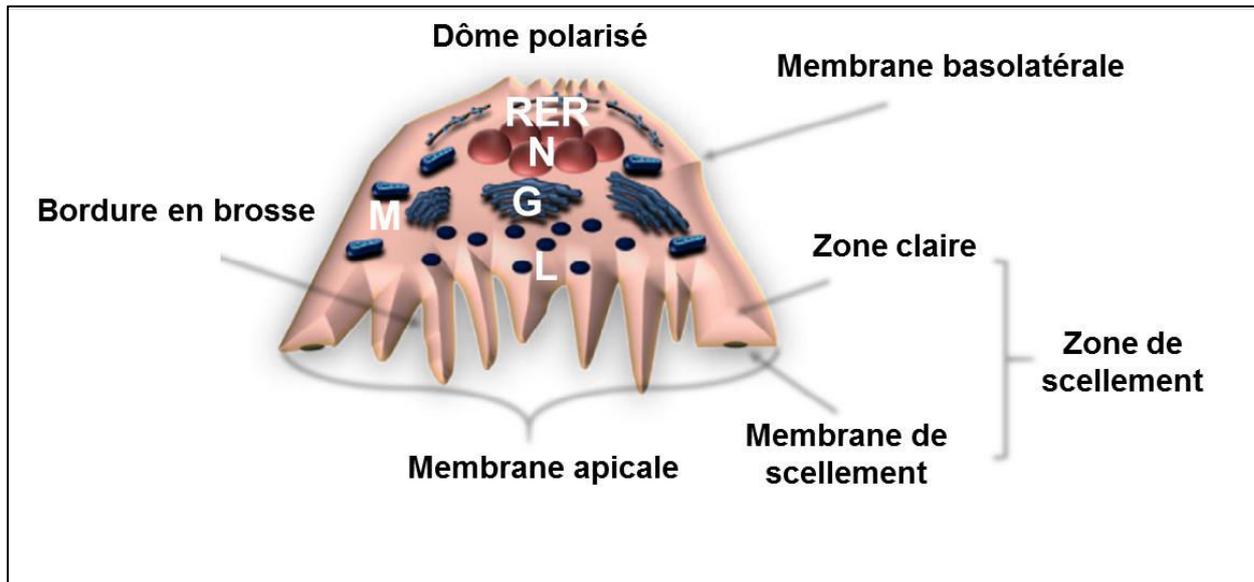


Figure 10 : morphologie d'un ostéoclaste. Image modifiée selon Cappariello *et al*, 2014.
(Cappariello *et al.*, 2014)

Les différents domaines de la membrane plasmique d'un ostéoclaste et la distribution des organites à l'intérieur de la cellule. N = noyaux, M = mitochondrie, G = appareil de Golgi, L = lysosome, RER = réticulum endoplasmique rugueux.

Homéostasie du pH durant la phase de résorption de la phase minérale

L'homéostasie du pH est très importante dans le mécanisme de résorption osseuse. La biorésorption de la phase inorganique se produit par la libération de protons et la formation d'un compartiment acide étanche délimité par la zone de scellement des ostéoclastes au contact du biomatériau. Le principal mécanisme responsable de l'acidification est l'action d'une pompe vacuolaire adénosine triphosphatase $V-ATPase$, couplée à des conductances passives de chlore Cl^- via le canal chlore $ClC-7$ localisé dans la bordure en brosse des ostéoclastes. La molécule d'anhydrase carbonique II (CA II) fournit la source de protons pour l'acidification extracellulaire par la pompe $H^+-ATPase$ et fournit aussi les ions HCO_3^- par l'échangeur HCO_3^- / Cl^- . Alors que certains transporteurs sont responsables du processus de résorption osseuse, d'autres sont essentiels pour le contrôle du pH. L'échangeur HCO_3^- / Cl^- associé à l'action de l'anhydrase carbonique II (CA II), est le principal transporteur responsable du maintien du pH intracellulaire. Un autre anti transporteur Na^+/H^+ , contribue

également à réguler le pH intracellulaire lors de l'activation des ostéoclastes. Des canaux potassiques K^+ sont également impliqués dans le maintien de l'acidification. Ces différents transporteurs qu'ils soient impliqués dans la résorption ou l'homéostasie du pH, augmentent le nombre de possible sites pour une intervention pharmacologique dans le traitement des maladies osseuses métaboliques, (Rousselle and Heymann, 2002), (Figure 11). En effet, La perte d'acidification conduit à l'ostéopétrose*, caractérisée par l'ablation de la résorption osseuse mais pourtant à l'augmentation du nombre d'ostéoclastes et à leur survie, (Nielsen et al., 2007).

Dégradation de la phase organique

Les ostéoclastes réalisent aussi la dégradation enzymatique de la matrice organique osseuse, grâce à l'action de collagénase et de cathepsine K, (Blair et al., 1986), (Boyle et al., 2003), (Väänänen and Laitala-Leinonen, 2008), (Detsch and Boccaccini, 2014). La durée de vie des ostéoclastes est de 15 jours en moyenne. Ils meurent ensuite par apoptose. Ce sont des cellules multinucléées de 50 à 100 μm de diamètre avec de nombreux lysosomes et qui contiennent de grande quantité de phosphatase acide résistante à l'acide tartrique (*tartrate resistant acidic phosphatase* : TRAP), (Couret, 2004). TRAP 5b est produite par les ostéoclastes qui endocytent les produits de dégradation de la matrice osseuse après la sécrétion d'acides et de protéases lysosomales dans l'intervalle entre la membrane cellulaire et la matrice osseuse. Dans la cellule, les vésicules transcytotiques contenant les produits de la matrice osseuse dégénérée vont fusionner avec des vésicules contenant TRAP. Les produits de dégradation sont ensuite détruits par les espèces réactives de l'oxygène produites par TRAP, (Halleen et al., 1996). Ensuite, les produits de dégradation et les molécules TRAP sont sécrétés à travers la membrane basolatérale. Ainsi, il existe une corrélation entre la quantité de TRAP en circulation et la quantité d'os résorbé, ce qui reflète le taux de résorption osseuse, (Halleen et al., 2000).

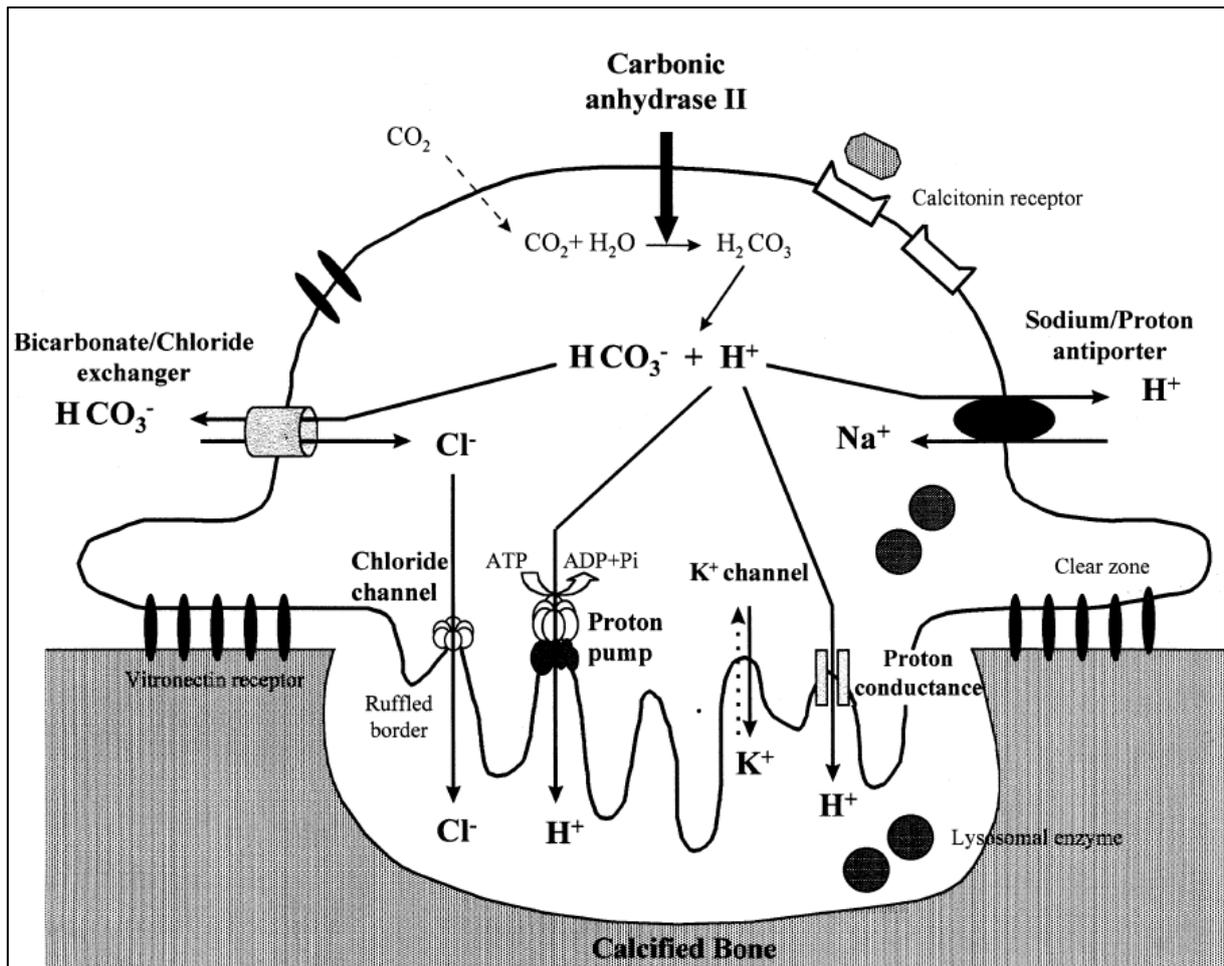


Figure 11 : mécanisme d'acidification intervenant dans les lacunes de résorption selon Rouselle et Heymann, 2002, (Rousselle and Heymann, 2002)

Différenciation ostéoclastique

La phase de différenciation ostéoclastique dépend de 3 facteurs : RANK, RANK-L et OPG (ostéoprotégérine), (Figure 12). La différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes est initiée puis reste sous le contrôle des cellules pré-ostéoblastiques du stroma médullaire. Les pré-ostéoblastes stimulent la différenciation et la prolifération des ostéoclastes par des contacts de cellules à cellules et en sécrétant du M-CSF et du RANK-L.

M-CSF va se lier à son récepteur membranaire c-fms exprimé à la surface des pré-ostéoclastes et RANK-L va se lier à son récepteur RANK également exprimé à la surface des pré-ostéoclastes.

Les ostéoblastes sécrètent aussi le facteur de différenciation des ostéoclastes (*osteoclast differentiation factor* : ODF) pour activer la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes.

Par contre, les ostéoblastes sécrètent l'ostéoprotégérine OPG qui va inhiber l'interaction RANK/RANK-L en entrant en compétition avec RANK-L pour bloquer la différenciation ostéoclastique, (Lerner, 2000), ([Figure 12](#)).

Le recrutement des précurseurs ostéoclastiques se fait également grâce à une classe spéciale de cytokines : les chemokines. Ces cytokines sont chimio-attractives. MCP-1 (*Monocytes chemoattractant protein 1* / protéine chimiotactique des monocytes de type 1 (MCP-1 aussi connu comme CCL2) et SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1* / facteur 1 dérivé des cellules stromales, aussi connu comme CXCL12), CCL8 ou MCP-2 ; CCL6 ou MRP-1 ; CCL12 ou MCP-5, en sont quelques exemples. Les précurseurs vont se différencier et s'activer. Durant cette phase, la résorption osseuse est constante. Elle dure environ 3 semaines chez l'humain, (Matsuo and Irie, 2008).

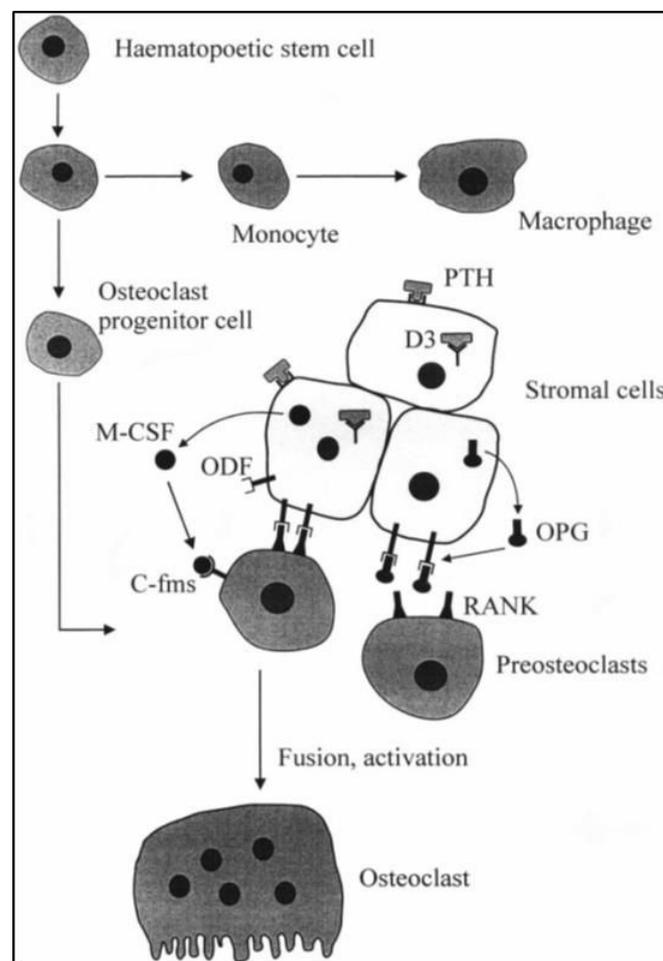


Figure 12 : voie de différenciation des cellules hématopoïétiques en ostéoclastes multinucléés, (Lerner, 2000)

D3 : vitamine D3, **PTH** : hormone parathyroïdienne, **ODF** : *osteoclast differentiating factor*, **M-CSF**: *macrophage colony stimulating factor*, **C-fms** : *colony stimulating factor receptor*, **RANK** : *receptor activator nuclear kappa B*.

2) La phase intermédiaire du remodelage osseux

Le processus de résorption est inhibé pendant cette phase. Les ostéoclastes entrent en apoptose alors que les ostéoblastes se différencient. Les ostéoclastes entrent en apoptose selon la voie de signalisation Bim/Caspase-3 ou la voie de signalisation Fas ligand induite par l'œstrogène. Le calcium extracellulaire libéré pendant la résorption osseuse est un signal d'inhibition qui va induire l'apoptose des ostéoclastes et donc l'arrêt du processus de résorption, (Matsuo and Irie, 2008).

3) La phase terminale du remodelage osseux

La phase terminale correspond à la formation du nouveau tissu osseux non minéralisé, appelé ostéoïde, à sa minéralisation et à l'entrée en quiescence des ostéoblastes pour former les cellules bordantes. Cette phase est la plus longue. Elle dure trois mois environ chez l'Homme. Pendant la formation osseuse dans la phase finale, la différenciation des ostéoclastes est supprimée, très probablement par OPG produite par les ostéoblastes. De même, au cours de cette phase, les ostéocytes produisent la sclérostine (codée par le gène Sost), qui supprime la formation osseuse par les ostéoblastes. Les mutations entraînant la perte de fonction de la sclérostine sont à l'origine d'une formation d'os en excès, une pathologie connue sous le nom de sclérostéose. Les ostéoblastes deviennent quiescents vraisemblablement avec l'aide de la sclérostine sécrétée par les ostéocytes situés dans les canalicules, (Matsuo and Irie, 2008).

I.1.4.2 Contrôle du remodelage osseux

Tout le processus de remodelage osseux est contrôlé par des molécules qui régulent la différenciation et l'activation des cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes, soit de façon directe soit de façon paracrine. Des molécules d'adhésion contrôlent de façon directe les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. L'activité des cellules osseuses est également contrôlée de façon indirecte via la sécrétion de facteurs paracrines libérés dans le milieu qui vont venir se fixer à la surface des cellules sur des récepteurs spécifiques pour activer des voies de signalisation particulières à un moment précis des 3 phases du remodelage osseux. Les signaux mécaniques jouent aussi un rôle dans le développement et la différenciation des cellules osseuses, (Matsuo and Irie, 2008).

Trois modes de communication sont distingués entre ostéoblastes et ostéoclastes.

- L'interaction cellules-cellules correspond à la liaison du ligand avec le récepteur. Le contact le plus connu à ce jour est l'interaction entre le ligand RANK-L (encore appelé TRANCE) exprimé à la surface des ostéoblastes et le récepteur RANK exprimé à la surface des ostéoclastes.
- La formation de « *gap-junction* » à l'interface de ces deux types cellulaires (ostéoblastes et ostéoclastes) permet le passage de petites molécules hydrosolubles entre les deux types de cellules.
- La diffusion de facteurs paracrines tels que des cytokines, des chemokines et des facteurs de croissance, (Matsuo and Irie, 2008).

I.1.4.2.1. Conséquences physiopathologiques induites par des anomalies du remodelage osseux

Les déséquilibres du remodelage osseux peuvent entraîner des perturbations graves dans la structure et la fonction squelettique, voire la morbidité et le raccourcissement de la durée de vie. La plupart des maladies squelettiques adultes sont dues à une activité ostéoclastique excessive, ce qui conduit à un déséquilibre du remodelage osseux et par conséquent l'augmentation de la résorption au détriment de la synthèse osseuse. Ce déséquilibre peut provoquer des maladies telles que l'ostéoporose, la maladie parodontale ou bien il peut être la conséquence de pathologies auto-immunes ou tumorales telles que la polyarthrite rhumatoïde, les myélomes multiples et cancers à un stade métastatique, (Boyle et al., 2003).

Ainsi, le maintien de l'intégrité du squelette et de son aspect fonctionnel repose essentiellement sur l'équilibre des étapes de remodelage osseux décrit précédemment, (Matsuo and Irie, 2008). Cet équilibre repose sur des mécanismes susceptibles de réguler le métabolisme osseux.

I.1.5. Principaux mécanismes susceptibles de réguler le métabolisme osseux

I.1.5.1 Les hormones

Plusieurs hormones sont impliquées dans la régulation du métabolisme osseux.

La parathormone (PTH), la vitamine D3 (1.25-dihydroxyvitamine D3 (1,25-(OH)₂D3) ou cholécalférol) et la calcitonine sont les trois hormones systémiques qui régulent le métabolisme du calcium et par conséquent celui de l'os, (Figure 13).

Rôle de la PTH, de la vitamine D3 et de la calcitonine sur la résorption osseuse

La parathormone qui est synthétisée par la glande parathyroïde et la vitamine D3 produite au niveau de la peau sont des hormones hypercalcémiantes qui stimulent la résorption osseuse et donc l'activation des ostéoclastes alors que la calcitonine est une hormone hypocalcémiante qui inhibe la résorption ostéoclastique (Cappariello et al., 2014), (Figure 13).

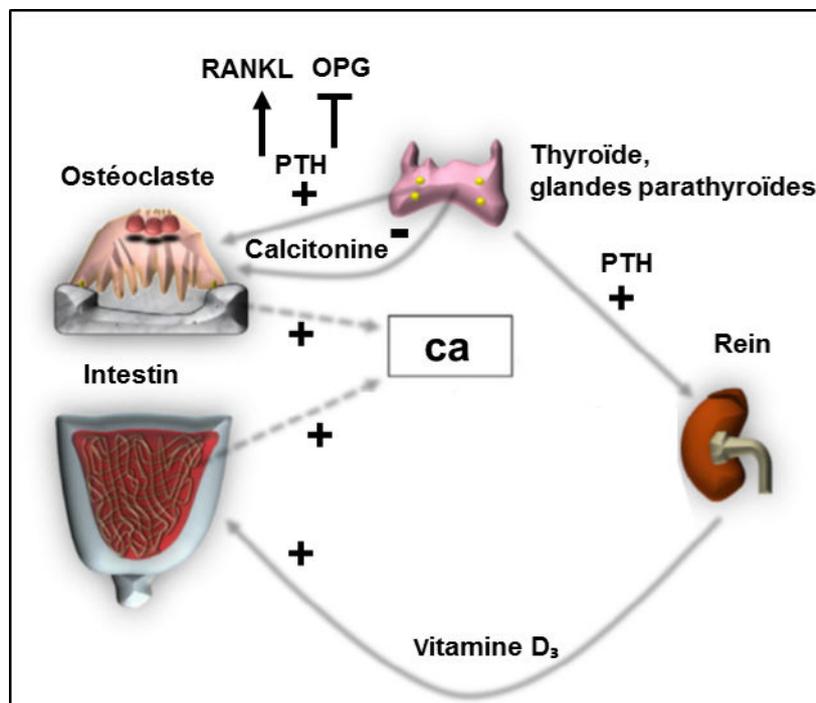


Figure 13 : contrôle hormonal du calcium et implication sur l'activité ostéoclastique

L'hormone parathyroïdienne, (PTH), stimule la résorption osseuse, alors que la calcitonine l'inhibe via la régulation du calcium extracellulaire dans les fluides. La PTH stimule l'absorption du calcium et de la vitamine D₃ par les reins. La vitamine D₃ issue des reins, stimule l'absorption du calcium par l'intestin. La PTH stimule la production de RANK-L par les ostéoblastes et inhibe l'expression de OPG. + = effet positif, - = effet négatif.

Image modifiée selon (Cappariello et al., 2014)

Bien que les ostéoblastes soient des cellules qui forment l'os, elles sont la cible d'hormones cataboliques, qui contribuent à résorber l'os : l'hormone parathyroïdienne

(PTH), les prostaglandines et la 1.25-dihydroxyvitamine D3 (1,25-(OH)₂D3), (Figure 12).

Les récepteurs de l'hormone parathyroïdienne (PTHrP-R et PTH-rP) apparaissent très tôt au cours de la différenciation ostéoblastique et restent à des niveaux élevés jusqu'au stade d'ostéocytes. Ces observations suggèrent que l'hormone parathyroïdienne participe à la régulation de l'activité ostéoblastique nécessaire à l'activation des ostéoclastes :

- stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) résultant en l'augmentation de l'expression de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc).
- activation des protéines kinases dépendantes de l'AMPc
- inhibition de la synthèse du collagène
- inhibition de l'activité de l'alcaline phosphatase (ALP)
- stimulation de l'absorption du calcium.

Parallèlement aux mécanismes de régulation induits par la PTH, on constate des changements morphologiques des ostéoblastes conduisant à une diminution de la densité de ces derniers à la surface du tissu osseux. Les plages osseuses dépourvues d'ostéoblastes représentent des zones favorisant l'activité de résorption des ostéoclastes, (Rodan and Martin, 1981).

Néanmoins, le métabolisme osseux doit assurer un remodelage osseux harmonieux avec un équilibre entre formation et résorption osseuse.

Rôle de la PTH, de la vitamine D3 et de la calcitonine sur la formation osseuse

Les deux hormones : parathormone (PTH) et vitamine D3 (25(OH)₂) possèdent également une activité anabolique de formation osseuse. Les ostéoblastes possèdent également des récepteurs à la vitamine D, (Figure 12). Une fois la vitamine D liée à ces récepteurs spécifiques, il y a activation de la synthèse de collagène de type I, de la phosphatase alcaline et de la synthèse des protéines non collagéniques, telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la fibronectine. La PTH aurait également un effet anabolique grâce à l'activation de facteurs de croissance tels que IGF-I et TGF-β1 qui à leur tour stimulent la production de collagène de type I, (Canalis et al., 1989) et augmentent ainsi la masse osseuse, (Pfeilschifter et al., 1995). De nombreux facteurs de croissance jouent un rôle clé dans la régulation du remodelage osseux.

I.1.5.2 Les facteurs de croissance

I.1.5.2.1. Régulation de l'activité ostéoclastique

Pour ce qui est de la régulation de l'action des ostéoclastes, le trio de facteurs de croissance, RANK-L, RANK et de l'ostéoprotégérine est le mieux connu. Ce sont des molécules de la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*/facteur de nécrose tumorale). Ils ont été qualifiés de médiateurs ultimes qui contrôlent les ostéoclastes et par conséquent la résorption. Comme décrit précédemment, le complexe RANK-L/RANK va déclencher la biorésorption. L'ostéoprotégérine est un antagoniste du récepteur sécrété par les ostéoblastes qui va inhiber la résorption en empêchant la formation du complexe RANK/RANK-L, (Lerner, 2000). Un modulateur de la résorption ostéoclastique est la concentration en ion Ca^{2+} extracellulaire. Dans une zone en résorption cette concentration atteint 8-40 mM. Cette concentration active les ostéoclastes, (Detsch and Boccaccini, 2014).

Néanmoins, le VEGF de type C a été décrit comme un autre facteur autocrine qui régule l'activité des ostéoclastes. VEGF-C sécrété par les ostéoclastes va venir se fixer sur le récepteur RANK exprimé à la surface de l'ostéoclaste. VEGF-C va donc stimuler la résorption en interagissant avec RANK, (Detsch and Boccaccini, 2014).

D'autre part, un grand nombre de cytokines et de facteurs de stimulation des colonies qui sont impliqués dans l'hématopoïèse (processus physiologique de production des cellules sanguines) affectent également le développement des ostéoclastes. Les interleukines 1, 3, 6, 8, 11, 15 et 32, *leukemia inhibitory factor* / le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), l'oncostatine M (OSM), *ciliary neurotropic factor* / le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), *tumor necrosis factor* / le facteur de nécrose tumorale (TNF), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* / le facteur stimulant les colonies de granulocyte/macrophage (GM-CSF), *macrophage-colony stimulating factor* / le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF), et c-kit ligand favorisent la différenciation des précurseurs en ostéoclastes. Par exemple, l'Interleukine-1 est sécrétée par les cellules pré-ostéoclastiques après stimulation par un mécanisme autocrine pour favoriser leur propre différenciation.

Par contre les interleukines 4,10,18, 13 (IL-4, IL-10, IL-13, IL-18) et l'*interferon-gamma* (INF- λ) inhibent le développement des ostéoclastes, (Lerner, 2000), (Cappariello et al., 2014), ([Figure 14](#)).

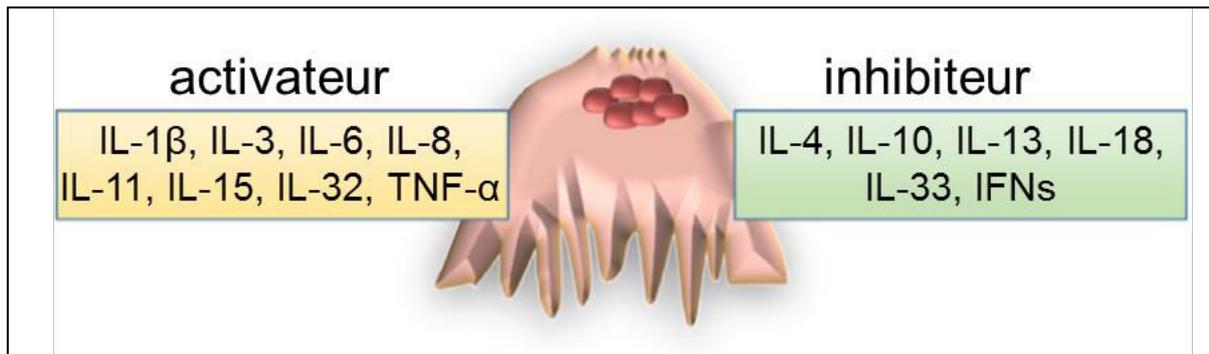


Figure 14 : lien entre ostéoclaste et système immunitaire. Image modifiée selon (Cappariello et al., 2014)

Liste des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui régulent positivement ou négativement les fonctions des ostéoclastes.

Pour maintenir cette harmonie dans le remodelage osseux et donc cet équilibre entre formation et résorption osseuse, tout comme les ostéoblastes n'influencent pas uniquement la formation osseuse et activent la différenciation ostéoclastiques par la sécrétion de M-CSF et RANK-L, les ostéoclastes sont des cellules multifonctions qui n'exercent pas uniquement une action catabolique de résorption du tissu osseux.

Les ostéoclastes sont suspectés de sécréter des facteurs anaboliques qui supportent la repousse osseuse, (Detsch and Boccaccini, 2014) soit par une communication paracrine entre ostéoblaste/ostéoclaste mais également par des signaux autocrines qui impliquent des hormones ou des cytokines qui agissent sur la cellule même qui les a synthétisé. Les ostéoclastes qui influencent l'activité des ostéoblastes sont dits « non-résorbants », (Kreja et al., 2010). L'étude de Kreja *et al* a montré que les ostéoclastes pouvaient attirer les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et favoriser leur différenciation vers la lignée ostéogénique. Cet effet est confirmé par l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation des ostéoblastes (RUNX 2, sialoprotéine osseuse, ALP et de l'ostéopontine). Le facteur induisant la différenciation ostéogénique des CSM par les ostéoclastes reste néanmoins à élucider, (Kreja et al., 2010). De même les ostéoclastes vont stimuler l'angiogenèse et la recolonisation vasculaire de la matrice osseuse. Ils sécrètent en effet du VEGF-A en réponse aux signaux paracrines émis par les ostéoblastes, (Detsch and Boccaccini, 2014).

I.1.5.2.2. Régulation de l'activité ostéoblastique

Pour ce qui est de la régulation de l'action des ostéoblastes, les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines sécrétés par les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes, cellules endothéliales) qui sont les mieux identifiés, sont : *l'insulin-like Growth Factor* ou facteur de croissance apparenté à l'Insuline (IGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), le facteur de croissance transformant (TGF), la protéine morphogénétique osseuse (BMP). Ces cytokines et facteurs de croissance contrôlent l'ostéogenèse, la régénération osseuse et la formation de matrice extracellulaire via le recrutement et la différenciation de cellules ostéoprogénitrices. Ce sont d'ailleurs des molécules couramment utilisées en association à des implants pour l'ingénierie tissulaire, (Janicki and Schmidmaier, 2011). Le VEGF est quant à lui le plus souvent utilisé pour induire la formation d'un réseau vasculaire à travers l'implant nécessaire à l'apport de nutriments et d'oxygène indispensables à la survie des cellules dans l'implant, (Bose et al., 2012). TGF β , interleukine 6 (IL-6) et IGF sont utilisés pour favoriser le développement des ostéoblastes, (Detsch and Boccaccini, 2014).

I.1.6. Le tissu osseux sain : propriétés mécaniques

Pour assurer toutes ses fonctions indispensables à l'autonomie et la qualité de vie d'un individu, le tissu osseux doit présenter certaines qualités mécaniques.

La solidité de l'os est déterminée par sa composition et sa structure. Le tissu osseux doit être rigide et résistant à la déformation tout en étant flexible et capable d'absorber de l'énergie en se déformant pour pouvoir assurer ses fonctions de support. Il doit être en mesure de se raccourcir et de s'élargir s'il est comprimé et de s'allonger ou de s'amincir sous tension, sans se fissurer. Si l'os est trop rigide et incapable de se déformer, l'énergie imposée lors de la charge sera libérée et favorisera la fissure de l'os puis sa fracture. Si l'os est trop flexible et se déforme au-delà de son pic de contrainte, il peut également se casser. Les os doivent aussi être légers pour faciliter le mouvement, (Seeman and Delmas, 2006)

L'os compact ou cortical possède une forte résistance à la rupture, (Tableau 2). Pour exemple, la résistance à la rupture d'échantillons d'os compacts a été estimée dans la

plage de 70 à 250 MPa. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles observées pour l'aluminium ou l'acier doux, mais l'os est beaucoup plus léger. Bien qu'apparemment rigide, les os présentent un degré considérable d'élasticité, ce qui est important pour la capacité du squelette à résister aux chocs. Les estimations du module d'élasticité des échantillons d'os cortical sont de l'ordre de 10 GPa. Les valeurs trouvées pour l'acier sont beaucoup plus importantes, indiquant une plus grande élasticité de l'os, (Barrère et al., 2006).

Type d'os	Direction et type de tensions appliquées	Résistance (MPa)	Module d'élasticité (GPa)
Os cortical (milieu du fémur)	Tension longitudinale	133	17
	Compression longitudinale	193	17
	Coupure longitudinale	68	3
	Tension transverse	51	11,5
	Compression transverse	33	11,5
Os trabéculaire (Extrémité du tibia)	Compression axiale	5,3	0,445
Os trabéculaire (Extrémité du fémur)	Tension axiale	6,8	0,441

Tableau 2 : relation entre le type d'os et les propriétés mécaniques selon (Barrère et al., 2006)

Les propriétés mécaniques des os dépendent de plusieurs facteurs.

Ces propriétés varient en fonction de l'âge et du type d'os. Des tests mécaniques de tension ont été réalisés sur des os de 22 types différents, à différentes périodes de la vie. Ces os contenaient moins de 20% de porosité afin d'éviter les biais (on sait qu'une forte porosité altère les propriétés mécaniques). Les résultats ont démontré que les propriétés d'élasticité sont proportionnelles à la concentration en calcium. Ces différences proviendraient de ratios différents en eau entre la phase organique et la phase minérale de l'os, (Currey, 2004).

Les propriétés mécaniques des os varient aussi en fonction de la microstructure de l'os : compact/cortical ou spongieux/trabéculaire, pour un même individu. Cela est principalement dû à une composition chimique et organique ainsi qu'à une structure différente.

Un autre facteur permet d'expliquer les variations mécaniques observées entre un os trabéculaire et compact. Il s'agit de la cristallinité. Dans l'os trabéculaire, la cristallinité de l'apatite diminue, la taille des cristaux est plus petite, le rapport molaire de l'apatite Ca/P est moins élevé.

I.1.7. Interaction cellules osseuses / biomatériaux

L'interaction d'une cellule avec un substrat est couramment appelée adhésion. En fait, l'interaction commence par l'attachement : phénomène rapide à court terme qui fait intervenir principalement des liaisons physico-chimiques telles que des forces ioniques et des interactions de Van der Waals. S'ensuit alors l'adhésion cellulaire à proprement parler qui intervient à plus long terme et implique plusieurs molécules biologiques, puis l'étalement de la cellule à la surface du biomatériau, (Anselme, 2000).

Les protéines impliquées dans l'adhésion des ostéoblastes aux biomatériaux sont plus étudiées que celles impliquées dans l'adhésion des ostéoclastes aux biomatériaux. En effet, dans le cadre de la réparation osseuse, les recherches ont longtemps été focalisées sur les mécanismes de formation osseuse par les cellules qui synthétisent et minéralisent la matrice osseuse, par conséquent les ostéoblastes. Néanmoins, avec le développement de l'ingénierie tissulaire osseuse orientée vers un désir de régénération osseuse, l'étude de l'adhésion des ostéoclastes aux biomatériaux fait l'objet de travaux de recherches croissants. En effet, un biomatériau destiné à la régénération osseuse doit premièrement servir d'échafaudage pour accueillir les cellules progénitrices osseuses qui vont synthétiser la matrice osseuse mais aussi pour les cellules qui vont dégrader le biomatériau afin de laisser la place au tissu osseux en formation.

Le site d'adhésion entre une cellule et un substrat s'appelle contact focal, plaque d'adhésion ou adhésion focale en fonction de l'étendue de sa surface, (Figure 15). Ce contact est d'une dimension de l'ordre de 10-15 nm. Le contact focal est formé d'une colocalisation de plusieurs protéines d'adhésion. Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'adhésion tels que les intégrines interagissent avec des protéines telles que la paxilline, la taline, la vinculine, la tensine qui elles-mêmes sont en interaction avec les filaments d'actine. Les contacts focaux se forment principalement sur des cellules qui sont faiblement motiles, (Anselme, 2000). Cette première étape d'adhésion est

primordiale puisqu'elle conditionnera par la suite l'activité fonctionnelle des cellules : prolifération, différenciation.

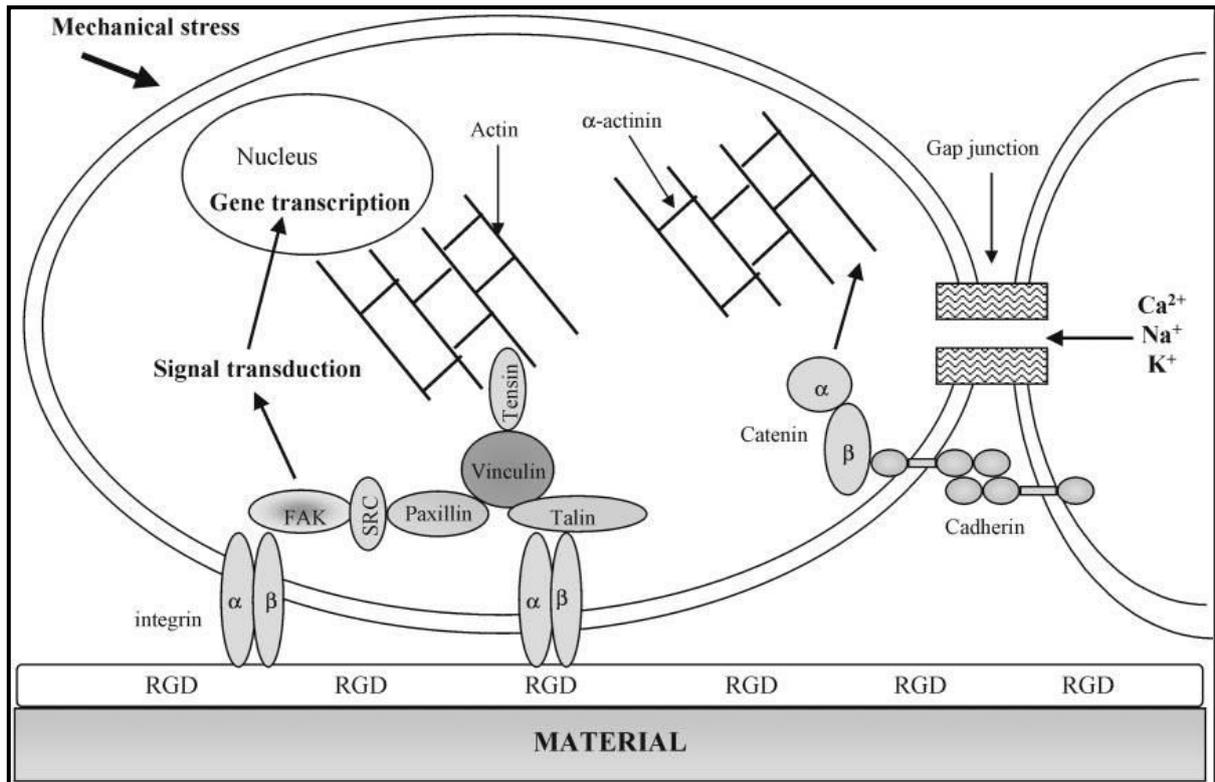


Figure 15 : représentation de protéines cellulaires ostéoblastiques impliquées dans l'adhésion cellulaire au biomatériau selon Anselme, 2000.

Les intégrines situées à la membrane plasmique des ostéoblastes interagissent avec le groupement RGD (arginine, Glycine, acide aspartique) de protéines du substrat (ces protéines peuvent être les bone sialoprotéines osseuses, la fibronectine...). Les intégrines, molécules hétérodimériques transmembranaires, sont reliées à d'autres protéines du cytosquelette situées dans le cytoplasme cellulaire qui participe également à l'adhésion cellulaire (taline, vinculine, FAK : focal adhesion kinase...)

Dans les parties ci-dessous, seront présentées des données bibliographiques sur l'interaction ostéoblastes/biomatériaux puis ostéoclastes/biomatériaux.

1.1.7.1 Voie directe d'activation de l'adhésion des cellules osseuses

L'interaction au tissu osseux des cellules ostéoblastiques, formatrices de la MEC osseuse, est la première phase essentielle qui va influencer leur activité fonctionnelle (migration, ancrage, prolifération, différenciation) ainsi que leur métabolisme. Ce

mécanisme d'adhésion est aussi la phase préliminaire essentielle à l'activité des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. Ce mécanisme permet la formation d'une zone de scellement entre ostéoclastes et tissu osseux qui va délimiter la zone à résorber. En effet, l'activité ostéoclastique est permise par l'attachement des ostéoclastes à la surface de l'os, puis la dégradation par dissolution des composants inorganiques de la MEC osseuse par sécrétion acide et la dégradation des composants organiques par l'action d'enzymes telles que la cathepsine K ou les collagénases. Puis, ils se détachent et migrent vers un autre site ou meurent par apoptose.

Pour adhérer à la matrice extracellulaire, les cellules ostéoclastiques et ostéoblastiques interagissent avec différentes protéines, (Grzesik and Robey, 1994), (Anselme, 2000), (Detsch and Boccaccini, 2014), (Rouahi et al., 2006a), (Boyle et al., 2003). Ces protéines sont synthétisées par les ostéoblastes. Il en existe plus de 200 types tels que des glycoprotéines, des protéoglycanes (décorine, lumican, biglycan) et des sialoprotéines qui permettent la transmission de signaux au sein de la MEC. En effet, les protéines osseuses comme la fibronectine, l'ostéopontine, les sialoprotéines osseuses, la thrombospondine, le collagène de type I, la vitronectine, sont chémoattractives et possèdent des propriétés adhésives parce qu'elles possèdent une séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique). Cette séquence est spécifiquement reconnue par des récepteurs membranaires des ostéoblastes impliqués dans l'adhésion tels que les intégrines. Ces intégrines sont des molécules transmembranaires hétérodimériques de sous-unités α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_5, \alpha_v$) et β (β_1 et β_5). En fonction de leur combinaison, les intégrines vont se lier préférentiellement à une protéine cellulaire spécifique. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ se lie à la fibronectine des ostéoblastes alors que les intégrines $\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_3\beta_1, \alpha_v\beta_1$ lient le collagène de type I. Les protéines de la matrice osseuse impliquées dans l'adhésion cellulaire sont exprimées de façon séquentielle en fonction du stade du développement osseux et de la localisation anatomique de l'os. De même, les récepteurs membranaires exprimés sur les cellules osseuses et impliqués dans l'adhésion sont exprimés différemment en fonction du type cellulaire et du stade de développement cellulaire. Les Intégrines $\alpha_4, \alpha_v, \alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5, \beta_3/\beta_5$ sont exprimées par toutes les cellules osseuses mais en quantités différentes en fonction du stade de maturation de la cellule. Par contre la sous-unité α_4 est principalement exprimée par les ostéoblastes.

Pour identifier les protéines impliquées dans l'adhésion des cellules osseuses avec le tissu osseux et ainsi définir des voies de signalisation, des expériences *in-vitro* ont consisté à cultiver les cellules osseuses sur des lamelles traitées avec des protéines de la matrice extracellulaire. Des inhibiteurs de molécules ont été utilisés pour inactiver leur fonction et ainsi pouvoir discerner leur rôle. Des anticorps* ou des ARN antisens, tout comme des molécules inhibitrices ont été utilisées. De ces études, il a pu être déduit que les ostéoblastes humains adhèrent préférentiellement à la fibronectine plutôt qu'au collagène de type I ou III, à la laminine ou à la vitronectine, (Anselme, 2000), (Cowles et al., 2000).

En effet, l'expérience de Cowles *et al* a permis d'identifier la voie de signalisation suivante : l'adhésion des cellules ostéoblastiques à la matrice osseuse commence par l'interaction de protéines osseuses spécifiques : collagène de type I, fibronectine, ostéopontine et vitronectine qui vont venir se lier au récepteur intégrine de la MEC osseuse. Cette liaison va engendrer l'adhésion des ostéoblastes par l'interaction des protéines d'adhésion focale de la MEC (FAK) avec le cytosquelette de la cellule. De cette étape d'adhésion va dépendre la prolifération des ostéoblastes. La liaison de collagène I à l'intégrine va activer les protéines kinases alors que la liaison de la fibronectine à l'intégrine va activer les facteurs de transcriptions AP-1 : c-fos et c-jun et ainsi induire la prolifération. La prolifération des ostéoblastes est donc essentiellement médiée par l'interaction fibronectine/intégrine, (Cowles et al., 2000). PKC active C-fos médiée par la voie de l'interaction Fibronectine/Intégrine alors que PKA active C-fos médié par l'interaction collagène/Intégrine. Les protéines kinases vont activer la phosphorylation des tyrosines et thréonine de MAP-Kinase. MAP kinase phosphorylé va activer la transcription des gènes de prolifération et de différenciation. En fonction de la protéine ostéoblastique qui va se lier à l'intégrine, la voie de signalisation de la prolifération sera différente (Figure 16).

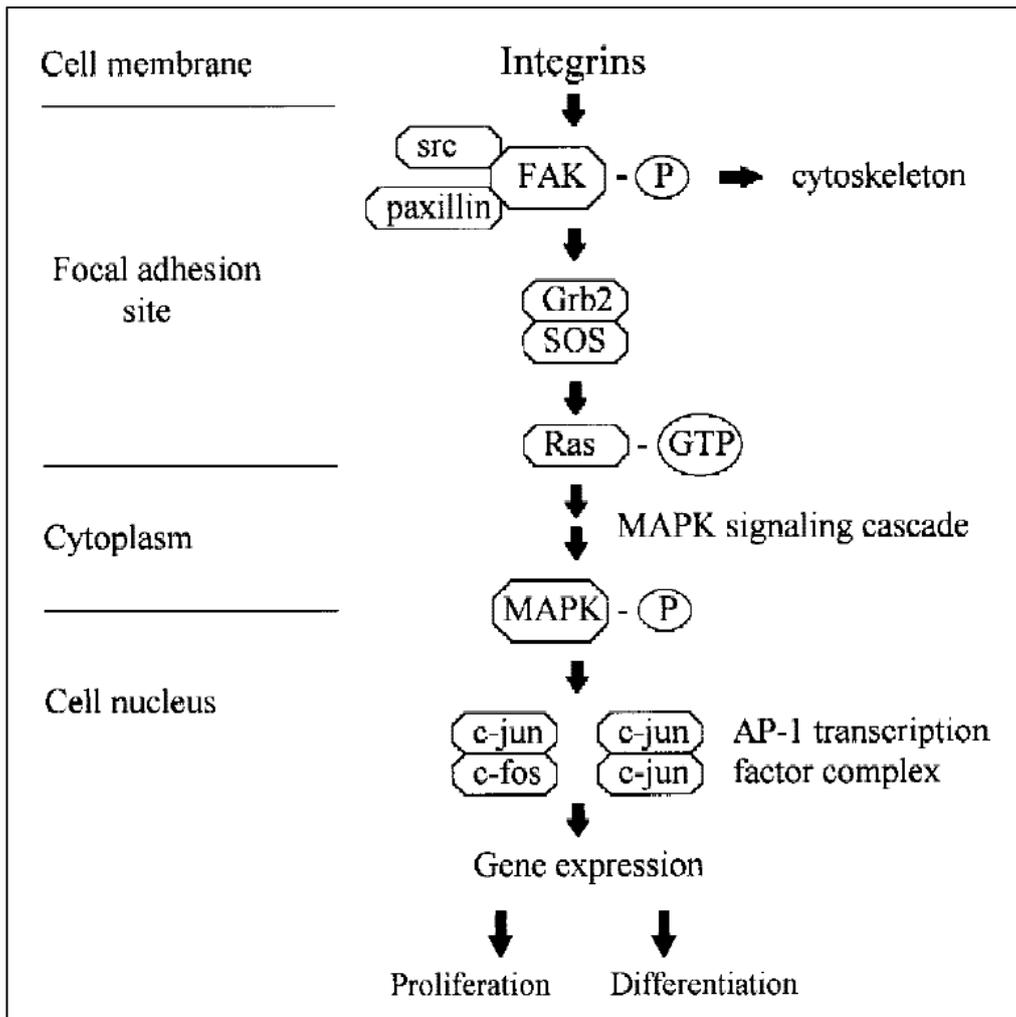


Figure 16 : voie de signalisation cellulaire médiée par l'interaction avec les intégrines selon Cowles et al 2000

L'interaction des cellules avec substrat via les intégrines interagissant avec la protéine membranaire FAK va activer la voie de signalisation MAPK (*mitogen activated protein kinase*) qui va activer le facteur de transcription AP-1 suite à la formation du complexe C-JunC/Jun ou C-Jun/C-fos qui permettra respectivement l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ou la prolifération ostéoblastique.

En ce qui concerne les ostéoclastes, leur interaction avec l'os aurait lieu au niveau d'une adhésion focale dans la zone de scellement entre une protéine de la matrice osseuse l'ostéopontine et le récepteur vitronectine $\alpha_v\beta_3$ localisé dans la membrane des ostéoclastes, (Lerner, 2000). Les ostéoclastes se lient aussi à la sialoprotéine osseuse avec leur récepteur vitronectine, (Grzesik and Robey, 1994).

De la première étape d'adhésion des cellules osseuses avec la matrice osseuse, va dépendre toute l'activité fonctionnelle des cellules (prolifération et différenciation) qui

va permettre le maintien de l'intégrité du tissu osseux. En ingénierie tissulaire, cette étape préliminaire d'adhésion des cellules avec les biomatériaux est déterminante mais ne représente pas le seul facteur susceptible d'influencer la recolonisation du biomatériau.

I.1.7.2 Interaction ostéoblastes et biomatériaux : influence de la composition chimique et de la microstructure

De nombreuses études ont montré que la composition chimique des biomatériaux, la microstructure, la topographie, la chimie de surface, l'énergie de surface jouent un rôle dans l'interaction des cellules aux biomatériaux. De même, le pH et les charges à la surface des biomatériaux ont été identifiés pour influencer l'adhésion des ostéoblastes. Cette influence serait indirecte et liée à la formation au préalable d'une couche de protéine (fibronectine et albumine les plus étudiées et les mieux identifiées) à la surface des biomatériaux qui à leur tour influenceraient l'adhésion d'ostéoblastes. En effet, l'adsorption des protéines à la surface des matériaux dépendrait des propriétés physico-chimiques des biomatériaux qui réorganiseraient la conformation des protéines et changeraient le profil d'adsorption.

Le tableau 3, (Tableau 3), ci-dessous donne quelques exemples de recherches publiées dans la littérature sur l'influence de la composition chimique et de la microstructure de matériaux sur l'adhésion des ostéoblastes. Il ressort de ces exemples que la différence dans l'origine des cellules et les méthodes expérimentales rendent difficiles, voire impossibles, une comparaison directe et suscitent beaucoup d'interrogations. Par exemple, l'étude de Guiljean a permis d'affirmer qu'une rugosité de l'ordre de grandeur de 0,01 à 0,1 μm n'est pas assez discriminante pour être responsable de différence dans l'adhésion cellulaire, (Giljean et al., 2014). On peut alors se poser la question de savoir quelle est la rugosité moyenne ainsi que la largeur des rainures critiques pour stimuler ou inhiber l'activité des cellules ? Les études de Rouahi montrent que l'adsorption en surface des biomatériaux de protéines contenues dans le milieu de culture telles que la fibronectine et la BSA favorisent l'adhésion cellulaire. Une microstructure poreuse est donc bénéfique car elle est plus propice à l'adsorption des protéines. Le matériau poreux possédait une porosité ouverte de 12%. De plus, Rouahi compare son matériau à 12% de porosité avec uniquement un matériau dense à 2.5% de porosité fermée et un matériau dense poli, (Rouahi et al.,

2006a), (Rouahi et al., 2006b). Les matériaux sont de même composition chimique, donc l'influence de la composition chimique peut être éliminée. Néanmoins, l'effet d'un taux de porosité adapté se pose. Est-ce qu'une porosité supérieure à 12% serait plus adaptée ? S'en suit une autre interrogation incontournable : qu'est-ce qu'une bonne adhésion cellulaire ? En effet, même si les cellules ont adhéré rapidement à court terme sur ces biomatériaux poreux, à long terme, la prolifération cellulaire avait diminué. Concernant les études de différenciation cellulaire sur les biomatériaux, la difficulté du choix du point de cinétique adapté en fonction des gènes ou de la protéine que l'on désire étudier et en fonction du type cellulaire reste une problématique. En effet, les gènes de différenciation ostéoblastique sont exprimés de façon séquentielle et la cinétique d'expression est différente en fonction d'un type cellulaire à l'autre, (Barré, 2012), (Marie, 2001). Est-ce que le fait que Deligianni, (Deligianni et al., 2000) n'ait pas observé d'effet dans l'expression de l'ALP sur ces biomatériaux de différentes rugosités viendrait de points de cinétique inadaptés pour détecter une différence dans les pics d'expression séquentielle du gène ? Cette question peut aussi se poser pour l'étude de Zreiqat, (Zreiqat et al., 1999). Laczka-Osyczka, a émis la conclusion qu'une rugosité de surface importante et une structure cristallisée diminuent l'activité de l'ALP, (Łaczka-Osyczka et al., 1998). Néanmoins, les biomatériaux utilisés dans son étude comparative, en plus de posséder une rugosité et une structure cristallisée différentes, possédaient aussi une composition chimique différente. Est-ce que le fait que la chimie de surface soit différente, n'affecterait-elle pas aussi la réponse cellulaire. Dans son étude, Bidan a montré que les formes convexes de pores favorisent un dépôt de tissu plus rapide, (Bidan et al., 2012). Une fois le dépôt fait dans ses pores, la forme devient non convexe et le dépôt est ralenti. N'y aurait-il pas d'autres paramètres qui pourraient influencer sur la rapidité de l'adhésion des cellules aux biomatériaux ? On peut se demander par exemple si une substitution ionique au sein de l'apatite HA pourrait contribuer à augmenter l'adhésion cellulaire indépendamment de la présence de macropores ?

Réf	Cellules	Matériaux	Résultats	Conclusions émises par l'auteur																				
Deilghiani et al, 2000	Cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse	Pastilles d'hydroxyapatite polies avec 3 rugosités différentes produites avec du papier en carbone de silicium -Ra= 0,733±0,203 µm -Ra=2,856±0,180 µm -Ra=4,680±0,433 µm	<ul style="list-style-type: none"> - les biomatériaux ne possèdent pas de phase secondaire. - la morphologie des cellules est identique sur les 3 pastilles et les cellules sont orientées parallèlement aux stries - plus de cellules ont adhéré sur le biomatériau le plus rugueux - plus de prolifération à 14 jours et moins de différenciation (activité enzymatique de l'ALP) à 8 jours est observée sur la pastille la plus rugueuse. A 16 jours, l'activité de l'ALP était similaire sur les 3 substrats - il a fallu appliquer une force de cisaillement plus forte sur les surfaces les plus rugueuses pour détacher les cellules 	Les différences observées sont directement attribuées aux propriétés de surface du biomatériau (rugosité).																				
Laczka-Osyczka et al, 1998	Cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de rats Wistar	Lamelles de verre coatées avec un matériau composite: verre-biocéramique de différentes compositions chimiques: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Bioverre-céramique</th> <th colspan="3">Composants en % de mol</th> </tr> <tr> <th></th> <th>CaO</th> <th>P₂O₅</th> <th>SiO₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A2</td> <td>54</td> <td>6</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>T2</td> <td>36</td> <td>4</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>S2</td> <td>16</td> <td>4</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	Bioverre-céramique	Composants en % de mol				CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂	A2	54	6	40	T2	36	4	60	S2	16	4	80	<ul style="list-style-type: none"> - l'épaisseur du film pour chaque composition était identique - A2: structure cristallisée, S2: structure amorphe, T2 structure intermédiaire - Ra supérieure pour A2 et T2 (la valeur n'a pas été donnée) - l'aire de nodules de minéralisation à la surface des biomatériaux était différente: S2>T2>A2 - moins d'activité de l'ALP a été observée sur A2 - l'expression des gènes COLLI, OPN, BSP et ALP était plus importante sur T2 et S2 mais de façon non significative 	Une rugosité de surface importante et une structure fortement cristalline diminuent l'activité de l'ALP. C'est la microstructure de la surface et la rugosité qui ont influencé la réponse cellulaire et non la composition chimique
Bioverre-céramique	Composants en % de mol																							
	CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂																					
A2	54	6	40																					
T2	36	4	60																					
S2	16	4	80																					
Zreigat et al, 1999	Cellules osseuses issues de la colonne vertébrale ou des côtes de patients de 15 ans (HBDGs: Human bone derived cells)	Pastilles: -d'alumine Al ₂ O ₃ -alumine dopée avec des ions magnésium [Mg]-Al ₂ O ₃ -Hydroxyapatite HAP -plaque de culture en polystyrène (TCPS)	<ul style="list-style-type: none"> - RA: valeur non définie mais mesurée. La RA de HAP était plus grande mais identique sur Al₂O₃ et [Mg]-Al₂O₃ - angle de contact: valeur non définie mais mesurée. La valeur d'angle sur HAP était plus grande mais du même ordre pour TCPS, [Mg]-Al₂O₃ et Al₂O₃ - taille de grains du même ordre (1 µm) pour tous les matériaux - la DRX a confirmé la pureté de phase de HAP - le niveau de l'expression des protéines (ALP, Thrombospondine, Pro-collagène, ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine) est double sur HAP comparé à Al₂O₃ mais il était supérieur sur [Mg]-Al₂O₃ comparé à Al₂O₃ 	La topographie et la mouillabilité de surface n'ont pas d'influence sur la réponse cellulaire puisqu'elles sont les mêmes sur [Mg]-Al ₂ O ₃ et Al ₂ O ₃ . C'est le Magnésium qui améliore l'adhésion et la différenciation cellulaire.																				
Rouahi et al, 2006a	Saos-2 (lignée cellulaire ostéoblastique humaine issue d'ostéosarcome)	-pastilles d'hydroxyapatite poreuses (mHA) -pastilles d'hydroxyapatite denses polies (pHA) -Titane poli	<ul style="list-style-type: none"> - la DRX et IRTF ont confirmé la pureté de phase de tous les biomatériaux - le titane présentait une surface plus lisse - composante polaire et dispersive: titane>pHA - densité cellulaire plus importante sur mHA - les cellules sur mHA semblaient absorbées par le matériau, la délimitation cellulaire n'était pas visible - le gène ALP était moins exprimé par les cellules sur mHA - 10 fois plus de protéines ont été adsorbées à la surface de mHA ce qui a diminué sa composante polaire 	Le comportement cellulaire est influencé par les caractéristiques de surface du biomatériau et particulièrement par la microporosité qui favorise l'adsorption de protéines et qui influence l'adhésion et la prolifération cellulaire																				
Guillean et al, 2014	Cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse	-TiAl6V4 alliage de titane poli -316L acier inoxydable poli	<ul style="list-style-type: none"> - la rugosité était orientée sur tous les biomatériaux - la densité cellulaire était identique sur tous les biomatériaux - les cellules se sont orientées parallèlement aux rainures à la surface du matériau 	La RA comprise entre 0,01 µm et 0,1 µm ainsi que les rainures d'une largeur de 11-13 µm sont d'un ordre de grandeur limité pour percevoir une différence en terme de réponse cellulaire																				
Bidan et al, 2013	Lignée cellulaire pré-ostéoblastique MC3T3-E1	Scaffold 3D d'hydroxyapatite avec des macropores en forme de croix et de carrés ou d'étoiles à 4 branches	<ul style="list-style-type: none"> - Les pores en forme de croix stimulent la rapidité de la croissance deux fois plus que les pores en forme de carré. La densité cellulaire était la plus faible dans les pores de forme convexe comme les ronds. 	la géométrie des pores influence la densité cellulaire, la vitesse et la répartition des cellules. Dans les pores en forme de croix, un tissu est généré avec un taux élevé dans les branches ce qui pourrait contribuer à l'ancrage des cellules plus rapide dans l'hôte. Dans les formes circulaires, convexes, le taux de croissance ralentit, ce qui laisse le temps pour les échanges à travers les pores																				

Tableau 3 : études bibliographiques de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur l'adhésion des cellules ostéoblastiques

I.1.7.3 Interaction ostéoclastes et biomatériaux : influence de la composition chimique et de la microstructure

Pour commencer, il est important de rappeler certaines notions concernant la dégradation des biomatériaux utilisés pour la réparation osseuse. Qu'ils soient destinés au remplacement ou à la régénération osseuse, la dégradation des matériaux a été l'objet de nombreuses attentions puisque les produits de dégradation ne doivent pas être toxiques pour l'hôte et peuvent de surcroît influencer l'activité cellulaire, (Hoppe et al., 2011). Les métaux ne sont pas biodégradables mais leur résistance mécanique fait d'eux le matériau idéal pour le comblement osseux dans des zones anatomiques sujettes à de fortes contraintes mécaniques, comme par exemple la hanche. A contrario, les céramiques et les polymères qui sont biodégradables et / ou bioactifs ne sont pas adaptés pour le comblement de larges fissures osseuses dans des zones sujettes à de fortes contraintes mécaniques à cause de leur fragilité. Ces matériaux sont adaptés pour la régénération osseuse, cependant, le taux de résorption doit être contrôlé, (Stevens, 2008) et la vitesse de dégradation du matériau doit être adaptée à l'application souhaitée. Selon Bose *et al*, le matériau devrait se dégrader au bout de 9 mois pour permettre les fusions spinales alors qu'une résorption à partir de 3-6 mois devrait suffire pour les applications cranio maxillo-faciales, (Bose et al., 2012). L'implant doit maintenir ses caractéristiques physiques et ses propriétés mécaniques une fois implanté dans l'organisme afin de supporter l'attachement, la prolifération et la différenciation des cellules jusqu'à ce que la régénération tissulaire se fasse au niveau du site lésé. Idéalement le taux de dégradation doit être adapté à la vitesse de formation du nouveau tissu et ainsi permettre une transition souple et un transfert de charge adaptée de l'implant au tissu, (Cheung et al., 2007). Il est fondamental que la résorption du biomatériau s'effectue de façon concomitante à la néoformation osseuse. En effet, si le matériau-support se dégrade trop vite, le matériau ne réalisera pas sa fonction de support pour la formation osseuse et il se formera un tissu fibreux. A l'inverse, s'il se dégrade trop lentement, la persistance du biomatériau au sein du défaut osseux va empêcher la formation osseuse par manque de place. Dans certaines indications cliniques (remplacement des os de la face par exemple), des matériaux non biodégradables sont essentiellement utilisés afin de conserver la forme de la structure.

La dégradation des matériaux de substitution osseuse en particulier de céramiques de phosphate de calcium implique deux phénomènes : la dissolution qui est une dégradation physico-chimique et la (bio)résorption qui est la dégradation par les ostéoclastes, (Detsch and Boccaccini, 2014).

Lichte *et al* définissent la résorption des céramiques comme étant un processus cellulaire actif par les ostéoclastes avec néoformation consécutive de l'os, tandis que la dégradation est un procédé chimique qui se produit dans un environnement humide. Le taux de résorption dépend de la composition des céramiques de phosphate de calcium et du procédé de fabrication, (Lichte et al., 2011). Au cours de la biorésorption de céramiques de phosphate de calcium, les produits libérés sont naturellement métabolisés et n'induisent pas une concentration anormale en calcium ou phosphate dans les urines, le sérum ou les organes, (foie, peau, cerveau, cœur, rein, poumon ou intestin), (Barrère et al., 2006).

Dans le contexte de l'étude présente sur les céramiques phospho-calciques ce sont les deux phénomènes de dissolution physico-chimique et de biorésorption par les ostéoclastes qui sont concernés. Ce paragraphe sera consacré à l'étude du phénomène de biorésorption par les ostéoclastes.

Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique. L'étape initiale de leur activité résorbante est l'adhésion. L'une des interactions entre ostéoclastes et os aurait lieu au niveau d'une adhésion focale dans la zone de scellement entre une protéine de la matrice osseuse, l'ostéopontine, et le récepteur vitronectine $\alpha_v\beta_3$ localisé dans la membrane des ostéoclastes, (Lerner, 2000). Les intégrines interagissent aussi avec les protéines du cytoplasme pour initier le recrutement de protéines du cytosquelette au niveau du site d'adhésion. Le site d'attachement appelé podosome est formé par les intégrines et des éléments du cytosquelette : les microfilaments d'actine entourés de vinculine et de taline. Le podosome s'étend pour former une large structure circulaire en périphérie de la cellule appelée « *ring* d'actine ». Les ostéoclastes actifs qui résorbent deviennent alors polarisés. Ils changent de morphologie et développent une bordure en brosse entourée de la zone de scellement (contact étroit entre la cellule et le biomatériau).

Ainsi, l'interaction des ostéoclastes avec les biomatériaux est l'étape importante pour initier la biorésorption de ces derniers qui est primordiale dans le processus de médecine régénérative osseuse par les biomatériaux. Des études ont montré que des paramètres inhibent ou activent la résorption.

Sur la base de nombreux travaux de recherches, il a été trouvé que le taux de dégradation des biomatériaux dépend de leur composition chimique mais aussi de leur microarchitecture et particulièrement de leur porosité. La prise en compte des deux facteurs : composition chimique et microarchitecture, est cruciale pour contrôler le taux de dégradation.

Le tableau 4 résume des travaux publiés dans la littérature sur l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux phosphocalciques sur l'adhésion des ostéoclastes, (Tableau 4).

Réf	Cellules	Matériaux	Résultats	Conclusions émises par l'auteur																				
Redey <i>et al</i> , 1999	Ostéoclastes de rats	<p>Pastilles:</p> <ul style="list-style-type: none"> - d'hydroxyapatite synthétique cristallisée (HA) - d'hydroxyapatite carbonatée (C-HA) - carbonate de calcium naturel (C) 	<ul style="list-style-type: none"> - énergie de surface HA=44±2mJ/m², C-HA=9±5mJ/m², C=58±0,5mJ/m² ; - composante polaire de l'énergie de surface= - C-HA: 97±20mJ/m², - HA: 234±16mJ/m², - C: 268±37mJ/m² - la composante dispersive de l'énergie de surface était la même pour les 3 biomatériaux - la densité cellulaire était moins importante sur C-HA - l'aire des rings d'actine était plus importante sur HA et C-HA comparé à C - l'aire des ostéoclastes était plus importante sur HA comparé à C-HA et C - Il y a eu des lacunes de résorptions sur C, très peu sur C-HA et pas du tout sur HA 	<p>Les propriétés de surface (rugosité + composition chimique), affectent la morphologie et la densité cellulaire mais pas la capacité des cellules à former des rings d'actine.</p>																				
Laczka-Osyczka <i>et al</i> , 1998	Ostéoclastes issus de la moelle osseuse de souris	<p>Lamelles de verre coatées avec un matériau composite: verre-biocéramique de différentes compositions chimiques:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Bioverre-céramique</th> <th colspan="3">Composants en % de mol</th> </tr> <tr> <th></th> <th>CaO</th> <th>P₂O₅</th> <th>SiO₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A2</td> <td>54</td> <td>6</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>T2</td> <td>36</td> <td>4</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>S2</td> <td>16</td> <td>4</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	Bioverre-céramique	Composants en % de mol				CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂	A2	54	6	40	T2	36	4	60	S2	16	4	80	<ul style="list-style-type: none"> - l'épaisseur du film pour chaque composition était identique - la surface de A2 et T2 était irrégulière avec des épaisseurs distribuées de façon aléatoire - A2: structure cristalline, S2: structure amorphe, T2 structure intermédiaire - RA supérieure pour A2 et T2 (la valeur n'a pas été donnée) - plus de cellules multinucléées positives pour TRAP ont été retrouvées sur S2 - La morphologie des rings d'actine était identique sur tous les matériaux 	<p>Les propriétés de surface affectent la morphologie des cellules mais pas leur capacité à former des rings d'actine. La rugosité de surface influence la morphologie des cellules et l'expression de TRAP par les cellules, donc l'activité résorbante des cellules.</p>
Bioverre-céramique	Composants en % de mol																							
	CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂																					
A2	54	6	40																					
T2	36	4	60																					
S2	16	4	80																					
Zhang <i>et al</i> , 2005	Culture primaire d'ostéoclastes de rat de 2 ans	<p>Bioverre avec une structure cristalline différente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SG 1100= structure cristalline de composition chimique: Ca₃(PO₄)₂ et CaMg(SiO₃)₂ - SG 900= structure cristalline de composition chimique (CaMg)₃(PO₄)₂ et CaMg(SiO₃)₂ - SG 600 structure partiellement cristalline 	<ul style="list-style-type: none"> - ring d'actine discontinu sur SG 600 - ostéoclastes plus étalés sur SG 600 - les lacunes de résorption avaient une taille similaire sur les 3 matériaux de l'ordre de 20-50 µm - Les concentrations en calcium mesurées dans le milieu de culture de SG 600 étaient supérieures 	<p>Les matériaux avec une plus faible cristallinité se dissolvent plus facilement. La solubilité différente des trois bioverres du fait de leur cristallinité différente se répercute sur une concentration en calcium différente dans l'environnement. Cela n'a eu aucune influence sur l'activité de résorption des cellules puisque le profil des lacunes de résorption était similaire sur les trois bioverres testés</p>																				

Tableau 4 : études bibliographiques de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur l'adhésion des cellules ostéoclastiques

Selon l'étude de Redey, (Redey et al., 1999), l'énergie de surface et principalement la composante polaire influence l'adhésion des ostéoclastes. Les ostéoclastes adhèrent mieux sur des surfaces de faible composante polaire qui correspondent aux biomatériaux d'hydroxyapatite carbonatée. Cependant, dans son étude comparative, Redey utilise trois catégories de matériaux qui diffèrent en terme de composition chimique et de cristallinité, sans parler du fait que des informations sur les caractéristiques de surface des biomatériaux ne sont pas précisées. En effet, le taux de substitution en carbonates ou le taux de porosité ouverte n'est pas précisé. Tous ces paramètres sont susceptibles d'influencer le degré de dissolution des biomatériaux et donc le niveau de calcium et de carbonates libéré dans le milieu et pouvant être critique pour l'adhésion des ostéoclastes. Cette hypothèse peut être consolidée par les travaux de Detsch sur l'activité des ostéoclastes sur du TCP qui relargue beaucoup de calcium, (Detsch et al., 2008).

Le même problème se pose concernant l'étude de Łaczka-Osyczka qui compare des matériaux de composition chimique différente et qui conclut sur le fait que c'est la rugosité de surface et la cristallinité qui ont influencé l'adhésion des ostéoclastes. Plus de cellules multinucléées TRAP positives ont été retrouvées sur le matériau le moins rugueux et de structure la plus amorphe, (Łaczka-Osyczka et al., 1998). Cependant, est-ce que la composition chimique différente ne pourrait pas elle aussi influencer sur l'adhésion des ostéoclastes ?

L'étude de Zhang a conclu sur le fait que des biomatériaux de structure cristalline différente ont un degré de dissolution différente et de ce fait relarguent des concentrations différentes en calcium dans le milieu, (Zhang et al., 2005). Les biomatériaux testés dans son étude ont cependant tous été résorbés par les ostéoclastes. On peut tout de même se demander si un biomatériau amorphe donc supposé très soluble, n'inhiberait pas l'activité des ostéoclastes du fait d'un niveau trop important de calcium relargué dans le milieu, comme mentionné plus haut.

I.2. Biomatériaux et régénération osseuse

Concevoir un biomatériau idéal pour la régénération osseuse est la préoccupation de nombreuses recherches ces dernières années. Il faudrait qu'il soit biorésorbable avec

une cinétique et un taux de résorption adapté tout en stimulant de façon optimale la repousse osseuse. Le biomatériau idéal est donc celui qui répond à tous les critères pour satisfaire les fonctions auxquelles il a été assigné. Il n'existe donc pas de façon exclusive un matériau idéal mais bel et bien des matériaux idéaux. En effet, tout comme le principe de médecine personnalisée très utilisé en cancérologie qui consiste à adapter le traitement à un patient donné pour une pathologie donnée, les matériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse doivent être les plus adaptés possible pour répondre à une fonction spécifique. Un compromis entre toutes les exigences du cahier des charges du matériau idéal doit être envisagé. Quoi qu'il en soit, la connaissance de la pathologie mais aussi des biomatériaux est obligatoire pour réaliser le choix le plus judicieux en toute connaissance de cause, (Giannoudis et al., 2011), (Janicki and Schmidmaier, 2011).

Dans cette partie, seront répertoriées quelques avancées scientifiques en matière d'utilisation des biomatériaux en ingénierie tissulaire osseuse après avoir brièvement rappelé des généralités bien établies sur les matériaux. Dans cette partie, l'accent est essentiellement mis sur les biomatériaux céramiques phosphocalciques qui font l'objet de l'étude suivante.

I.2.1. Les matériaux : définition, catégorie, propriétés chimiques et physiques

Trois grandes classes de matériaux sont communément admises : les céramiques, les polymères, les métaux et leurs alliages, (Fantozzi et al., 2009), ([Annexe 4](#)). Ces matériaux peuvent être divisés en deux groupes : inorganique (céramiques, métaux) et organique (polymères), (Lichte et al., 2011).

L'utilisation des matériaux dans l'industrie de la santé a pris beaucoup d'ampleur ces dernières décennies. Lorsqu'il s'agit d'augmenter l'espérance de vie ou de répondre à des obligations sociales pour favoriser le développement, comme l'amélioration de la qualité de vie, l'expression « biomatériaux » (ou matériaux médicaux) sont utilisées. Il s'agit de matériaux synthétiques ou naturels utilisés pour le remplacement d'une partie du système vivant ou qui fonctionnent en contact intime avec les tissus vivants, (Dorozhkin, 2010a).

L'ingénierie tissulaire osseuse, utilise tous ces matériaux en passant par les matériaux composites : mélanges hétérogènes de deux ou de plusieurs classes de matériaux cités précédemment, (Stevens, 2008), (Bose et al., 2012), (Annexe 5).

1.2.1.1 Les biocéramiques

Les biomatériaux céramiques sont utilisés dans l'industrie de la santé pour la production de dispositifs médicaux variés (e.g. la production des yeux de verres, la fabrication d'instruments de diagnostic, de thermomètres, de fibre optique pour les endoscopes), (Dorozhkin, 2010a). Depuis les années 1970, le champ d'application des biocéramiques s'est largement étendu à la reconstruction et la réparation tissulaire, en particulier du tissu osseux.

1.2.1.1.1. Les biocéramiques de phosphate de calcium

Les biomatériaux à base de phosphate de calcium sont utilisés avec succès en chirurgie cranio-maxillo-faciale, dentaire ou orthopédique. Ils sont d'origine synthétique (obtenus après précipitation aqueuse ou frittage) ou d'origine naturelle (lyophilisés, dans des banques d'os ou dérivés de corail d'hydroxyapatite), (Barrère et al., 2006).

Les céramiques de phosphate de calcium synthétique incluent : l'HA, le β TCP, l' α TCP et les phosphates de calcium biphasique (BCP) (mélange de soit l' α TCP et de l'HA ou du β TCP avec l'HA).

Tous les biomatériaux de phosphate de calcium synthétiques possèdent une composition chimique similaire à la phase minérale de l'os, ils sont biocompatibles et ostéoconducteurs.

Les céramiques de phosphate de calcium synthétiques et naturelles sont classées en fonction de leur structure et de leur composition chimique.

- On peut ainsi distinguer les phosphates de calcium cristallisés ou amorphes. Ainsi, un composé de structure amorphe est défini comme le modèle de la structure parfaitement aléatoire proche de la structure des liquides alors qu'il n'existe pas de véritable structure cristalline dans le microenvironnement biologique. La référence de base pour définir une structure cristalline est la maille cristalline. Dans l'absolu, un composé à structure cristalline serait un composé dans lequel chaque maille serait

empilée parfaitement et de façon répétée en lignes et en colonnes pour former un réseau périodique d'atomes ou de molécules de dimension infinie, (Lee et al., 2010).

- Par contre, la caractérisation de la composition chimique des céramiques de phosphate de calcium prend surtout en compte le rapport molaire Ca/P, (Tableau 5).

Rapport molaire Ca/P	Composé	Formule
0,5	phosphate calcique monohydraté (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	phosphate de calcium anhydre (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$
1	phosphate dicalcique dihydraté (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	phosphate dicalcique anhydre (DCPA)	CaHPO_4
1,33	Phosphate octacalcique (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	phosphate tricalcique alpha (α TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	phosphate tricalcique beta (β TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1-2,2	phosphate de calcium amorphe (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z$ $n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4,5$ avec 15–20% H_2O
1,5-1,67	Hydroxyapatite déficitaire en calcium (DCHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 2$)
1,67	Hydroxyapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,67	Fluoroapatite (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
1,67	Oxyapatite (OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$
2	phosphate tétracalcique (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Tableau 5 : d'après Dorozhkin, 2010b, les différents composés de céramique d' (ortho) phosphate de calcium

La formation des différents types de phosphate de calcium dans un système biologique (ou synthétique) dépend du pH, de la température et de la composition de l'environnement. Ainsi, en fonction du microenvironnement biologique ou des solutions synthétiques, un composé de phosphate de calcium peut se transformer en un autre. L'hydroxyapatite carbonatée est présente dans les tissus calcifiés en condition physiologique (os et dent), mais plusieurs autres types naturels de phosphate de calcium existent dans les tissus au cours de la calcification pathologique, (Tableau 6).

Phosphate de calcium naturel	Localisations, fonctions
phosphate de calcium amorphe (ACP)	Calcification des tissus mous
phosphate dicalcique dihydraté (DCPD)	Tartre dentaire, carie dentaire
Phosphate octocalcique (OCP)	Tartre dentaire, calcul rénal
phosphate tricalcique beta substitué en magnésium (β TCMP)	Calcification des tissus mous, tartre dentaire
Hydroxyapatite carbonatée (CHA)	Phase minérale de l'émail, de la dentine, du ciment, de l'os, écaille des poissons, tartre dentaire, calcul rénal
Fluoroapatite carbonatée (CFA)	Ecaille des poissons, email dentaire
pyrophosphate calcique dihydraté (CPPD)	Articulation

Tableau 6 : d'après LeGeros, 2008, les différents phosphates de calcium retrouvés dans les environnements biologiques

L'HA synthétique stœchiométrique de formule $(Ca_{10}(PO_4)_6OH_2)$ possède une composition chimique proche de la phase minérale de l'os. En effet, 60% de la phase minérale de l'os est composée d'apatites biologiques avec un rapport molaire Ca/P compris entre 1,67-1,70. Implanté dans un fluide biologique, ce matériau produit des cristaux d'apatites qui précipitent en surface et facilitent ainsi l'ostéointégration. Une fois implanté dans l'organisme, ce matériau sert de support pour la régénération osseuse : il est ostéoconducteur. Il est biocompatible : il n'induit pas de réaction immunitaire chez l'hôte. Il n'induit pas de toxicité locale ou systémique. Il est facile à stériliser. Il est facile à mettre en forme par différents procédés céramiques. Compatible avec les techniques d'imagerie de diagnostic, il possède un poids supportable pour les patients implantés, enfants ou adultes. Néanmoins, l'HA possède un faible taux d'ostéointégration à cause d'un faible taux de résorption en milieu biologique. Elle est faiblement soluble dans les fluides acides (pH 4-5) mimant l'environnement durant l'activité des ostéoclastes. L'HA se fissure facilement en raison de sa résistance moyenne à la rupture et de sa faible ténacité, (Carlisle, 1970), (Boyde et al., 1999), (Hench and Polak, 2002), (Stefini et al., 2013).

Des études ont donc été menées pour contribuer à améliorer les capacités de ce matériau : bioactivité, ostéointégration, résorbabilité....

Ainsi, les capacités de l'hydroxyapatite phosphocalcique à accepter au sein de sa structure cristalline, d'autres ions, ont fait d'elle un matériau de choix pour l'étude de l'influence des propriétés chimiques des biomatériaux en ingénierie tissulaire osseuse. Cette propriété lui permet d'être un matériau intéressant pour la régénération osseuse.

En effet, l'HA stœchiométrique appartient à la vaste classe des apatites représentées par la formule suivante : $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$.

Me est un métal divalent (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ...), XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} ...), et Y est un anion monovalent (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , OH^- ...), (Barrère et al., 2006).

Ainsi, pour améliorer les capacités d'ostéointégration, des ions présents naturellement dans la composition minérale de l'os peuvent être ajoutés à l'HA. En effet, l'apatite biologique (comme celle du tissu osseux) n'est pas stœchiométrique et contient plusieurs substitutions d'ions, principalement le carbonate et autres traces d'éléments comme Na^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , Fe^{2+} , F^- , Cl^- . Par conséquent, la formule la plus appropriée pour la composition de l'os selon Tadic *et al* est : $(CA,X)_{10}(PO_4, CO_3,Y)_6(OH,Z)_2$ avec X substitution en cation, Y et Z substitution en anions et les indices 10 et 2 changeant selon la stœchiométrie, (Tadic et al., 2002). Des études ont été consacrées à définir la structure de l'os naturel. Selon Barrère, la structure de l'apatite biologique peut être représentée avec la formule suivante : $Ca_{8.3 \square 1.7}(PO_4)_{4.3}(CO_3)_1(HPO_4)_{0.7}(OH,CO_3)_{0.3 \square 1.7}$ avec \square = lacunes (Barrère et al., 2006). Selon Legros, l'apatite biologique n'est pas de l'hydroxyapatite pure et renferme des éléments à l'état de trace, comme le magnésium (Mg), le sodium (Na), mais l'élément le plus important est le carbonate (CO_3). Des méthodes analytiques comme la technique de diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge et les analyses chimiques ont permis d'étudier la substitution des apatites carbonatées synthétiques et biologiques et d'émettre la conclusion suivante : les apatites biologiques peuvent être considérées comme des hydroxyapatites carbonatées. Leur formule peut être approximée selon la suivante : $(Ca, Na, Mg)(PO_4, HPO_4, CO_3)_6(OH, Cl, F)_2$.

Parmi les ions ajoutés à l'HA pour améliorer ses propriétés biologiques, il est possible de retrouver les ions silicates et carbonate. Les ions silicates sont des ions utilisés car le silicium est connu pour favoriser la calcification osseuse, (Carlisle, 1970). Quant aux ions carbonates, ils sont aussi utilisés car ils peuvent se substituer aux groupes phosphates (substitution de type B) ou aux groupes hydroxydes (substitution de type A). La substitution de type AB est prépondérante dans l'apatite naturelle (4 à 6 % en masse), (Tadic et al., 2002). Les différences de composition chimique affectent en particulier la taille des cristaux et donc la solubilité de l'apatite. Par exemple, la substitution des ions phosphate (PO_4^{3-}) par les ions carbonates (CO_3^{2-}) ou bien la

substitution des ions calcium (Ca^{2+}) par des ions magnésium (Mg^{2+}) ou strontium (Sr^{2+}) diminue la taille des cristaux et augmente la solubilité. A l'inverse la substitution des groupements hydroxydes (OH^-) par les ions Fluor (F^-) augmente la taille des cristaux et diminue la solubilité, (LeGeros, 2008).

A ce matériau est parfois ajouté d'autres macromolécules. Pour exemple, l'ajout de collagène dans l'HA a été identifié comme responsable de l'augmentation des capacités de résorption du matériau, (Scaglione et al., 2012), tout comme l'ajout de β TCP, (Arinze et al., 2005).

1.2.1.2 Les bioverres

Le premier matériau en verre bioactif à avoir été formé est le « 45S5 Bioglass® » ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$). Synthétisé pour la première fois par Hench *et al.*, (Hench et al., 1971), ce matériau en verre qui contient une forte teneur en silicium, est biorésorbable et bioactif. Il a été proposé en 1969 comme une alternative aux matériaux bioinertes conventionnels pour la réparation du tissu osseux, (Baino and Vitale-Brovarone, 2011), (Bose et al., 2012a). Par la suite, de nombreuses autres compositions ont été explorées. D'un point de vue de leur composition chimique, les bioverres peuvent être divisés en trois classes: les bioverres à base de silicium (SiO_2), les bioverres à base de borate (B_2O_3) et les bioverres à base de phosphate (P_2O_5). Pour rendre les bioverres bioactifs, des oxydes de calcium, de potassium, de sodium et de Magnésium (CaO , K_2O , Na_2O et MgO) peuvent être ajoutés à leur composition. Les oxydes de zinc, cuivre argent et titane (ZnO , CuO , AgO , TiO_2) leur confèrent des propriétés antibactériennes. L'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) augmente leur résistance mécanique, (Baino and Vitale-Brovarone, 2011). Par leur teneur en calcium, phosphate et silicium, les bioverres présentent à leur surface une couche d'apatite hydroxycarbonatée qui se forme au contact des fluides SBF (*simulated body fluid*), (Oki et al., 2004), (San Miguel et al., 2010). Cela va favoriser l'intégration de l'implant avec le tissu osseux environnant.

Le silicium peut ainsi être libéré de ces implants pour activer des voies de signalisation de transcription génique pour activer l'ostéogenèse, (Jell and Stevens, 2006). L'ajout de zinc, (Oki et al., 2004), (Balamurugan et al., 2007) et de Magnésium, (Saboori et al., 2009), favoriseraient la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. Le

strontium inhiberait la résorption osseuse et stimulerait l'ostéogenèse, (Canalis et al., 1996).

Les bioverres sont aussi utilisés pour former des matériaux composites. Par exemple, les bioverres associés à la phase cristalline de l'HA possèdent une meilleure rigidité, (Stevens, 2008).

Les bioverres sont utilisés en clinique pour des applications dentaires depuis 1985 et sont commercialisés à travers le monde sous différentes formes aussi bien pour la réparation des tissus durs (os et dents) mais aussi des tissus mous (nerfs). Ces matériaux servent aussi à délivrer des médicaments: des billes de verre contenant des isotopes radioactifs sont utilisées pour le traitement du cancer, (Hench, 1998).

1.2.1.3 Les métaux

Les métaux utilisés sont des aciers inoxydables ou des alliages. Leur application médicale concerne surtout l'arthroplastie. Le métal le plus utilisé est le titane. Il existe le titane de grade 2 (pur) et des alliages de titane: grade 5 (TiA6V4). Des alliages de chrome (Cr) et de Cobalt (Co) sont aussi utilisés. Ces matériaux sont bioinertes mais biotolérés : ils ne libèrent pas d'éléments toxiques pour l'organisme mais n'interagissent pas avec le tissu vivant. Ces métaux possèdent des propriétés intéressantes car ils sont compatibles avec la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ils possèdent une conduction thermique comparable à l'os et ils sont résistants à l'oxydation après avoir subi des traitements de surface. Ils sont biocompatibles, résistants, faciles à façonner et relativement peu coûteux, (Lichte et al., 2011). Lorsqu'un comblement osseux nécessite d'être stable mécaniquement, l'utilisation de métaux est recommandée. C'est le cas pour les applications dentaires (alvéole dentaire artificielle) ou les arthroplasties totales de la hanche. Cependant, l'incapacité du métal à se lier harmonieusement au tissu osseux rend difficile voire impossible une stabilité mécanique de l'implant avec le tissu environnant. Le revêtement de ce dernier avec de la céramique de phosphate de calcium augmente l'ostéointégration de l'implant. Le revêtement permet d'associer une surface biocompatible et bioactive avec la résistance mécanique du corps de l'implant. Le revêtement empêche une éventuelle libération de produit toxique par l'implant ainsi qu'une dégradation rapide de la surface une fois le matériau implanté, (Goriainov et al., 2014), (Kobayashi et al., 2007), (Dorozhkin, 2010a). Cependant, les métaux ne

sont pas flexibles et leur raideur empêche des stimulations mécaniques du matériau, connu pour initier la différenciation ostéoblastique. Son utilisation est donc limitée en particulier aux prothèses articulaires et à la chirurgie de la colonne vertébrale, (Lichte et al., 2011). Ces dernières années, un implant biodégradable d'alliage de magnésium AZ91D a fait l'objet d'attention particulière car il a permis la formation d'os *in vivo* chez le lapin, (Witte et al., 2007).

1.2.1.4 Les polymères

Les polymères sont des matériaux organiques, bioactifs, (Lichte et al., 2011). Les polymères naturels couramment utilisés sont : le collagène, la fibrine, l'alginate, la soie, la chitosane, l'acide hyaluronique, l'agarose, (Cheung et al., 2007).

Les polymères synthétiques utilisés sont l'acide poly lactique (PLA), l'acide poly glycolique (PGA), la polycaprolactone (PCL), le poly propylène fumarate (PPF), le polyéthylène glycol (PEG), le Poly méthyl méthacrylate (PMMA), (Bose et al., 2012).

Les polymères naturels comme le collagène et l'acide hyaluronique induisent une information biologique innée pour guider les cellules. Ils favorisent la réponse chimiotactique et l'attachement des cellules, (Stevens, 2008). Par contre, ces derniers sont des produits rares, peu abondants et peuvent provoquer des réactions inflammatoires ou transmettre des maladies virales. Ils possèdent une faible résistance mécanique et se manipulent difficilement, (Stevens, 2008).

Les polymères synthétiques possèdent l'avantage de pouvoir être synthétisés par de multiples et différents procédés permettant de contrôler leur forme, leur microarchitecture et leur structure en 3D, (Stevens, 2008).

Leur dégradation produit plusieurs monomères évacuables par l'organisme par les voies physiologiques et naturelles. Cependant, la dégradation de certains polymères synthétiques comme les PLA et les PGA peut provoquer un environnement acide néfaste pour le tissu environnant, (Bose et al., 2012). L'utilisation du PLA est néanmoins approuvée par la FDA pour des implantations chez l'humain. L'hydrogel est utilisé pour régénérer le cartilage. Les méthodes d'administration de ce matériau sont moins invasives. Ce matériau s'adapte à son environnement en prenant forme *in situ* une fois administré dans l'organisme, il possède des propriétés viscoélastiques

comme le cartilage naturel (Cheung et al., 2007) et est facile à fonctionnaliser. Il est notamment utilisé pour l'encapsulation de cellules et de médicament.

I.2.1.5 Les matériaux composites

Les matériaux composites sont un mélange de composés organiques et/ou inorganiques. Cela permet de combiner un ensemble de caractéristiques qui se rapprochent de celles de l'os naturel. Dans le contexte de réparation osseuse les composés polymères organiques sont quelques fois associés aux composés inorganiques comme l'hydroxyapatite. Ainsi, les composés inorganiques basiques neutralisent l'acidité des polymères et la dureté des composés inorganiques est associée à l'élasticité des composants organiques polymères.

I.2.2. Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse : de la première à la troisième génération

Hench a décrit 4 types de réponses pouvant être induites par le matériau implanté dans l'organisme (Hench, 1998).

- 1) Si le matériau est toxique, les tissus aux alentours mourront*
- 2) Si le matériau n'est pas toxique mais biologiquement inactif (presque inerte), un tissu fibreux d'épaisseur variable se formera*
- 3) Si le matériau n'est pas toxique et biologiquement actif (bioactif), une liaison se formera à l'interface entre l'os et le matériau.*
- 4) Si le matériau n'est pas toxique et peut se dissoudre (biorésorbable), le tissu environnant le remplacera.*

Dans les années 1960-1970, les premiers matériaux utilisés pour la réparation osseuse, encore appelés matériaux de première génération, étaient qualifiés de bioinertes. L'objectif de ces matériaux, en première intention, était de pallier les déficits mécaniques des tissus osseux altérés avec un minimum d'effets toxiques pour l'organisme. Leur rôle était d'ailleurs de remplacer le tissu osseux.

Les matériaux bioinertes mais biotolérés incluent des métaux (titane et alliage de titane, alliage de chrome et cobalt, acier inoxydable), des polymères synthétiques (Téflon, PEEK: polyétheréthercétone) et quelques céramiques (alumine, zircone, carbone). Ces matériaux ne libèrent pas de produits toxiques pour l'organisme, mais

lorsqu'ils y sont implantés, suscitent une réponse physiologique qui se traduit par la formation d'une couche plus ou moins épaisse de tissu fibreux entre le matériau et le tissu vivant, empêchant ainsi toute interaction positive avec les tissus vivants (LeGeros, 2008; Dorozhkin, 2010a).

De nombreux travaux de recherches ont ensuite porté sur la synthèse des matériaux de deuxième génération dits bioactifs et biorésorbables. Cette propriété du matériau est directement liée à sa composition chimique et sa structure qui permettent un changement au cours du temps des caractéristiques de la surface du matériau implanté dans l'organisme. La régénération tissulaire est favorisée en facilitant l'intégration de l'implant avec le tissu environnant et l'activation de voie de signalisation pour la réparation des tissus, grâce notamment à la libération et la précipitation d'ions (Hench, 1998), (Ducheyne and Qiu, 1999), (Strain and Neuberger, 2002).

- Les matériaux bioactifs peuvent se dissoudre et favoriser la formation d'une couche d'apatite biologique à leur surface permettant l'interaction du tissu et du matériau avec l'os à l'échelle atomique pour former des liaisons chimiques. Cela permet leur parfaite fusion avec l'os. Les matériaux les plus étudiés pour tenter de comprendre ces mécanismes sont les matériaux à base de phosphate de calcium, (Orly et al., 1989), (LeGeros, 2008a) et les bioverres dont l'étude a fait l'objet d'une attention particulière par Larry L. Hench, (Hench, 1998). Les céramiques bioactives sont des céramiques qualifiées de réactives en surface. L'hydroxyapatite (HA), les bioverres ou les matériaux composites : bioverre /HA sont dit bioactifs. Mais les phénomènes observés peuvent s'appliquer à d'autres matériaux. La liaison entre l'os et le matériau artificiel se réalise entre les groupements hydroxydes (OH) de l'apatite de l'os naturel et des groupes fonctionnels du matériau : Si-OH dans le cas des verres biologiques et Ti-OH, Zr-OH, -COOH et $-H_2PO_4$ dans le cas d'autres matériaux. Ces groupes possèdent une structure spécifique qui permet l'exposition de charge négative qui va induire la formation d'apatite à partir de composé de calcium amorphe (silicate de calcium, titanate de calcium et phosphate de calcium amorphe (CPA), (Hench, 1998).

- Les matériaux biorésorbables quant à eux se dissoudront pour permettre au tissu néoformé de croître en surface du matériau sans pour autant interagir directement avec le tissu néoformé, (Dorozhkin, 2010a). Le phosphate tricalcique (TCP) a longtemps été qualifié de céramique résorbable. De nombreuses polémiques tendent à le qualifier de céramique dissolvable mais non résorbable.

Ces matériaux qualifiés de deuxième génération ont vu le jour au milieu des années 1980 et sont surtout utilisés pour des applications dentaires et en orthopédie, (Hench and Polak, 2002). Comme indiqué ci-dessus, ce sont principalement des biocéramiques.

Ces biomatériaux peuvent se retrouver sous des formes aussi variées que du ciment, des granules, de la poudre... pour servir au simple revêtement d'une surface ou constituer le corps d'un implant. Leur vaste champ d'utilisation couvre les applications dentaires, l'orthopédie, l'arthroplastie, la neurochirurgie, la chirurgie maxillo-faciale.

Enfin, l'objectif ultime de recherches actuelles est de réaliser des implants de troisième génération en ingénierie des tissus osseux. Ces implants posséderaient toutes les propriétés de l'os naturel. Ce seraient des implants biomimétiques. C'est-à-dire, selon Giannoudis, qu'ils serviraient de support macroporeux en 3 dimensions pour la repousse osseuse. Ils seraient capables de stimuler pleinement la repousse osseuse puisqu'ils combindraient un biomatériau support (scaffold) avec des facteurs de croissance (biomatériau fonctionnalisé ostéoinducteur) et / ou des cellules ostéogéniques (biomatériau hybride). Les facteurs de croissance les plus prisés, car déjà utilisés en clinique sont les BMP et principalement les BMP2 et BMP7. Les cellules ostéogéniques ciblées seraient les cellules souches mésenchymateuses, (Janicki and Schmidmaier, 2011). Ces cellules sont multipotentes* et capables de se différencier en cellules osseuses. Cependant, il souligne quelques aspects importants à prendre en compte, pour lesquels il n'existe pas véritablement de réponses à ce jour. Quel type de cellules souches mésenchymateuses utiliser et à quelle concentration ? Quel facteur de croissance serait le plus adapté et à quelle concentration ? Pourrait-on utiliser un cocktail de facteurs de croissance et comment les agencer ?..... (Giannoudis et al., 2007), (Giannoudis et al., 2008). Un autre aspect non négligeable à prendre en compte dans le contexte de médecine régénérative est le contrôle de la dégradation complète du biomatériau support. Dans le cadre de la médecine régénérative, l'implant/matériau doit servir de support pour favoriser la repousse osseuse avant de disparaître de façon contrôlée dans le temps pour permettre une transition de masse/charge en douceur. Ceci doit se faire sans libérer de produits toxiques dans l'organisme. Dans le meilleur des cas, les produits libérés par les matériaux doivent servir à stimuler la repousse osseuse. Les aspects mécaniques ainsi que les caractéristiques biologiques et génétiques de chaque individu peuvent également

influencer cette repousse osseuse. Néanmoins, le matériau support étant destiné à disparaître, ce sont davantage les aspects métaboliques que mécaniques du tissu osseux qui sont primordiaux à prendre en compte dans le cadre de la médecine osseuse régénérative. La synthèse d'un matériau qui permet la régénération de l'os de façon optimale nécessite de connaître le métabolisme osseux.

Un dernier aspect, non des moindres est le caractère économique de la stratégie à adopter.

Dans l'attente de mise au point de toutes ces étapes, des travaux se concentrent également sur la façon d'améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux supports à l'échelle de leur composition chimique et de leur microstructure.

1.2.2.1 Composition chimique des céramiques de phosphate de calcium

Le matériau de référence utilisé couramment en clinique pour la substitution et le comblement osseux, est l'hydroxyapatite phosphocalcique ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Cependant, dans le contexte de la médecine régénérative, les recherches actuelles tendent à synthétiser un biomatériau avec de meilleures capacités de biorésorption, c'est-à-dire de dégradation par les ostéoclastes. En jouant sur la composition chimique et la microstructure des biomatériaux, des études ont montré qu'il est possible d'améliorer les qualités non seulement de biorésorption des biomatériaux, mais aussi de biocompatibilité (viabilité et survie des cellules) et d'ostéoconduction (adhésion, prolifération et différenciation cellulaire). Deux substitutions ioniques dans l'HA apparaissent potentiellement intéressantes : celle d'ions silicates et celle d'ions carbonates.

1.2.2.1.1. Substitution en ions silicates dans l'hydroxyapatite

1.2.2.1.1.1. L'intérêt du silicium

Malgré son abondance en géologie (le silicium est le huitième élément le plus abondant du système solaire et constitue 27,7 % massique de la couche terrestre), le silicium est très peu retrouvé en biologie (<0,01% massique dans l'os humain, 5-20 μM dans le plasma). Le silicium semblerait intervenir dans la formation du tissu osseux. Carlisle, Schwarz et Milne sont les pionniers à s'être intéressés au rôle joué par le

silicium dans le développement et en particulier le développement osseux des embryons de poulet et des rats. En 1970, Carlisle a mis en évidence que le silicium contribuait à l'initiation de la minéralisation du tissu osseux néoformé, (Carlisle, 1970). Deux autres de ses études publiées en 1972 et 1980, sur des coqs et des poulets nourris avec un régime carencé ou supplémenté en silicium, ont permis de démontrer le rôle clé joué par le silicium, dans le développement osseux et en particulier le développement osseux enchondrale. Des différences morphologiques mais aussi biochimiques ont été observées. Les os des coqs dont la nourriture était carencée en silicium étaient moins longs et moins de cartilage articulaire avait été formé. La zone proliférative articulaire présentait des lésions et les cellules cartilagineuses possédaient une forme plus aplatie. La matrice extracellulaire était également plus pâle. Par contre, plus d'eau, plus de collagène et une zone cartilagineuse proliférative plus abondante et bien ordonnée ont été observés dans les os de coqs nourris avec un régime supplémenté en acide orthosilicique, (Carlisle, 1972), (Carlisle, 1980), (Carlisle, 1970), (Carlisle, 1972). Cet effet du silicium sur les os plats du crâne a été démontré comme propre au silicium et indépendant de l'effet de la vitamine D, (Carlisle, 1981). Schwarz, un autre pionnier dans l'étude du silicium sur la croissance osseuse, a réalisé son étude sur des rats dont l'alimentation était minutieusement contrôlée dans des pièces confinées pour éviter toute contamination avec les éléments de l'atmosphère. L'alimentation des rats a été supplémentée avec du silicium sous forme de sodium métasilicate en solution aqueuse : $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. 50 mg de silicium pour 100g de nourriture a produit une augmentation significative de la croissance (du poids) des rats de 33,8% par rapport au groupe contrôle non traité, (Schwarz and Milne, 1972).

Carlisle fut le premier à démontrer l'action bénéfique du silicium non seulement dans la minéralisation osseuse mais aussi dans la synthèse de collagène, composant principal de la matrice organique du tissu osseux. En 2003, l'étude de Reffitt et en 2007, l'étude de Jugdaohsingh, ont confirmé la conclusion de Carlisle en énonçant que le silicium intervient également dans la formation de la matrice osseuse organique (synthèse de collagène de type I). La synthèse de collagène de type I et sa sécrétion dans la matrice dépendent de modifications post-traductionnelles qui interviennent dans l'hydroxylation des résidus prolyl. Cette réaction est réalisée par les enzymes prolyl hydroxylases qui sont sensibles à l'effet du silicium de façon dose dépendante, (Carlisle, 1980), (Reffitt et al., 2003), (Jugdaohsingh, 2007).

1.2.2.1.1.2. Biodisponibilité du silicium

La principale source d'apport en silicium pour l'Homme est la nourriture, mais sa biodisponibilité n'est pas bien connue, (Jugdaohsingh et al., 2002). Au 21^{ème} siècle, ce sont surtout les premiers travaux de Jugdaohsingh qui ont permis de comprendre le rôle du silicium dans le métabolisme humain. La forme biodisponible du silicium est l'acide orthosilicique Si(OH)_4 . Le silicium sous cette forme est retrouvé dans les fluides, en particulier la bière, (Bellia et al., 1994), (Sripanyakorn et al., 2004), mais également dans la nourriture solide. Il se retrouve sous cette forme principalement dans un environnement à pH 9 et lorsque le silicium est inférieur à 2 mM. Le silicium dans la nourriture solide n'est disponible que sous forme polymérique et sous forme de silice phytolytique. Ce n'est que dans le tractus intestinal que cette forme est réduite en acide orthosilicique Si(OH)_4 , (Jugdaohsingh et al., 2002). La libération par les urines de Si, est un bon marqueur de l'absorption de ce dernier, en corrélation avec l'apport alimentaire de Si. Il pourrait exister une compétition entre la silice et le calcium qui possèdent la même voie d'absorption, (Jugdaohsingh, 2007). L'acide orthosilicique est métabolisé différemment en fonction des individus. L'étude clinique de Jugdaohsingh a démontré que les hommes absorbent plus de silicium que les femmes et l'absorption diminue chez les individus avec l'âge, (Jugdaohsingh et al., 2002). C'est ainsi que le silicium directement ingéré par voie orale est utilisé en tant que molécule thérapeutique pour lutter contre l'ostéoporose en augmentant la densité minérale osseuse, (Jugdaohsingh et al., 2004). Il a d'ailleurs été observé un effet bénéfique supérieur du silicium sur la densité minérale osseuse comparé à celui du fluor et du magnésium, (Eisinger and Clairet, 1993).

1.2.2.1.1.3. Substitution en ions silicates dans l'HA

C'est à partir des années 1990 que des groupes de recherche se sont intéressés à synthétiser des biomatériaux à base de silicium afin de répondre aux exigences de l'ingénierie tissulaire osseuse et ainsi promouvoir la régénération osseuse. Gibson a synthétisé des hydroxyapatites par précipitation aqueuse, (Gibson et al., 1999), Langstaff a mis au point la synthèse d'hydroxyapatite silicatée par le traitement à haute température du précipité, (Langstaff et al., 1999). Palard a démontré que la synthèse par précipitation aqueuse d'hydroxyapatite silicatée $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ peut être réalisée de façon efficiente avec $0 < x < 2$. Par contre, les analyses de diffraction

aux rayons X et de spectroscopie infrarouge ont démontré la présence de phase secondaire, (α TCP, β TCP), ainsi que l'excès d'ions silicates non incorporé dans la maille cristalline apatite formant de la silice vitreuse qui est détectée, lorsque $x > 1$. Des travaux sur la caractérisation des hydroxyapatites silicatées en spectroscopie infrarouge ont aussi fait l'objet de publications, (Marchat et al., 2013).

Néanmoins, le silicium comme on le retrouve dans les biomatériaux substitués en silicium, à savoir la silice ou les ions silicates, n'est pas sous sa forme biodisponible. Des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* de biomatériaux silicatés ont été réalisées en masse. Le tableau ci-dessous, (Tableau 7), résume les résultats obtenus dans différentes études.

Réf	Evaluations biologiques	Matériaux	Résultats	Conclusions émises par l'auteur
Porter et al, 2003	Expérience <i>in vivo</i> : incorporation de granules dans le fémur de moutons de 2-3 ans	Granules d'HA Granules de SIHA 1,5% massique Granules de SIHA 0,8% massique	<ul style="list-style-type: none"> - La DRX a confirmé une phase unique et pure pour tous les biomatériaux - Les granules HA et SIHA possédaient une densité de 96-67% - Le MEB a confirmé une morphologie similaire pour toutes les granules - Plus de dissolution a été observée pour SIHA 1,5% massique > sur SIHA 0,8% massique et enfin > sur HA - La DRX a révélé la présence de phase secondaire sur SIHA x=0,6 et x=0,8 et x=1. Seules les pastilles SIHA x=0,2; 0,4 et 0,6 ont été utilisées pour les analyses biologiques - La densité cellulaire était la même sur tous les biomatériaux comparés - La morphologie des cellules était identique sur tous les biomatériaux - Une bonne adhésion cellulaire a été observée sur tous les matériaux 	Le silicium a augmenté la solubilité de l'HA. L'incorporation des ions silicates dans la microstructure de HA a augmenté sa bioreactivité en accroissant le nombre de défauts dans sa structure (plus de dislocations des joints de grains).
Palard et al, 2009	Etudes <i>in vitro</i> avec des cellules humaines ostéoblastiques (MG63)	Pastilles polies miroir - d'HA - de SIHA x=0,2 - de SIHA x=0,4 - de SIHA x=0,6 - de SIHA x=0,8 - de SIHA x=1	<ul style="list-style-type: none"> - Meilleure infiltration cellulaire (ostéoblastes et cellules résorbantes) sur les implants SIHA 0,8% massique et 1,5% massique - pénétration capillaire au centre des implants SIHA 0,8 et 1,5% massique - Volume d'os néoformé sur SIHA 0,8% massique plus important sur SIHA 0,8% massique 	Les ions silicates ont diminué la taille des grains des matériaux Les ions silicates n'ont pas d'influence sur l'adhésion cellulaire
Hing et al, 2006	Expérience <i>in vivo</i> : implantation dans le condyle fémoral de lapin (Notch of New Zealand)	Implant macroporeux d'HA Implant macroporeux de SIHA à - 0,2% massique - 0,4% massique - 0,8% massique - 1,5% massique	<ul style="list-style-type: none"> - Meilleure adhésion des cellules sur HA coaté avec 6 mM d'ions silicate car plus d'expression de plaque de vinculine a été observée. 	La réparation osseuse est favorisée par l'ajout d'ions silicates dans la structure HA. La réponse optimale est observée pour une substitution 0,8% massique. Son action est valable aussi bien sur la formation osseuse que sur l'activité des cellules osseuses résorbantes.
Kalla et al, 2016	Expérience d'adhésion <i>in vitro</i> avec des cellules ostéoblastiques humaine	- HA - HA coaté avec 6 mM d'ions silicates - HA coaté avec 42 mM d'ions silicates	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la différenciation après traitement avec 10 et 20 µM d'acide orthosilicique (augmentation de l'expression protéique et génique de l'ALP, du collagène de type I et de l'ostéocalcine). - Un traitement à 50 µM diminue par contre la synthèse de collagène I par les cellules 	La conclusion sur le rôle directement joué par le silicium est en suspens car il pourrait y avoir un effet indirect associé préférentiellement au changement de la structure de surface du fait du revêtement : augmentation de la rugosité et du caractère hydrophobe de la surface
Reffitt et al, 2013	Etudes <i>in vitro</i> de La différenciation des ostéoblastes humains (MG-63 et HCC1)	Aucun substrat biomatérial n'a été utilisé. Des solutions à 10, 20 et 50 µM d'acide orthosilicique ont directement été ajoutées dans le milieu de culture.	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la différenciation après traitement avec 10 et 20 µM d'acide orthosilicique (augmentation de l'expression protéique et génique de l'ALP, du collagène de type I et de l'ostéocalcine). - Un traitement à 50 µM diminue par contre la synthèse de collagène I par les cellules 	Le silicium sous sa forme biodisponible d'acide orthosilicique agit de façon bénéfique sur la différenciation des ostéoblastes mais de façon dose dépendante.
Schütze et al, 1995	Culture primaire d'ostéoclastes aviaire	Pas de biomatériaux mais ajout de 100 µg/mL de Zéolite A dans le milieu de culture (La zéolite est un composé d'alumine de silice avec une structure en cage et agissant comme catalyseur dans de nombreux procédés chimiques)	<ul style="list-style-type: none"> - diminution du nombre de lacunes de résorption de trois fois par rapport au contrôle non traité - diminution de l'expression de cathepsine B de trois fois par rapport au contrôle non traité 	C'est surtout la structure du composé qui inhibe la résorption osseuse car les composants de la molécule (dioxyde de silicium et chlorure d'aluminium) n'inhibent pas l'activité de résorption
Friederichs et al, 2015	Culture primaire d'ostéoclastes humains	Pastilles - d'HA - de SIHA (0,5 % massique) - de SIHA (1,2 % massique) - Solution de silicate de 0,005-500 µM	<ul style="list-style-type: none"> - la solution de silicate inférieure à 500 µM n'a pas stimulé le métabolisme cellulaire par contre à 500 µM elle a inhibé l'activité de résorption - des rings d'actine plus petits et plus épais semblables à ceux retrouvés sur l'os ont été observés sur SIHA - A 14 jours moins d'ostéoclastes avaient adhéré sur SIHA (1,2% massique) - dépendant à 21 jours, le volume des lacunes de résorption sur ce matériau SIHA 1,2% massique était plus important - le nombre d'ostéoclastes sur HA et SIHA (0,5% et 1,2% massique) était identique après 21 jours 	<ul style="list-style-type: none"> - L'incorporation d'ions silicates dans les mailles d'HA induit des changements structuraux et pourrait expliquer le retard de l'activité ostéoclastique sur SIHA (1,2% massique). - Les rings d'actines plus petits et plus épais sur SIHA s'expliquent par rapport à la différence de l'énergie de surface et de la solubilité de SIHA par rapport à HA. - L'augmentation de la solubilité de SIHA libère du silicium qui retarde la différenciation des ostéoclastes mais améliore l'activité de résorption

Tableau 7 : résultats des évaluations biologiques réalisées sur des biomatériaux contenant des ions silicates

Il existe des conclusions différentes sur l'effet biologique du silicium. Certains scientifiques vantent les bienfaits du silicium, d'autres, bien que reconnaissant le caractère non toxique des céramiques substituées en ions silicates, n'y trouvent pas de meilleures propriétés biologiques par rapport aux céramiques de phosphate de calcium pur. La revue critique de Bohner émet l'idée que les travaux prônant les propriétés biologiques supérieures des biomatériaux substitués en ions silicates n'ont aucun fondement, car la libération en ions silicates ne l'est pas en quantité thérapeutique et ne peut pas être liée directement aux observations biologiques observées, (Bohner, 2009). Cela pourrait être lié à un effet de microstructure. Ainsi, l'étude de Palard, (Palard et al., 2009), n'a pas montré de preuve des propriétés biologiques supérieures des biomatériaux SiHA comparées aux biomatériaux HA contrairement aux résultats de l'étude de Hing, (Hing et al., 2006). l'étude de Palard a démontré que l'incorporation d'ions silicates dans la structure de l'apatite peut facilement provoquer la formation de phase secondaire en fonction de la dose incorporée, (Palard et al., 2008), (Palard et al., 2009). Cette phase secondaire peut changer la chimie de surface et donc la réponse biologique. Les conclusions de certaines études aboutissent à un effet indirect des ions silicates qui agirait en augmentant la solubilité ou en changeant la structure de surface de l'HA (augmentation de la rugosité par exemple ou des défauts de surface au niveau des joints de grains), (Kalia et al., 2016), (Porter et al., 2003). L'étude de Schütze a d'ailleurs émis l'hypothèse que c'est « la structure en cage » de la molécule de zéolite A utilisée qui a inhibé l'activité de résorption des ostéoclastes et non le fait qu'elle contenait du silicium, (Schütze et al., 1995). C'est ainsi que des études se sont intéressées à utiliser des solutions d'ions silicates directement au contact des cellules pour enlever le biais dû aux changements de surface et garder l'effet direct de la molécule. De ces études un fait commun est ressorti. Le silicium agit de façon dose dépendante sur les cellules, ostéoblastes et ostéoclastes. 50 μM de solution d'acide orthosilicique inhibe la synthèse du collagène de type I par les ostéoblastes alors que 10 et 20 μM l'augmentent. Des solutions d'acide orthosilicique de concentrations inférieures à 500 μM n'influencent pas le métabolisme des ostéoclastes alors que des solutions supérieures à 500 μM inhibent leur activité de résorption, (Friederichs et al., 2015), (Reffitt et al., 2003). De nombreuses interrogations restent toutefois sans réponse alors que certaines affirmations sont réfutées concernant le rôle exact joué par le silicium dans le mécanisme de réparation osseuse. Cela est dû à un manque de

caractérisation des biomatériaux. Cela peut également être dû à des études réalisées dans des conditions non-comparables : type cellulaire testé différent, matériaux comparés ayant des porosités différentes, (Bohner, 2009).

1.2.2.1.2. Substitution en ions carbonates dans l'hydroxyapatite

Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse, la substitution de l'HA avec des ions carbonates est en train d'émerger car sa composition chimique est celle qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os naturel. Les apatites osseuses naturelles contiennent des ions carbonates en quantité significative, d'environ 3 à 8 % massique, (Lafon et al., 2008). L'hydroxyapatite peut être substituée en ions carbonates à la place des ions hydroxydes ou phosphates. L'hydroxyapatite carbonatée est alors respectivement appelée, type A ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$) ou type B ($\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$) ou bien elle peut être mixte de type A/B ($\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$) avec y substitution en site A à la place de OH et x substitution en site B à la place de PO_4 . L'hydroxyapatite de type A peut être obtenue en frittant l'HA dans une atmosphère en CO_2 exempt d'eau. L'apatite carbonatée de type B s'obtient directement lors de la synthèse par un procédé de précipitation aqueuse avec une substitution préférentielle des ions phosphates, (Tadic et al., 2002), (Lafon et al., 2008), (Merry et al., 1998). Lorsque l'hydroxyapatite de type B est frittée en atmosphère humide et sous CO_2 une substitution des ions hydroxydes peut se produire. Une apatite de type A/B est alors obtenue, (Lafon et al., 2008).

Les taux de carbonate auxquels ces deux processus sont susceptibles de conduire dépendent du temps et de la température de frittage, (Barralet et al., 2000), (Lafon et al., 2008). Les apatites carbonatées de type A s'obtiennent sous flux de CO_2 entre 800 et 1000°C. Bonel a obtenu du CHA de type A en traitant de l'HA pendant 5 jours à 900°C sous atmosphère de CO_2 sèche, (Bonel, 1972).

La plus grande capacité à se dissoudre des CHA a été montrée dans plusieurs études.

- La dissolution de matériaux denses d'HA, d'hydroxyapatite carbonatée de type B (CHA) substituée à 3,2% massique et de β TCP implanté en sous cutané chez le rat Wistar a été évaluée par la perte de masse. Le β TCP était le plus

soluble, suivi de l'hydroxyapatite carbonatée et enfin de l'Hydroxyapatite, (Barralet et al., 2000)

- La dissolution en milieu acide d'HA et d'hydroxyapatite carbonatée (CHA) de même surface spécifique est plus rapide pour CHA prouvant que pour une même surface exposée aux fluides biologiques, la présence d'ions carbonates dans la maille de l'HA déstabilise la structure, (Doi et al., 1998).

Toutes ces caractéristiques font de l'hydroxyapatite carbonatée un candidat très prisé pour la régénération osseuse. Reste cependant à déterminer le rôle véritablement joué par la substitution en ions carbonates dans le processus de régénération osseuse. Le tableau 8, résume les résultats de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* (Tableau 8).

Réf	Evaluations biologiques	Matériaux	Résultats	Conclusions émises par l'auteur
Barralet <i>et al</i> , 2000	Expérience <i>in vivo</i> : implantation en sous cutané chez des rats Wistar	Pastilles polies de : - Hydroxyapatite carbonatée de type B substituée à 3,2% massique de CO ₃ (CHA) - Hydroxyapatite (HA) - β TCP	- Densité >97% pour tous les biomatériaux - Taille de grains de 1 μ m pour tous les biomatériaux - Perte de masse plus importante pour β TCP suivi de CHA et enfin HA - La surface était lisse sur HA mais des creux étaient visibles sur CHA et β TCP - Seulement des fibroblastes ont été observés sur les implants. Aucun ostéoclaste n'a été observé - Le tissu fibreux observé sur β TCP était plus épais et augmentait au cours du temps alors qu'il diminuait sur HA - Aucune tendance claire n'est apparue dans le nombre de cellules retrouvées dans les différents implants - La DRX a révélé la présence de phase secondaire sur CHA à 5,82 % massique - Une rugosité plus importante est apparue avec des concentrations croissantes en carbonates - La mouillabilité (valeur de l'angle de contact) a diminué avec des concentrations croissantes en carbonates (la surface est devenue de plus en plus hydrophobe). - Densité cellulaire plus importante sur CHA à 5,82 % massique - La différenciation était plus faible sur CHA à 5,82 % massique - Plus de VEGF-A a été exprimé par les cellules sur CHA à 5,82 % massique	Les trois matériaux sont dissolubles : β TCP, CHA, HA, mais aucune différence en terme de densité cellulaire n'a été observée
Adams <i>et al</i> , 2014	Etude <i>in vitro</i> sur la différenciation avec des cellules humaines ostéoblastiques (MG63) en fonction du taux de substitution en carbonate	Pastilles - d'HA stœchiométrique - de CHA à 3,88 % massique de CO ₃ - de CHA 4,85 % massique de CO ₃ - de CHA à 5,82 % massique de CO ₃	- L'adhésion cellulaire avait augmenté avec des concentrations croissantes en carbonates jusqu'à 6,9 % massique mais l'adhésion avait diminué pour les concentrations supérieures à 6,9 % massique - La prolifération cellulaire était plus importante sur CHA à 11,61 % massique	L'auteur ne s'est pas prononcé quand au classement d'un biomatériau par rapport à un autre. Il émet la conclusion qu'une concentration optimale en carbonate dépend du résultat biologique attendu
Peters <i>et al</i> , 2010	Expérience <i>in vitro</i> sur l'adhésion avec des pré-ostéoblastes de souris (MC3T3-E1)	Pastilles - d'HA stœchiométrique - de CHA de type B - à 3,45 % massique de CO ₃ - à 5,22 % massique de CO ₃ - à 6,90 % massique de CO ₃ - à 11,61 % massique de CO ₃ - à 16,09 % massique de CO ₃ - (Les pastilles ont été pré traitées pendant une nuit dans le milieu de culture)	- CHA à 2,5 % massique: 92% densification et CHA à 5 % massique de CO ₃ : 95 % massique - Surface spécifique après frittage de CHA 2,5 % massique de CO ₃ : 4,6 m ² /g et CHA 5 % massique: 3,8 m ² /g. - La présence de CaO a été observée sur les pastilles frittées 1160°C-3h - Même en présence de LIF (facteur inhibiteur de leucémie, qui maintient les cellules indifférenciées), des cellules différenciées Oct4 positives sont apparues sur CHA 2,5 et 5 % massique de CO ₃ - CHA 2,5 % massique de CO ₃ plus soluble que HA dans le tampon d'acétate de potassium - CHA 5 % massique de CO ₃ moins soluble que HA dans le tampon - Aucune différence significative en terme de densité cellulaire sur les matériaux n'a été observée - Plus de cellules mortes ont été observées sur CHA 2,5 et 5 % massique de CO ₃ par rapport aux cellules sur le contrôle interne (la gélatine). Le taux restait néanmoins négligeable	L'augmentation de la teneur en ions carbonates dans le biomatériau change la cristallinité et les charges en surface du biomatériau et induit probablement un changement de la composition chimique des cristaux formés en surface. Cela influence la composition et la conformation 3D des protéines adsorbées en surface et donc l'adhésion cellulaire. Des apatites carbonatées à haute teneur en ions carbonates sont des candidates possibles pour la régénération osseuse.
Méville <i>et al</i> , 2006	Expérience d'adhésion <i>in vitro</i> avec des cellules souches d'embryons de souris	Pastilles polies de - CHA de type B à 2,5 % massique de CO ₃ - CHA de type B à 5 % massique de CO ₃ Gélatine (contrôle interne)	CHA libère des ions carbonates dans le milieu pour favoriser l'adhésion puis la prolifération cellulaire. Les ions CHA jouent aussi un rôle dans l'induction de la mort cellulaire de façon concentration indépendante. CHA favorise la différenciation des cellules souches embryonnaires même en présence du facteur LIF. CHA est adaptée pour des applications qui nécessitent la différenciation des cellules	
Detsch <i>et al</i> , 2010	Lignée cellulaire de monocytes/macrophages RAW 264,7	hydroxyapatite carbonatée nanocristalline à 0,5 ; 1,2 ; 2,4 % massique de CO ₃	Moins de lacunes de résorption ont été observées sur les matériaux avec une concentration croissante en ions carbonates	Une augmentation en ions carbonates inhibe la différenciation des RAW 264,7 en ostéoclastes.
Spence <i>et al</i> , 2010	Culture primaire d'ostéoclastes humains	Pastilles - HA stœchiométrique - CHA de type A/B à 1,45; 1,71; 1,96; 2,35 % massique de CO ₃	Les CHA à concentration croissante en carbonates avaient moins de cellules adhérentes à leur surface mais les lacunes de résorption étaient plus grosses (les cellules se sont probablement détachées après avoir résorbé le matériau) - Les lacunes de résorption étaient plus profondes sur CHA à 2,35% massique de CO ₃	Contrôler le taux de carbonate est une façon de contrôler le taux de résorption

Tableau 8 : résultats des évaluations biologiques réalisées sur des biomatériaux contenant des ions carbonates.

Au bilan, la combinaison de plusieurs paramètres variables d'une expérimentation à l'autre tels que la porosité, la topographie... empêche de conclure sur le rôle de la composition chimique. De même, la non utilisation d'une hydroxyapatite pure et monophasée exempte d'ajout de sel comme le sodium, lors d'études comparatives, ne permet pas de conclure facilement sur le rôle précis des ions carbonates dans les implants, (Lafon et al., 2008). De plus, le site de substitution et le pourcentage massique en ions carbonates substitués les plus favorables à la régénération osseuse ne sont pour l'instant pas précisément déterminés dans la littérature.

I.3. Conclusion

Les biocéramiques peuvent être préparées à partir d'alumine, de zircone, du carbone, des composés contenant de la silice et du calcium, ainsi que d'autres produits chimiques. Toutefois, ce sont les biomatériaux et biocéramiques à base d'ortho phosphate de calcium qui sont maintenant les plus utilisés pour un grand nombre d'applications différentes et particulièrement pour la régénération osseuse. En effet, les 2/3 du tissu osseux consistent en une partie minérale, à des états de vieillissement différents, constituée de cristaux de phase apatitique phosphocalcique polysubstituée et non-stœchiométrique (Lichte et al., 2011). Le phosphate de calcium tricalcique (TCP) et l'hydroxyapatite sont déjà très utilisés en clinique. Améliorer les propriétés biologiques de ces biomatériaux en jouant sur la composition chimique et la microstructure est une stratégie très prisée.

La substitution en ions silicates dans la maille de l'apatite s'est avérée une piste intéressante à envisager car le rôle du silicium a été reconnu dans l'étape de minéralisation osseuse. D'ailleurs, le silicium est administré par voie orale pour la prévention de l'ostéoporose, (Jugdaohsingh et al., 2004).

La substitution en ions carbonates dans l'apatite s'est avérée une autre piste intéressante à envisager car elle permettrait de mimer au mieux l'os naturel. En effet, ces ions sont présents dans l'hydroxyapatite de la phase minérale osseuse. En outre, dans l'optique d'augmenter la biorésorption des biomatériaux pour répondre aux exigences de la médecine régénérative – le biomatériau doit disparaître pour laisser la place au tissu osseux néoformé –, les ions carbonates se sont présentés comme des candidats intéressants pour augmenter le caractère soluble et la biorésorption de l'HA.

C'est pourquoi, la synthèse d'hydroxyapatite silicatée et d'hydroxyapatite carbonatée a été et fait encore l'objet d'étude par différents groupes de recherche.

Des études biologiques ont également été réalisées sur différents biomatériaux phosphocalciques avec différents types de cellules afin de valider l'efficacité de ces biomatériaux. Cette grande variété d'expériences réalisées, ces méthodes d'analyses multiples, ces nombreux procédés de synthèse...ne permettent toutefois pas des analyses en conditions comparables et donc l'émission de conclusions sur le rôle

précis de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur l'activité cellulaire osseuse.

De ces différentes études, se dégage néanmoins, l'influence indubitable des ions silicates et carbonate de façon concentration dépendante sur l'activité cellulaire.

Des analyses en conditions comparables sont nécessaires pour pouvoir distinguer l'influence de la composition chimique et de la microstructure de biomatériaux sur l'activité cellulaire afin de savoir plus précisément si une substitution et / ou une microstructure donnée serait plus favorable à la régénération osseuse.

C'est dans cette optique que les travaux de recherche suivants ont été réalisés.

Par un procédé de précipitation aqueuse, 6 variantes de biocéramiques de phosphate de calcium ont été synthétisées et rigoureusement caractérisées afin d'être évaluées en culture cellulaire par les deux types de cellules intervenant dans le processus de régénération osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes.

Les détails sur l'obtention des biomatériaux et sur la réalisation des évaluations biologiques sont donnés dans les chapitres suivants.

Chapitre II

Les biomatériaux céramiques de phosphate de calcium : de la synthèse à la caractérisation physico-chimique

Chapitre II. Les biomatériaux céramiques de phosphate de calcium : de la synthèse à la caractérisation physico-chimique

II.1.1. Synthèse par précipitation en voie aqueuse

Les procédés de synthèse de biomatériaux phosphocalciques font l'objet de nombreux travaux de recherche dans la littérature.

La méthode la plus couramment utilisée pour la synthèse de poudre de phosphate de calcium est la précipitation en voie aqueuse. C'est celle qui a été utilisée pour la synthèse des matériaux pour ce travail de thèse. Cette méthode consiste à utiliser un réacteur ([Figure 17](#)) pour rajouter une solution aqueuse de phosphate (enrichie ou non en silicium ou en carbonate) dans une solution de calcium à un débit, une température et un pH contrôlés. Les solutions sont mises à maturer sous agitation pendant une durée déterminée. La solution est ensuite récupérée dans des bocaux, centrifugée et le précipité mis dans une étuve à 100 °C toute une nuit (protocole détaillé ci-dessous).

3 compositions chimiques de matériaux ont été synthétisées :

-l'hydroxyapatite stœchiométrique, HA : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

-l'hydroxyapatite silicatée, SiHA : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$

-l'hydroxyapatite carbonatée de type B, CHA : $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,5}$

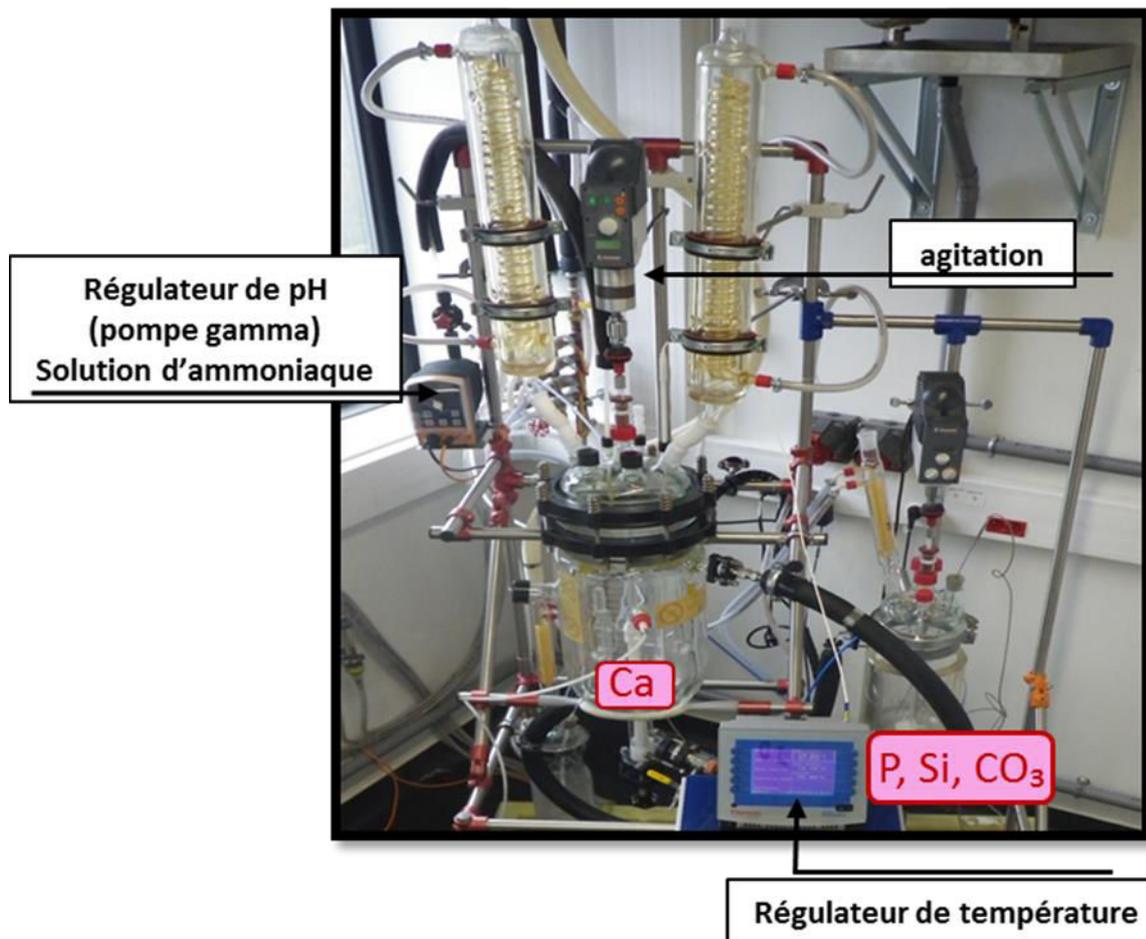


Figure 17 : photographie du réacteur utilisé pour les synthèses au laboratoire SPCTS.

II.1.1.1 Synthèse d'hydroxyapatite stœchiométrique (HA)

Sur la base des travaux de recherche de Raynaud *et al* (Raynaud et al., 2002), une solution de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ de pureté 99% (sigma aldrich) de concentration 0,19 mol/L a été ajoutée à une solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2,4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,32 mol/L pour avoir un rapport stœchiométrique final $\text{Ca}/\text{P}=1,667$. Le débit d'addition a été contrôlé (10mL/min). Le mélange est resté sous agitation à 120 rotations par minute (rpm) pendant 15 min, à 90°C. Le pH a été maintenu à 9 par l'ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4,OH , sigma aldrich) à l'aide d'une pompe gamma (pompe gamma/L, ProMinent). La synthèse s'est faite sous balayage d'argon à 0,5 L/min pour éviter la carbonatation. Après les 15 min de maturation, le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100°C durant 12 heures.

II.1.1.2 Synthèse d'hydroxyapatite silicatée (SiHA)

La synthèse d'hydroxyapatite silicatée a été réalisée sur la base des travaux de recherche de M. Palard, (Palard et al., 2008). Une solution de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma–Aldrich, pureté : 99%) à 0,60 mol/L et de silicium $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ à 0,04 mol/L (Sigma–Aldrich, pureté : 98%) a été ajoutée dans la solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,64 mol/L pour avoir une substitution hypothétique en silicium $x=0,4$ mol soit 1,13% massique. La solution de silicium a préalablement été homogénéisée dans un broyeur planétaire (Pulvérisette 6, Fritsch). 13,800 g de poudre ont été mélangés à 100 mL d'eau distillée dans une jarre en alumine de 250 mL contenant 4 billes de broyage en alumine de diamètre 15 mm. La solution a été homogénéisée dans le broyeur planétaire pendant 1 min à 150 rpm. Ce mélange a ensuite été ajouté à la solution de phosphate et complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 1,2 L. Ce mélange de solution de phosphate et de silicium a été ajouté à la solution de calcium avec un débit d'écoulement maintenu à 10 mL/min. La solution a mûri sous agitation à 120 rpm pendant 15 min à 90 °C sous un débit d'argon 0,5 L/min. Une solution d'hydroxyde d'ammonium a été ajoutée par impulsion à l'aide d'une pompe gamma (pompe gamma/L, ProMinent) pour maintenir le pH à 9. Après les 15 min de maturation, le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100 °C durant 12 heures.

II.1.1.3 Synthèse d'hydroxyapatite carbonatée (CHA)

La synthèse d'hydroxyapatite carbonatée a été réalisée selon le protocole établi par JM Lafon (Lafon et al., 2008). Une solution aqueuse de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,53 mol/L et de carbonate $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,07 mol/L a été ajoutée à la solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,53 mol/L. Le pH de la réaction a été maintenu à 9 par l'addition d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). La température a été contrôlée et maintenue à 90 °C et le pH à 9 grâce à l'ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium. La réaction a été réalisée sous flux d'argon (0,5 mL/min) pour éviter la carbonatation incontrôlée de l'apatite par dissolution de gaz

CO₂. Le mélange réactionnel a été agité pendant 30 min, 120 rpm. Le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100 °C durant 12 heures.

Trois lots de poudres ont été synthétisés. La valeur en ions carbonates étant du même ordre de grandeur pour les trois lots d'échantillons, ces lots ont été mélangés au turbula toute une nuit. Un mélange unique des 3 lots de poudres ont été utilisés pour s'assurer d'avoir suffisamment de poudre pour réaliser l'ensemble des expériences biologiques en conditions comparables.

II.1.1.4 Caractérisation des poudres

Le précipité séché a été broyé à l'aide d'un mortier. La poudre CHA, a été calcinée à 400 °C-2h sous air pour éviter la décarbonatation qui peut se produire dès 600 °C (Lafon, 2004). Par contre, un aliquot des poudres HA et SiHA, a été calciné à 1000 °C-15 h sous air selon le standard de la norme ISO 13779-3 :2008 ⁽¹⁾ dans un four super Khantal pour vérifier la pureté des phases.

La pureté des poudres calcinées a été vérifiée selon les spécifications du standard ISO 13779-3:2008 par diffraction des rayons X (DRX) pour contrôler l'absence de phase cristalline secondaire β ou α TCP ou bien d'oxyde de calcium (CaO). La DRX a été réalisée en utilisant les radiations K α du cuivre (CuK α) sur un diffractomètre D 5000 (Figure 18) avec un pas de 0,020 °C, un temps de pause de 4 s à température ambiante sur une plage de 30-39 °C. L'identification des phases cristallines a été faite avec le logiciel EVA en comparant les pics de diffraction avec les références des fiches ICDD-PDF (*International Centre for diffraction Data-Powder Diffraction Files*) (Tableau 9). Aucune phase secondaire cristallisée n'a été détectée sur les poudres calcinées, (Figure 18), quelle que soit la composition.

¹ « ISO 13779-3:2008 - Implants for surgery -- Hydroxyapatite -- Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity », ISO. [En ligne]. Disponible sur: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=40828. [Consulté le: 23-juin-2016]

Nature du composé	N° de fiche PDF
Apatite (hydroxyapatite) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9-0432
β TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	55-0898
α TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348(29-0359)
Chaux (oxyde de calcium) : CaO	37-1497
Calcite : CaCO_3	47-1743

Tableau 9 : références des fiches PDF ICDD-PDF (*International Centre for diffraction Data-Powder Diffraction Files*)

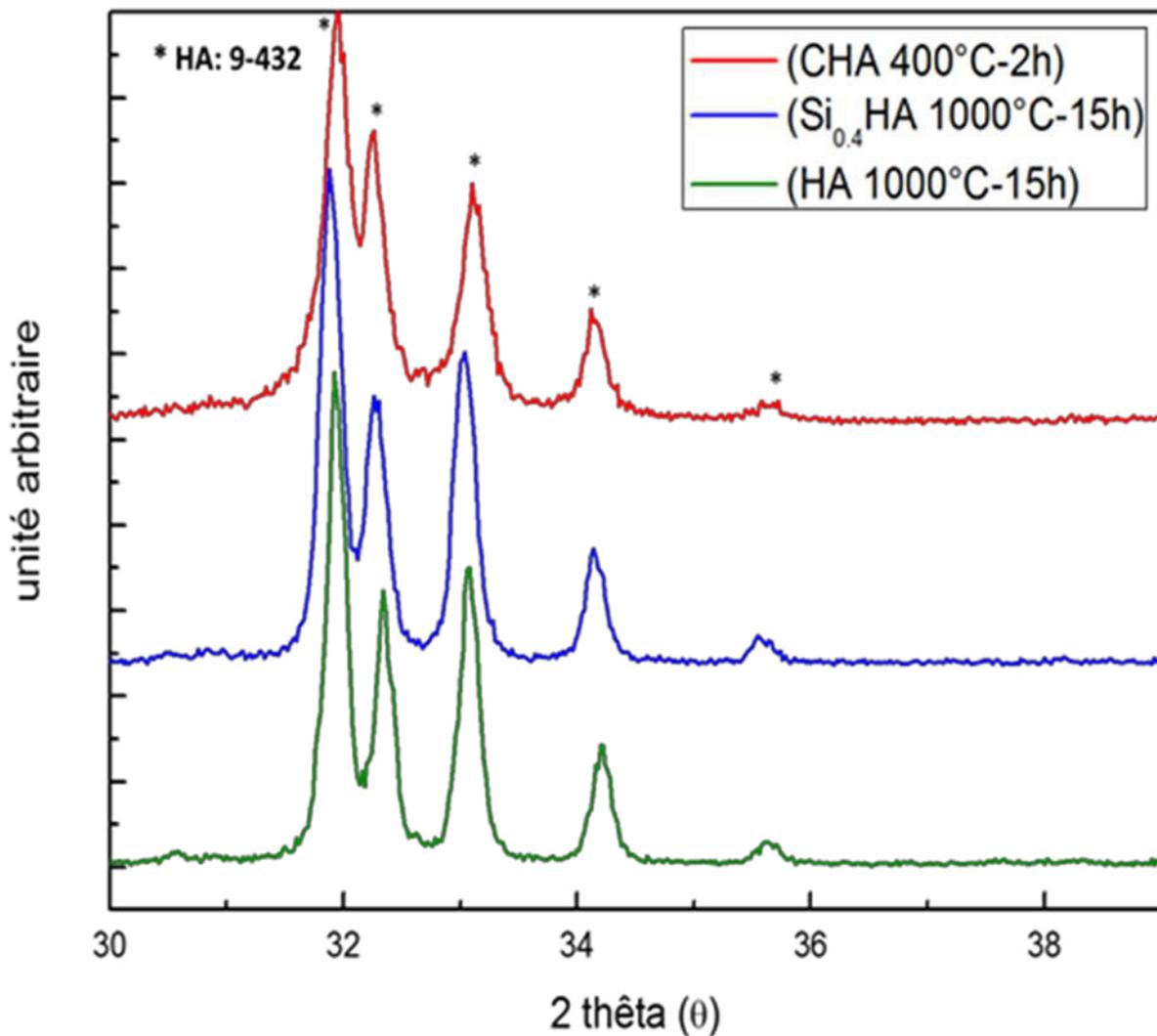


Figure 18 : diffractogramme des poudres calcinées

L'environnement ionique, donc la substitution en ions au sein de la structure apatitique a été vérifiée par la technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum One. Un blanc a tout d'abord été réalisé sur une pastille de KBr réalisée par pressage uniaxial. La poudre mélangée au

KBr mise en forme de pastille par pressage uniaxial, a ensuite été analysée. Les spectres ont été réalisés en transmission sur une région de 4000–400 cm^{-1} avec 32 cycles et une résolution de 4 cm^{-1} . Les spectres ont montré les bandes vibrationnelles typiques de l'apatite pour chacune des trois compositions chimiques des poudres calcinées (Tableau 10), mais aussi des bandes correspondant aux substitutions ioniques en silicate (Marchat et al., 2013), (Tableau 11) et carbonate, (Rey et al., 2011), (Tableau 12), dans la structure apatitique respectivement pour les poudres calcinées de SiHA et CHA, prouvant la bonne incorporation de ces ions (Figure 19). Concernant les spectres IRTF des poudres SiHA, aucune bande vibrationnelle aux alentours des 800 cm^{-1} n'a été détectée. Cela a prouvé l'absence de silice vitreuse dans l'apatite et donc, la bonne incorporation d'ions silicates dans la structure de l'apatite, (Marchat et al., 2013). Pour les poudres CHA, l'assignation de groupes carbonate, montre que ceux-ci sont localisés dans les sites B de l'apatite. Ce résultat est conforme avec les études précédentes effectuées au laboratoire, (Lafon, 2004).

Bandes d'absorbances communes aux biomatériaux HA, SiHA et CHA (cm^{-1})	Mode
474	$\nu_2\text{PO}_4$
570	$\nu_4\text{PO}_4$
602	$\nu_4\text{PO}_4$
632	$\nu_{\text{L}}\text{OH}$
961	$\nu_1\text{PO}_4$
1043	$\nu_3\text{PO}_4$
1090	$\nu_3\text{PO}_4$
1640	$\delta\text{H}_2\text{O}$ adsorbée
3000-3700	$\nu\text{H}_2\text{O}$ adsorbée
3573	$\nu_{\text{s}}(\text{OH})$

Tableau 10 : bandes d'absorbances communes aux biomatériaux HA, SiHA et CHA selon (Marchat et al., 2013)

Bandes d'absorbance spécifiques de SiHA (cm ⁻¹)	Mode
504	SiO ₄
522	SiO ₄
752	SiO ₄
40	SiO ₄ ou Si-OH
90	SiO ₄
928	SiO ₄
945	SiO ₄ ou Si-OH
984	SiO ₄ ou Si-OH

Tableau 11 : bandes d'absorbances spécifiques des biomatériaux SiHA selon (Marchat et al., 2013)

Substitutions	Type A (nombre d'onde cm ⁻¹)	Type B (nombre d'onde cm ⁻¹)
v ₃ CO ₃	1542	1462
	1465	1412
v ₂ CO ₃	883	872
v ₄ CO ₃	757	718
	670	692

Tableau 12 : bandes vibrationnelles des groupements carbonates dans l'HA selon (Rey et al., 2011)

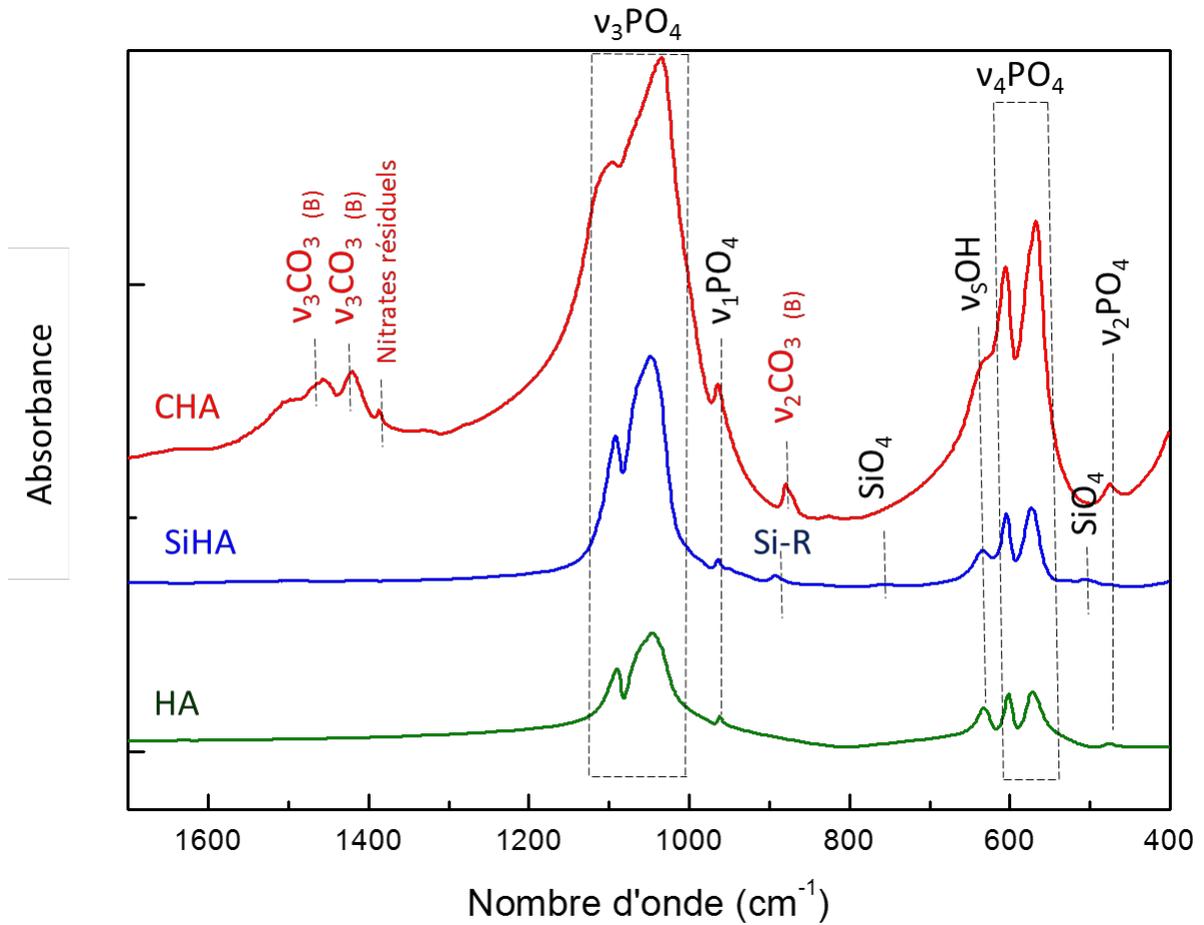
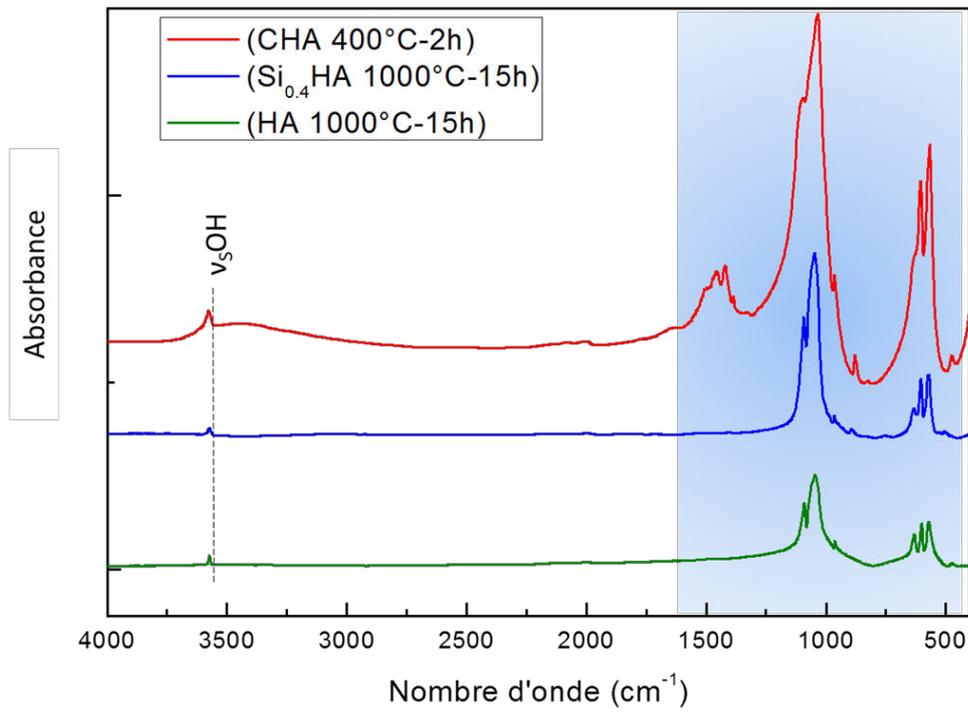


Figure 19 : spectres IRTF des poudres calcinées

Des analyses en couplage par plasma induit par spectrométrie d'émission optique ICP/OES (*Inductively Coupled Plasma/ Optical Emission Spectrometry*) ont été réalisées sur un lot de poudre SiHA pour vérifier la teneur en silicium. 0,1 g de poudre, préalablement calcinée, a été dissoute dans un mélange de 4 mL d'acide nitrique et 10 mL d'acide fluoridrique dilué au 1/20. Trois mesures de l'échantillon ont été réalisées. Les résultats ont été obtenus à l'aide d'une courbe étalon préparée avec des solutions de silicium de concentrations connues de 0 à 50 ppm. Une valeur de $x=0,42\pm 0,01$ mol a été calculée et a donné la formule chimique de SiHA:



Concernant la poudre calcinée CHA, la teneur en ions carbonates a été déterminée à l'aide d'analyse élémentaire carbone (HORIBA EMIA) (Tableau 13). L'appareil a été calibré avec des échantillons standards de concentrations connues en carbone. Ensuite, 1 g de poudre a été placé dans un creuset avec un mélange d'étain, de cuivre et de fer, puis chauffé, pour permettre la combustion totale de l'échantillon en présence d'oxygène. Les résultats sont récupérés par le logiciel EMIA. Le logiciel informe de la teneur en carbone (%). Ainsi grâce à la formule :

$$\% \text{CO}_3 \text{ massique} = \% \text{C massique} \times \frac{M\text{CO}_3}{MC}$$

Avec M= masse molaire

il a été possible de remonter à la valeur en pourcentage massique d'ions carbonates (%CO₃. massique).

Comme indiqué précédemment après synthèse, les spectres infrarouges n'ont révélé que des substitutions en carbonates de type B. C'est ainsi que la valeur du x dans le cas d'une apatite de type B : Ca_{10-x}(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)_{2-x} a pu être calculée grâce à la formule :

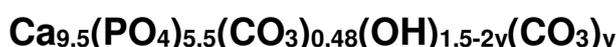
$$x = \frac{Mx}{MC} \times \frac{\%C}{100}$$

Où Mx est la masse molaire de l'apatite carbonatée de type B soit :

$$Mx = [(Mca \times (10 - x)) + (MPO_4 \times (6 - x)) + x \times MCO_3 + (MOH \times (2 - x))]$$

$$\leftrightarrow x = \frac{1004 \times \%C}{1200 + 152 \times \%C}$$

Les résultats obtenus ont permis de remonter à la formule brute de la poudre CHA calcinée à 400 °C-2 h sous air :



ainsi qu'à la valeur en carbonate massique (% CO₃ massique) et en mol (x) dans les trois lots de poudres synthétisés (Tableau 13) :

Matériaux	%C	%CO ₃ massique	x
Poudre CHA n=1	0,621±0,001	3,105±0,003	0,482±0,001
Poudre CHA n=2	0,637±0,002	3,187±0,005	0,493±0,001
Poudre CHA n=3	0,582±0,004	2,91±0,02	0,454±0,003
Moyenne	0,61±0,02	3,07±0,08	0,476±0,01

Tableau 13 : résultats de l'analyse carbone réalisée sur les poudres CHA calcinées 400 °C-2h sous air.

Trois lots de poudres indépendantes ont été analysés. Les résultats pour chaque lot représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

II.1.1.5 Mise en forme et frittage des céramiques

Les poudres ont été calcinées sous air, respectivement à 650 °C-30 min pour HA stœchiométrique, 700 °C-2h pour SiHA et 400 °C-2h pour CHA. Cela, afin d'obtenir une surface spécifique d'environ une trentaine de m²/g pour faciliter la mise en forme de pastille par pressage. La surface spécifique de la poudre calcinée a été vérifiée par la Méthode BET-8 points (Tableau 14). 1 g de poudre a été mis à dégazer 1 h à 200 °C. Après quoi les mesures ont été réalisées sous azote.

Composition	Paramètres de calcination	Surface spécifique (m ² /g)
SiHA	700 °C-2h	30,6
HA	650 °C-30 min	28,6
CHA n= 1	400 °C-2h	37,5
CHA n= 2	400 °C-2h	31,8

Tableau 14 : surface spécifique des poudres calcinées

La poudre calcinée a été mise en forme par pressage uniaxial dans une matrice cylindrique. Les poudres ont été pressées à 125 MPa pour HA et SiHA et 62 MPa pour CHA. Les pastilles obtenues ont été frittées pour obtenir pour chaque composition chimique une microstructure dense et poreuse. Pour les 2 céramiques HA et SiHA, le frittage des pastilles a été réalisé sous air, par contre, le frittage des pastilles CHA a été réalisé dans un four sous flux de CO₂ (145 mL/min), pour éviter la décarbonatation. Les paramètres de frittages des pastilles HA et SiHA ont été choisis sur la base de travaux de recherche précédents, effectués au laboratoire, (Champion, 2013) (Tableau 14). Pour les pastilles carbonatées, les paramètres de frittage ont été obtenus à la suite d'expériences de dilatométrie (NETZSCH DIL 402 C). Les pastilles ont été mises à chauffer sous flux de CO₂ de 20 mL/min avec une vitesse de montée en température de 10 °C/min (Figure 20).

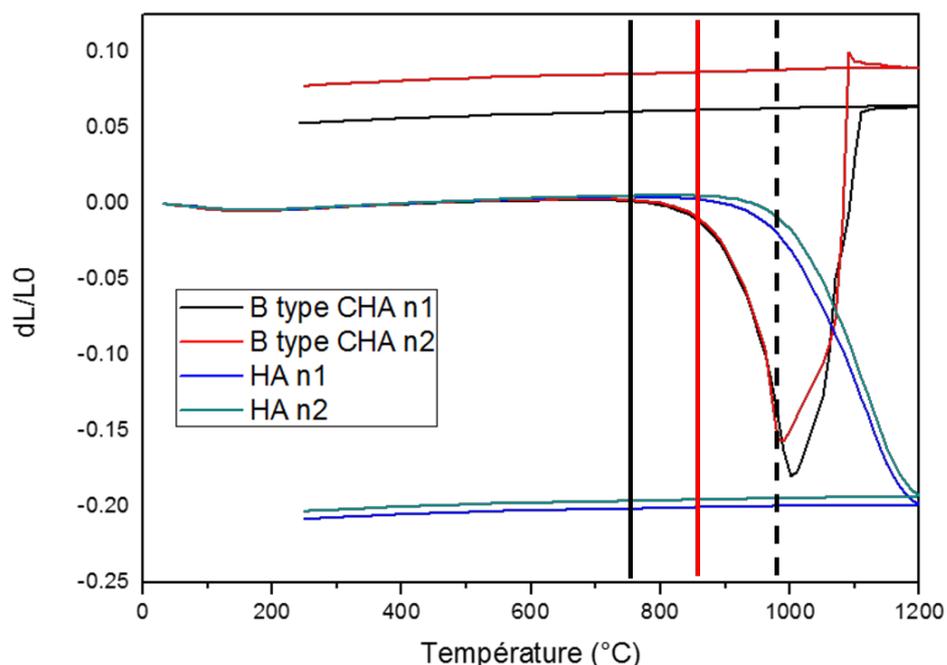


Figure 20 : courbes de dilatométrie des pastilles CHA et HA

Il a été constaté, à partir des courbes de dilatométrie, que les pastilles HA commencent à fritter plus tardivement, à des températures avoisinant les 850 °C (ligne verticale rouge), alors que les pastilles CHA commencent à fritter à des températures avoisinant les 750 °C (ligne verticale noire). Par contre, à des températures proches de 1000 °C (ligne verticale noire en pointillés), les pastilles carbonatées commencent à se décarbonater en libérant du CO₂, ce qui stoppe la densification et se traduit par une expansion brutale de l'échantillon. Cela s'est visualisé entre autre, par l'apparition de renflement à la surface des pastilles. Ainsi, en jouant sur le temps de frittage et en se basant sur ces analyses dilatométriques, un cycle de 2 h à 960 °C et de 30 min à 935 °C a été retenu pour le frittage des CHA denses et des CHA poreuses respectivement (Tableau 15). Les cycles de frittage pour les matériaux poreux ont été choisis pour obtenir un taux de porosité similaire d'environ 25-30% pour les trois compositions.

Composition	Température (°C)	Durée (h)	Rampe (°C/min)
HA dense	1200	0,5	20
HA poreux	1000	0,5	20
SiHA dense	1240	0,5	20
SiHA poreux	1160	0,5	20
CHA dense*	960	2	10
CHA poreux*	935	0,5	10

Tableau 15 : paramètre de frittage des 6 variantes de biomatériaux.

* (Le frittage des pastilles CHA a été réalisé dans un four à flux de CO₂ (145 mL/min) pour éviter la décarbonatation).

II.1.2. Caractérisations des pastilles frittées

Après la synthèse des poudres, la calcination, la mise en forme et le frittage, la pureté des phases et les substitutions ioniques des pastilles frittées ont été analysées par DRX et IRTF. Ensuite, ces pastilles frittées ont été caractérisées par un ensemble de tests, afin d'évaluer leur porosité, la taille des grains, la distribution et la taille des pores, les charges de surface, le caractère hydrophobe ou hydrophile, la topographie et la surface spécifique des pastilles (Figure 21).

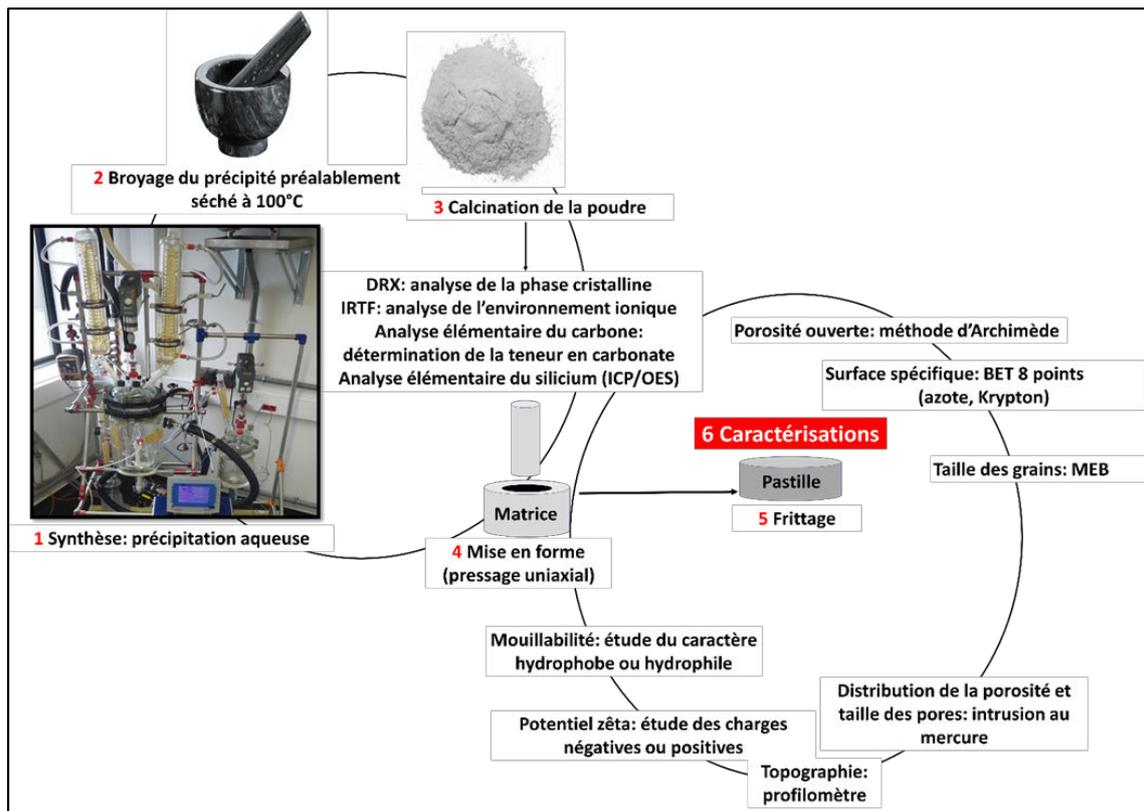


Figure 21 : ensemble des caractérisations physico-chimiques réalisées sur les 6 variantes de biomatériaux frittés

II.1.2.1 Composition chimique des pastilles

II.1.2.1.1. Résultats DRX et IRTF des pastilles frittées

Des diagrammes DRX réalisés avec un diffractomètre D8 advance Bruker (Figure 22) et des spectres IRTF (Perkin Elmer) ont été réalisés sur chaque composante de biomatériaux après frittage pour vérifier respectivement la pureté de phase et l'environnement ionique après frittage (Figure 22, Figure 23). Les diagrammes DRX n'ont révélé aucune phase secondaire α ou β TCP, ni de chaux (CaO) ou de calcite en particulier pour CHA qui serait la preuve d'une décarbonatation (Figure 22). En plus des bandes vibrationnelles communes à tous les biomatériaux CHA, HA et SiHA, les spectres des SiHA ont révélé la présence de bandes vibrationnelles spécifiques des SiHA (Tableau 11). Les spectres IFTR des pastilles CHA ont révélé l'apparition de bandes vibrationnelles à 883 cm^{-1} et 1542 cm^{-1} correspondant à la carbonatation en site A (Rey et al., 2011), (Figure 23, Tableau 12).

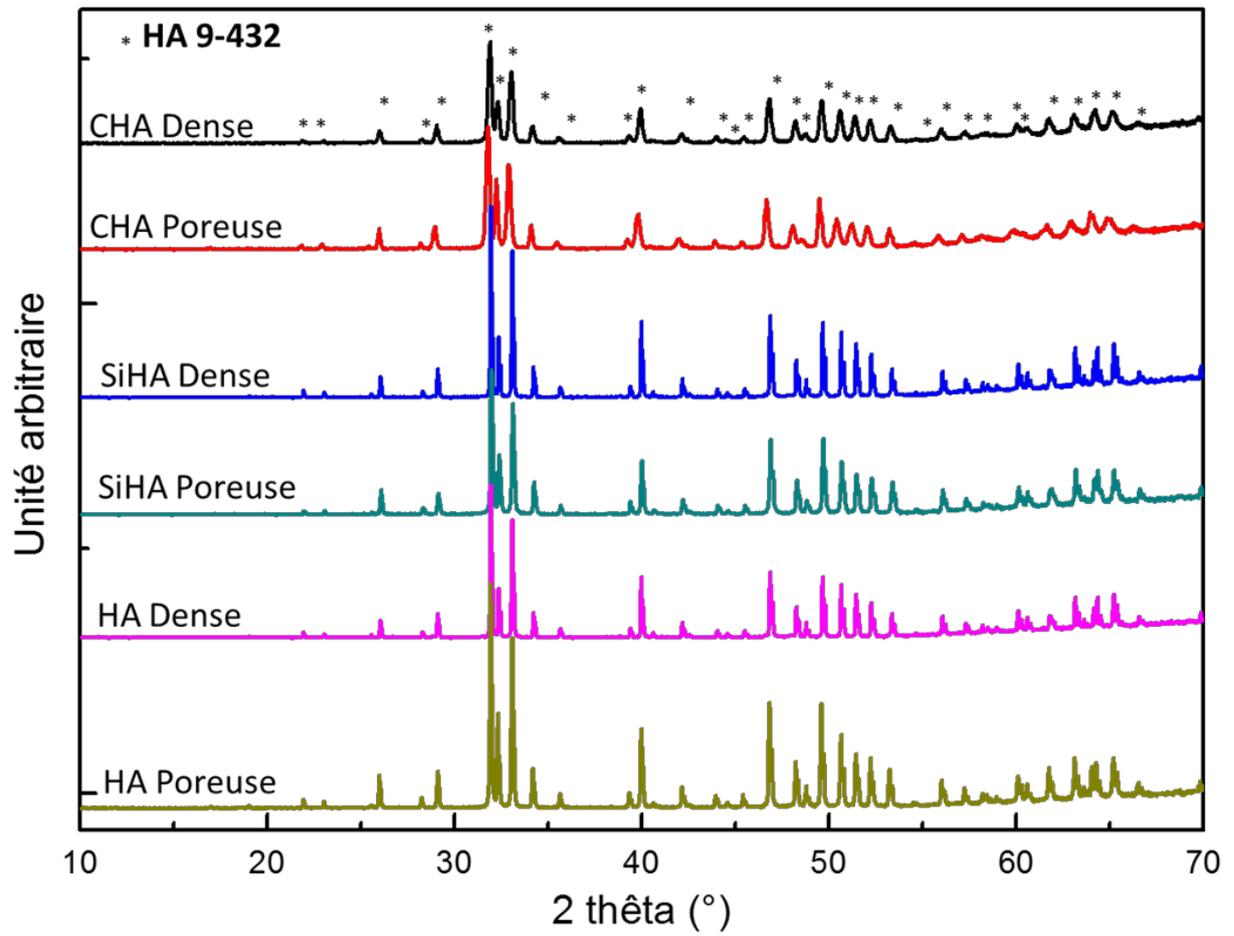


Figure 22 : diffractogrammes des pastilles frittées

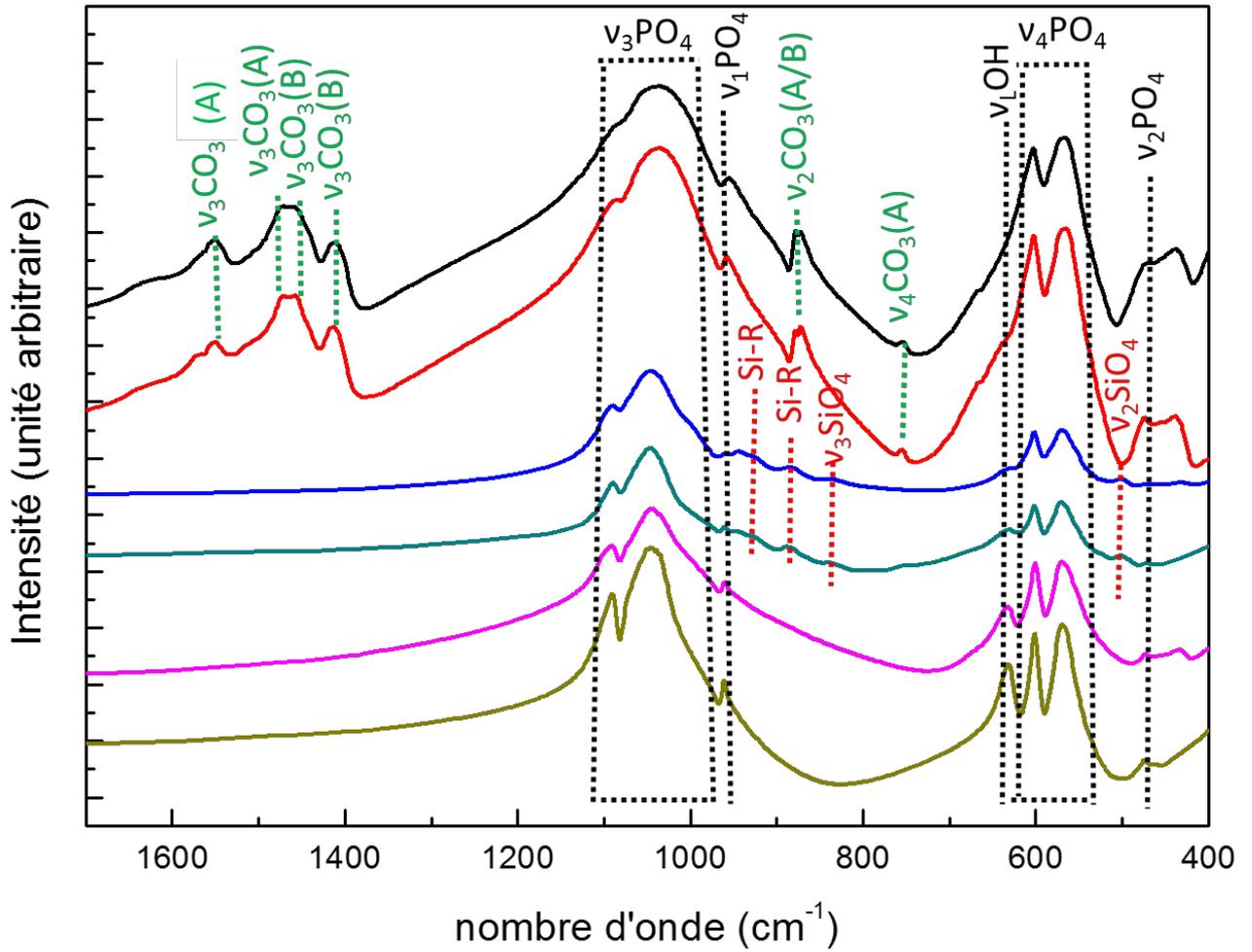
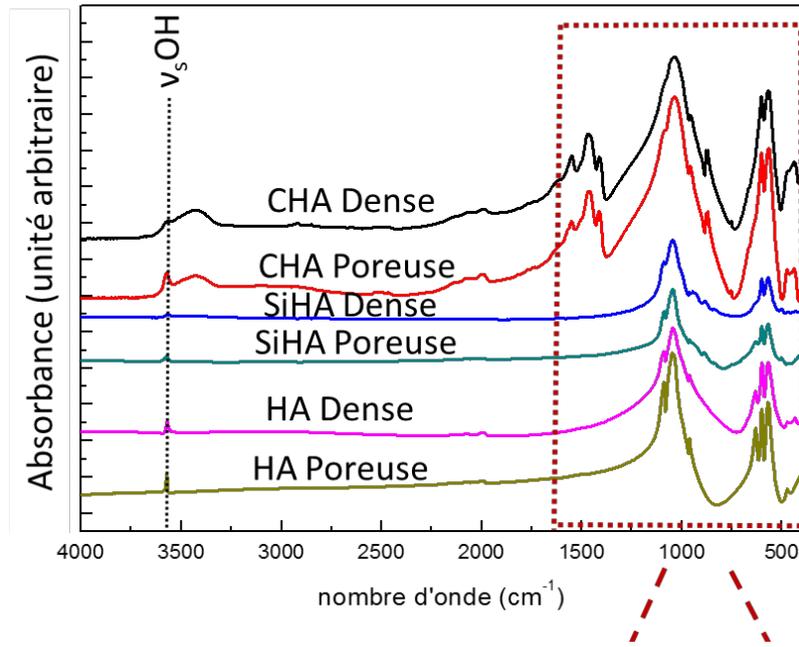


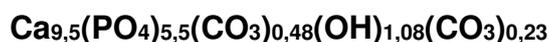
Figure 23 : spectre IRTF des pastilles frittées

II.1.2.1.2. Analyse carbone

Les pastilles CHA frittées ont donc été broyées et l'analyse élémentaire carbone a été réalisée sur les poudres obtenues, afin de vérifier le taux de substitution en carbonates après frittage sous flux de CO₂.

Alors qu'avant le frittage, les poudres CHA étaient uniquement de type B, c'est-à-dire substituées au niveau du groupe phosphate (PO₄), une apatite carbonatée mixte de type A/B a été obtenue après frittage, c'est-à-dire substituée au niveau du groupe OH (type A) et PO₄ (type B), (Lafon et al., 2008). La quantité totale de carbonates dans l'apatite frittée mesurée par analyse élémentaire était de 4,43±0,03 % massique. Elle était seulement égale à 3 wt.% dans les poudres calcinées de type B. L'augmentation en carbonate après le frittage est due à la carbonatation des sites A, apparaissant durant l'étape de frittage sous flux de CO₂ selon la réaction d'échange : $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2+y}CO_2(g) = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2y}(CO_3)_y + yH_2O(g)$, (Lafon et al., 2008) (Tableau 16).

Les analyses ont permis de remonter à la formule chimique des pastilles CHA frittées :



Matériaux	%C	%CO ₃ massique	x+y	y
CHA dense	0,882±0,003	4,413±0,018	0,707±0,003	0,707-0,48=0,227
CHA poreux	0,886±0,006	4,430±0,031	0,710±0,005	0,710-0,48=0,23

Tableau 16 : pourcentage en carbone (%C), en pourcentage massique d'ions carbonates (Wt.%CO₃), et la valeur du x+y pour chaque microstructure de biomatériaux carbonatés (dense et poreuse).

Les résultats représentent la moyenne de 3 mesures indépendantes sur 3 pastilles différentes ± SD.

II.1.2.2 Microstructure

II.1.2.2.1. Observation MEB

Les pastilles frittées ont été métallisées avec 2-3 nm d'or. Puis elles ont été observées avec un microscope électronique à balayage (SEM/FEG JEOL JSM 7400F). Les images ont été prises à basse tension (3 KV).

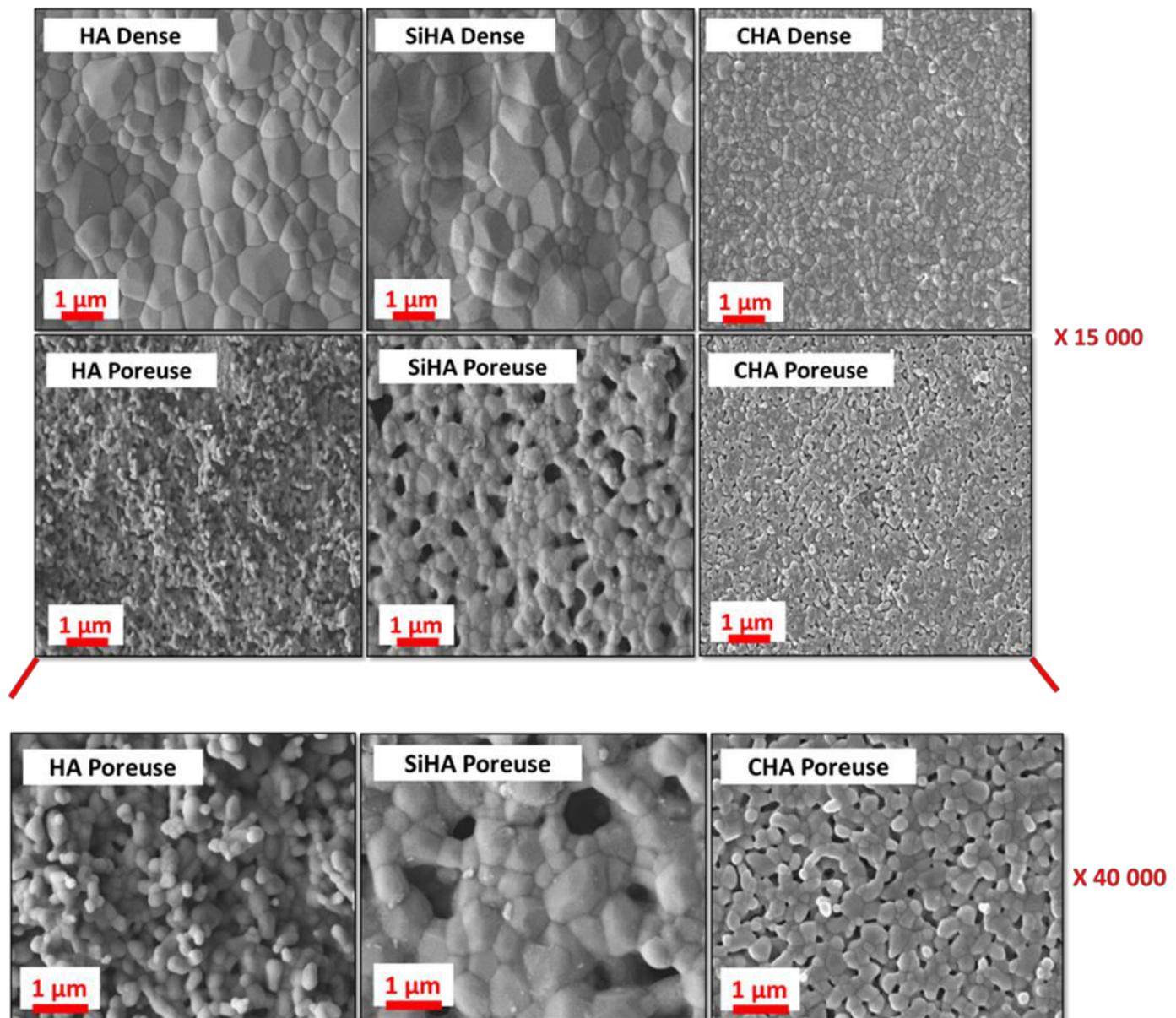


Figure 24 : images en microscopie électronique à balayage des pastilles frittées

Une microstructure typique de pastilles frittées est représentée sur la figure 24. La forme, la taille des grains ainsi que les joints de grains ont été bien délimités pour chaque substrat. Une porosité ouverte homogène a été observée sur les surfaces des pastilles poreuses (Figure 24).

II.1.2.2.2. Taille des grains

La taille des grains des pastilles après frittage est estimée par traitement d'images en MEB. Un nombre significatif d'images représentatives de l'ensemble de la pastille frittée a été réalisé. Pour les pastilles denses, un cercle contenant au minimum 30 grains a été dessiné. Le nombre de grains à l'intérieur du cercle (1 lorsque le grain était à l'intérieur du cercle et 0,5 lorsqu'il coupait le périmètre du cercle) a été compté. Pour connaître la surface d'un grain, la surface du cercle a été divisée par le nombre de grains :

$$\text{Surface d'un grain } (Sg) = \frac{\text{surface du cercle}}{\text{nombre de grains}} = \frac{\pi D^2}{4} \times \frac{1}{\text{nombre de grains}}$$

$$\text{diamètre d'un grain } (Dg) = \sqrt{\frac{4 \times (Sg)}{\pi}}$$

Sur les pastilles poreuses, le diamètre de 20 grains par images prises au hasard, a été tracé pour estimer la taille moyenne des grains.

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Taille des grains (µm)	Taille des grains (µm)
HA	1,1±0,2	0,14±0,02
SiHA	1,4±0,1	0,63±0,07
CHA	0,20±0,01	0,10±0,01

Tableau 17 : taille des grains des pastilles frittées.

La taille des grains est mesurée sur une trentaine de grains sélectionnés au hasard sur 12 images prises sur 2 pastilles indépendantes (6x2), soit ~30x12=360 grains au total analysés. La valeur représente la moyenne des mesures ± SD.

De façon générale, la taille des grains des pastilles poreuses est plus petite que celle des pastilles denses. Par contre, pour les pastilles CHA, la taille des grains est du même ordre de grandeur que la pastille soit dense ou poreuse. La taille des grains des

CHA est aussi plus petite comparée à la taille des grains des autres compositions chimiques HA et SiHA. Cela est dû aux paramètres de frittage qui exigeaient une température plus basse pour le frittage des pastilles CHA (Tableau 17).

II.1.2.2.3. Porosité

II.1.2.2.3.1. Porosité ouverte

La porosité ouverte a été calculée par la méthode d'Archimède après pesée de la masse des pastilles sèches (M1), des pastilles humides (M2) ou immergées dans de l'eau distillée (M3) selon la formule :

$$\% \text{ porosité ouverte} = \left(\frac{M3 - M1}{M3 - M2} \right) \times 100$$

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Porosité fermée %	Porosité ouverte %
HA	0,6±0,2	25±1
SiHA	1,1±0,3	32±1
CHA	6,0±0,1	25±1

Tableau 18 : porosité des pastilles frittées.

La porosité a été mesurée sur un minimum de 8 pastilles par composition et microstructure. Les valeurs représentent la moyenne des valeurs obtenues pour les 8 mesures ± SD.

Une porosité du même ordre de grandeur de 25 à 32% a été obtenue pour tous les biomatériaux poreux. Une densification de 99,4% a été obtenue pour HA, de 98,87 pour SiHA et de 94% pour CHA. La porosité mesurée sur les biomatériaux denses est considérée comme étant une porosité fermée. Le plus fort taux de porosité fermée retrouvé sur CHA dense vient du fait que ces biomatériaux ont été frittés à des températures plus basses, pour éviter la décarbonatation et la formation de calcite. Ce choix de température a eu pour conséquence, une augmentation de la porosité fermée (Tableau 18).

II.1.2.2.3.2. Distribution des pores

La distribution et la taille des pores ont été analysées par la technique d'intrusion au mercure sur les matériaux poreux (AutoPore IV 9500 VI.09). En fonction de la pression et du volume de mercure utilisés, la distribution et la taille des pores ont pu être estimées (Figure 25).

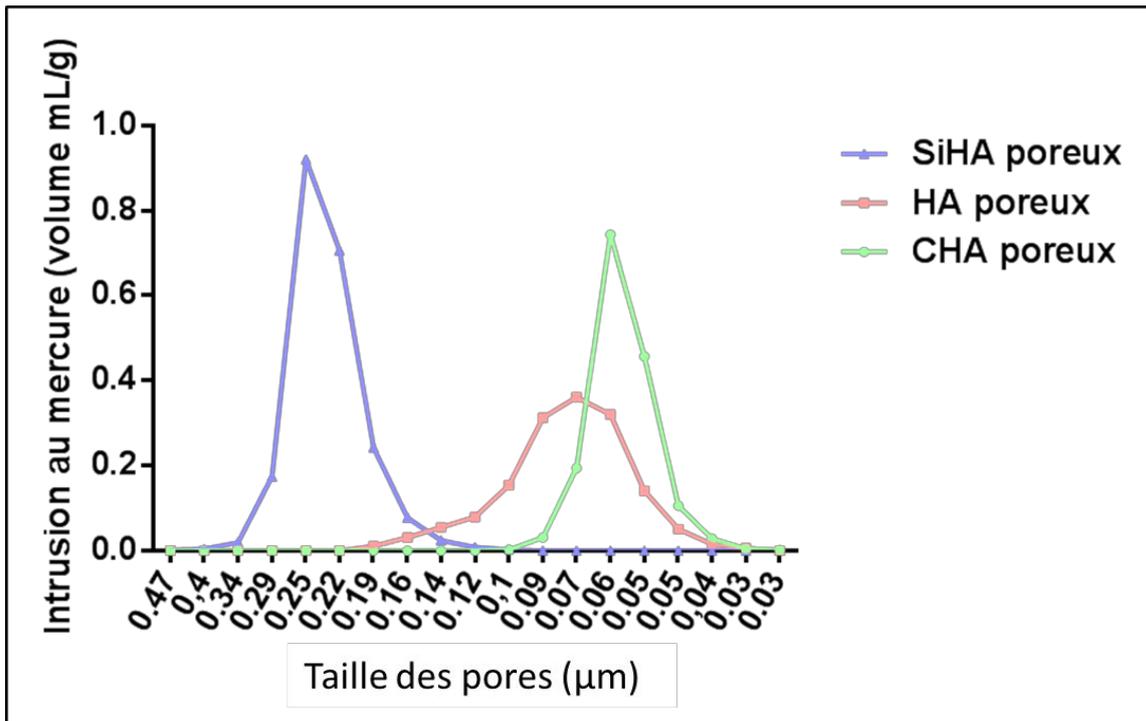


Figure 25 : distribution des pores

Composition chimique	Poreuse
	Taille des pores (D50:μm)
HA	0,07
SiHA	0,25
CHA	0,055

Tableau 19 : taille médiane des pores pour chaque composition chimique

La distribution est monomodale. Une seule population de pores a été observée. La taille moyenne des pores des pastilles frittées SiHA est plus de deux fois supérieure à celle de HA et CHA. La taille des pores de HA et CHA est du même ordre de grandeur. CHA présente malgré-tout, une distribution en taille plus étroite (Tableau 19).

II.1.2.3 Caractérisation de la surface des céramiques

II.1.2.4 Surface spécifique

La surface spécifique a été déterminée selon la méthode BET 8 points (Brunauer, Emmett et Teller) (Micromeritics ASAP 2000), en utilisant de l'azote pour les pastilles poreuses, ou du Krypton pour les pastilles denses. Les échantillons ont été mis à dégazer à 200 °C-1 h au préalable (Tableau 20).

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Surface spécifique (m ² /g)	Surface spécifique (m ² /g)
HA	0,003±0,001	4,0±0,3
SiHA	0,009±0,002	2,0±0,1
CHA	0,61±0,13	1,42±0,06

Tableau 20 : surface spécifique des pastilles frittées.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures indépendantes au minimum ± SD

Une coalescence granulaire a pu être observée pour CHA poreux, ce qui a expliqué la surface spécifique légèrement plus petite obtenue pour les pastilles de CHA (1,4 m².g⁻¹), comparées aux pastilles HA (4 m².g⁻¹), à porosité égale 25% (Tableau 18). Ce phénomène est généralement rencontré pendant le frittage d'apatites phosphocalciques qui contiennent des lacunes dans leur structure favorisant la diffusion superficielle (Champion, 2013).

Une croissance granulaire beaucoup plus importante (Tableau 17) explique également la faible surface de SiHA poreuse comparée à celle de l'HA poreuse.

Une taille de grains beaucoup plus petite pour CHA dense que pour HA et SiHA dense (Tableau 17), est également à l'origine de sa surface spécifique plus élevée.

II.1.2.5 Topographie de surface

Un profilomètre tactile DEKTAK 6M a servi à déterminer la topographie de surface des pastilles. Un stylet en diamant de radius 12,5 µm a parcouru la surface de la pastille sur plusieurs lignes de 10 mm de long avec une masse appliquée de 1 mg. Les données de rugosité moyenne : RA, la moyenne des creux : RV ou encore la moyenne des bosses : RZ a été enregistrée (Figure 26).

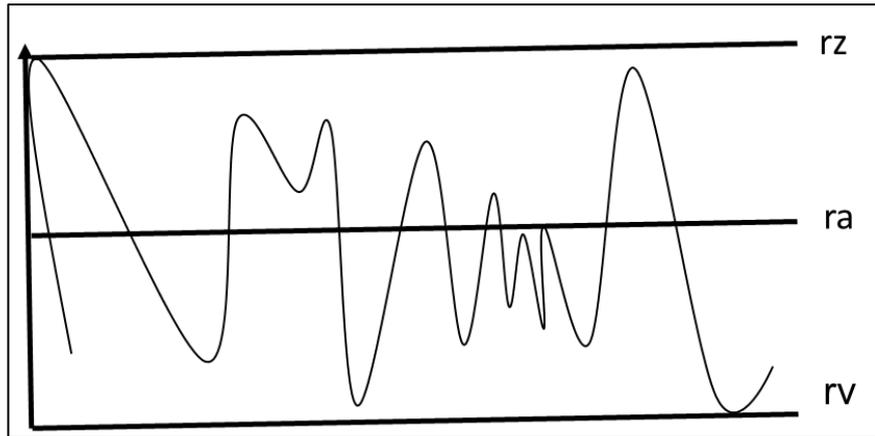


Figure 26 : schéma représentant les grandeurs RA : rugosité moyenne, RZ : moyenne des bosses, RV : moyenne des creux

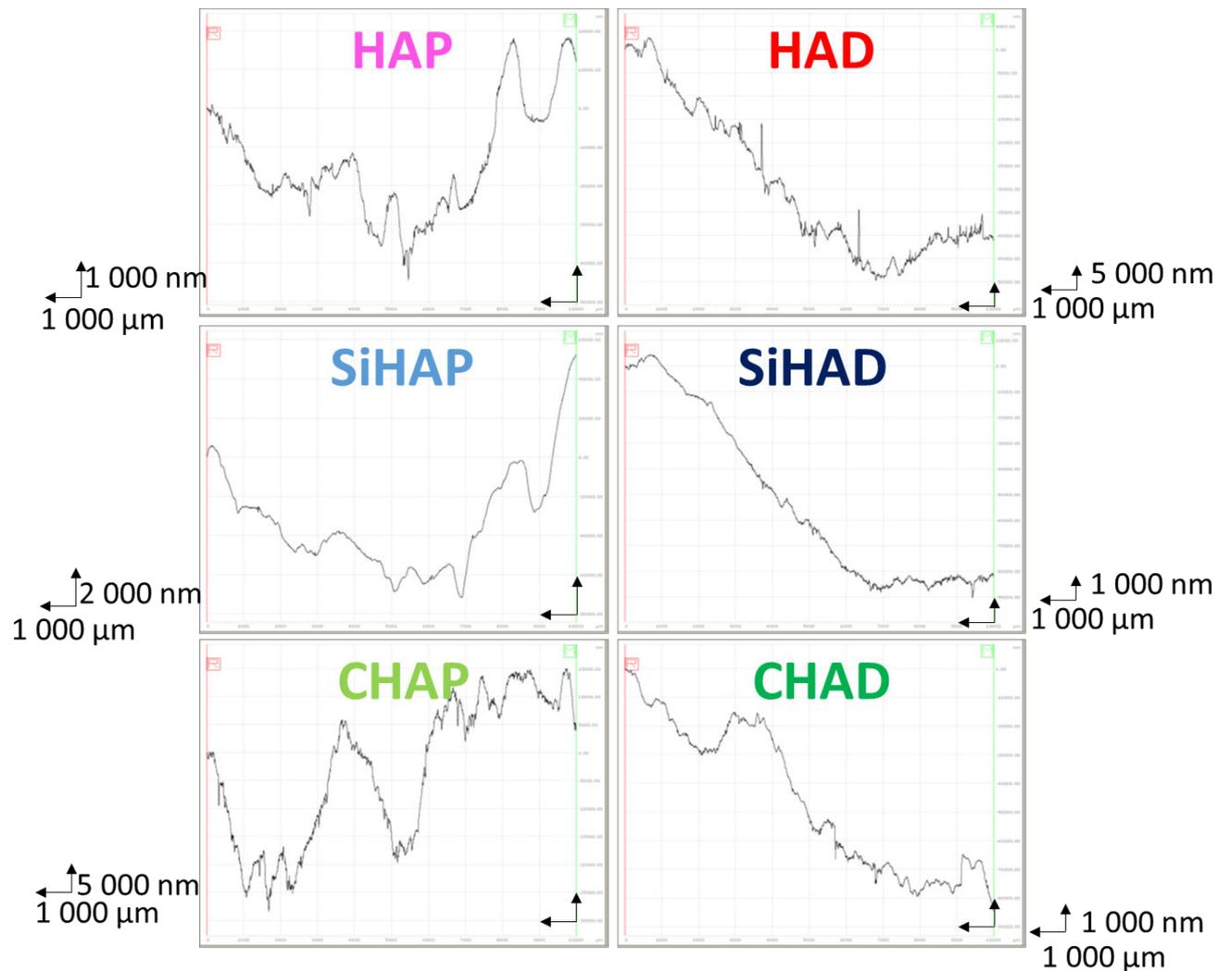


Figure 27 : exemples de profils obtenus au profilomètre pour chaque composition et microstructure de biomatériau

Composition chimique	Dense			Poreuse		
	Topographie (µm)			Topographie (µm)		
	RA	RZ	RV	RA	RZ	RV
HA	4,0± 0,3	12,0±0,4	-12±1	14±1	33±2	-23±2
SiHA	8,1±0,6	16±1	-15±1	9,0±0,6	26±1	-26±2
CHA	7,1±0,6	23±1	-19±1	7,7±0,4	25±1	-25±3

Tableau 21 : analyse de la topographie de surface des pastilles frittées.

RA est la rugosité moyenne, RZ représente la valeur moyenne des bosses et RV la valeur moyenne des creux. Six lignes sur 3 pastilles indépendantes ont été mesurées soit (3x6=18 lignes par composition et microstructure). Chaque valeur représente la moyenne des 6 mesures ± SD.

Les valeurs de topographie des pastilles poreuses sont plus élevées comparées à celles des pastilles denses. Les valeurs RZ et RV de CHA dense sont plus élevées que celles des autres compositions chimiques HA et SiHA denses. Cela est probablement dû aux paramètres de frittage (température moins élevée) pour éviter la décarbonatation. Ces paramètres de frittage sont à l'origine de micropores en surface des pastilles CHA denses. La porosité modifie notablement la topographie de surface. Néanmoins, la comparaison de topographie des pastilles denses et poreuses doit donc être considérée avec précautions. Cela, d'autant plus que les mesures RV ne sont pas représentatives des valeurs réelles du fait de la limite du palmer qui ne peut pas « atteindre » la profondeur des pores (Tableau 17).

II.1.2.6 Potentiel zêta

Le potentiel zêta a été déterminé sur de la poudre de pastilles frittées. Des pastilles non traitées (D0) ont été broyées, ainsi que des pastilles traitées, c'est-à-dire immergées pendant 14 jours dans du milieu de culture complet (paragraphe III.2.1, page 132) (D14). 0,1g de poudre a été mélangé pendant 1 h sous agitation. Puis, le mélange a été filtré avec un filtre de diamètre 0,8 µm. Les mesures ont été réalisées avec un zêta sizer (Malvern Instrument).

Composition chimique	Dense		Poreuse	
	Potentiel zêta (mV)		Potentiel zêta (mV)	
	D0	D14	D0	D14
HA	-21±4	-26±8	-25±5	-18±5
SiHA	-22±4	-25±6	-23±4	-22±4
CHA	-24±4	-20±6	-22±4	-21±6

Tableau 22 : potentiel zêta des pastilles frittées.

Mesures réalisées sur pastilles brutes (D0) et après immersion 14 jours dans du milieu de culture (D14). 12 cycles de mesures ont été réalisés sur un même échantillon. La valeur représente la moyenne des 12 mesures et l'écart type représente la déviation standard.

Les valeurs sont négatives et du même ordre de grandeur pour toutes les compositions chimiques et les microstructures. Aucune différence dans la charge de surface des pastilles n'a été observée même après immersion pendant 14 jours dans le milieu de culture.

II.1.2.7 Mouillabilité

Des tests de mouillabilité ont été réalisés sur les différents biomatériaux en mesurant l'angle de contact selon la méthode de la goutte Sessile (Figure 28) avec de l'eau ultra pure, à température ambiante, à l'aide d'un DSA 30, Krüss. La valeur d'angle correspond à la moyenne des 5 valeurs obtenues sur 5 secondes. Ce test a été réalisé sur des pastilles non traitées (D0) et sur des pastilles traitées, c'est-à-dire immergées dans du milieu de culture complet (paragraphe III.2.1, page 132), pendant 14 jours.

Composition chimique	Dense		Poreuse	
	Angle de contact (θ°)		Angle de contact (θ°)	
	D0	D14	D0	D14
HA	93±2	47±3	11,0±1,1	54±5
SiHA	93±2	60±3	1,0±0,6	79±4
CHA	98±8	77±2	53±7	85±4

Tableau 23 : valeur de l'angle de contact des pastilles frittées.

D0 : mesure réalisée sur pastilles brutes et D14 : mesure réalisée sur pastilles immergées dans le milieu de culture 14 jours. 6 à 8 mesures par pastille ont été réalisées. Chaque mesure représente la moyenne de 5 valeurs d'angle réalisées sur une période de 5s (1 mesure chaque seconde) ± SD.

A (D0), pour les matériaux denses, les angles de contact sont similaires pour les 3 matériaux avec un caractère très légèrement hydrophobe. Pour les matériaux poreux, les valeurs doivent être prises avec précautions du fait des phénomènes de capillarité. Elles ne sont données qu'à titre indicatif. Elles ne peuvent être associées directement au caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface. Elles peuvent en revanche être reliées à la taille des pores, (Tableau 19). Plus les pores sont gros, plus la capillarité est forte, ce qui se traduit par une diminution d'angle de contact. Toutefois, des valeurs ont pu être enregistrées sur les pastilles poreuses. Néanmoins, sur SiHA la porosité de taille importante a entraîné une forte capillarité.

Après 14 jours d'immersion dans le milieu de culture, que les pastilles soient denses ou poreuses, des valeurs similaires ont pu être collectées. Cela peut s'expliquer par la fermeture des pores par un dépôt protéique et d'apatite biologique sur les matériaux, du fait du phénomène de dissolution précipitation, apparaissant en surface de matériaux phosphocalciques, (Hench, 1998), (LeGeros, 2008). La valeur de l'angle de contact a diminué sur les pastilles denses, preuve d'un changement de caractère légèrement hydrophobe en caractère plus hydrophile. Ce caractère plus hydrophile des matériaux peut s'expliquer par l'adsorption de protéines contenues dans le milieu de culture (sérum de veau fœtal) à la surface des pastilles, (Rouahi et al., 2006a), (Rouahi et al., 2006b). Une interprétation similaire peut être avancée pour les matériaux poreux.

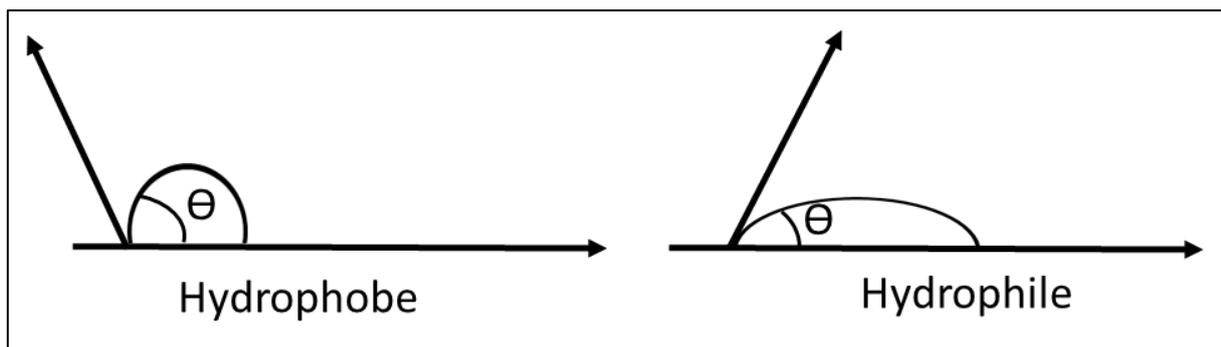


Figure 28 : schéma représentant le paramètre thêta (θ) mesuré.

Des angles supérieurs à 90° représentent un caractère hydrophobe du substrat alors que des angles plus petits traduisent un caractère hydrophile des substrats.

II.1.2.8 Discussion

Au Bilan, les caractérisations physico-chimiques des 6 biomatériaux sont résumées dans le tableau ci-dessous, (Tableau 24).

CARACTÉRISATIONS	DENSES			POREUSES		
	HA (Ca/P)=1,667	SIHA (1.13%massique)	CHA (4,4 % massique)	HA (Ca/P)=1,667	SiHA (1.13%massique)	CHA (4,4 % massique)
CHIMIQUE						
COMPOSITION CHIMIQUE						
ANGLE DE CONTACT (D0)	93±2	93±2	98±8	11,0±1,1	1,0±0,6	53±7
ANGLE DE CONTACT (D14)	47±3	60±3	77±2	54±5	79±4	85±4
POTENTIEL ZETA (mV) (D0)	-21±4	-22±4	-24±4	-25±5	-23±4	-22±4
POTENTIEL ZETA (mV) (D14)	-26±8	-25±6	-20±6	-18±5	-22±4	-21±6
PHYSIQUE						
SURFACE SPECIFIQUE (m ² /g)	0,003±0,001	0,009±0,002	0,61±0,13	4,0±0,3	2,0±0,1	1,42±0,06
POROSITE (%)	0,6±0,2 fermée	1,1±0,3 fermée	6,0±0,1 fermée	25±1 ouverte	32±1 ouverte	25±1 ouverte
TAILLE DES GRAINS (µm)	1,1±0,2	1,4±0,1	0,20±0,01	0,14±0,02	0,63±0,07	0,10±0,01
TAILLE DES PORES (µm)	φ	φ	φ	0,07	0,25	0,055
RUGOSITE MOYENNE (RA: µm)	4,0±0,3	8,1±0,6	7,1±0,6	14±1	9,0±0,6	7,7±0,4
MOYENNE DES CREUX LES PLUS PROFONDS (RV: µm)	-12±1	-15±1	-19±1	-23±2	-26±2	-25±3
MOYENNE DES PICS LES PLUS HAUTS (RZ: µm)	12,0±0,4	16±1	23±1	33±2	26±1	25±1

Tableau 24 : caractérisations physico-chimiques des 6 variantes de céramiques phosphocalciques synthétisées

En considérant les valeurs du tableau, concernant le potentiel zêta, on peut en déduire que ce paramètre n'influencera pas l'activité cellulaire puisqu'il est négatif et du même ordre de grandeur pour les 6 variantes de biomatériaux testées. De plus, il reste identique à D0 et à D14 après immersion des pastilles dans le milieu de culture. Le taux de porosité ouverte est légèrement supérieur pour SiHA poreux que pour CHA et HA poreux. Concernant la taille des pores, celles des pastilles poreuses SiHA sont deux fois plus grosses que les pores des pastilles HA et CHA poreuses qui sont du même ordre de taille. Ces valeurs sont corroborées par les images MEB ([Figure 24](#)). Cette différence pourrait être à l'origine d'un comportement cellulaire différent sur SiHA poreux comparée à HA et CHA poreux. Cela pourrait être dû à une différence de capillarité avec le milieu de culture sur les pastilles SiHA poreuses, comme en témoigne l'angle de contact très faible mesuré à D0 ([Tableau 23](#)), qui pourrait par exemple, influencer l'adhésion cellulaire. Les biomatériaux denses HA et SiHA partagent en commun une plus grosse taille de grain comparée à leur homologue en composition chimique mais de microstructure poreuse. Les biomatériaux CHA qu'ils soient denses ou poreux partagent les caractéristiques des biomatériaux HA et SiHA poreux en terme de taille de grains : c'est-à-dire une taille de grains plus petite que les biomatériaux denses HA et SiHA.

L'angle de contact mesuré sur les pastilles brutes appelé angle de contact D0, possède une valeur spécifique propre au biomatériau dense et légèrement supérieure à 90° , ce qui confère aux trois matériaux (HA, SiHA et CHA denses), un caractère très légèrement hydrophobe. Les valeurs mesurées sur les biomatériaux poreux sont à relier aux phénomènes de capillarité, fonction de la taille des pores. En effet, à D0, il a été possible de mesurer une valeur d'angle sur CHA poreux, car la taille des pores est plus petite sur CHA poreux comparée aux autres matériaux poreux. Par contre, la taille des pores est deux fois plus importante sur SiHA poreux.

Le biomatériau HA dense possède les valeurs de rugosité moyenne RA les plus faibles. Cette mesure est du même ordre de grandeur pour les biomatériaux SiHA et CHA probablement du fait du lissage des valeurs par le calcul de la moyenne. Les valeurs RV sont aussi des valeurs à prendre avec précaution et particulièrement pour les pastilles poreuses, car la course du palmer est limitée du fait de l'impossibilité d'atteindre le fond des pores. Quant aux valeurs RZ, elles sont plus faibles sur les biomatériaux denses HA et SiHA comparées à leur homologue de composition

chimique, mais de microstructure poreuse. La valeur est du même ordre de grandeur pour CHA, que la pastille soit dense ou poreuse. Cette valeur est du même ordre de grandeur pour SiHA poreux, HA poreux, CHA dense et poreux.

La surface spécifique est plus importante sur HA poreux comparée aux autres biomatériaux poreux. Par contre, HA poreux possède un taux de porosité et une taille de grains du même ordre de grandeur que CHA poreux. Néanmoins, la coalescence granulaire sur CHA poreux fait que la surface spécifique de ces biomatériaux est plus faible que celle de HA poreuse. Concernant SiHA poreux, les pores de tailles plus importantes et le taux de porosité ouverte plus important sur ces matériaux comparés à la porosité ouverte et à la taille des pores sur CHA poreux, font que la surface spécifique a été plus importante, comparée à CHA poreux, même si les grains étaient de plus petites tailles sur CHA poreux.

Les caractéristiques physico-chimiques propres à une variante de biomatériaux et susceptibles d'influencer le comportement cellulaire sont évaluées par les analyses ACP ci-dessous.

Principe de l'analyse ACP

L'analyse en composantes principales est utilisée pour le traitement de données quantitatives. C'est une méthode d'analyse des données qui fait appel à la statistique multivariée. Il s'agit d'une approche à la fois géométrique et statistique. Les variables sont représentées dans un nouvel espace selon des directions d'inertie (dispersion) maximale.

La recherche porte sur des axes indépendants expliquant au mieux la variabilité (la variance) des données.

La principale caractéristique de cette analyse est d'être multidimensionnelle et descriptive. Elle structure et résume l'information. Elle aide à faire ressortir les relations pouvant exister entre les différentes données et à en tirer une information statistique qui permet de décrire de façon plus succincte les principales informations contenues dans ces données.

Elle permet de regrouper les données de façon à faire apparaître clairement ce qui les rend homogènes et ainsi mieux les connaître.

But de l'analyse ACP

Ces analyses ont été réalisées pour prédire et discriminer le rôle de la composition chimique de celui de la microstructure. Un nombre important de données quantitatives obtenues lors des différents tests de caractérisations et des évaluations biologiques ont été traités par cette approche statistique pour connaître les relations entre les différents paramètres entre eux et entre les paramètres (variables) et les différentes variantes de biomatériaux (composantes).

Le table de corrélation complète l'ACP et permet d'établir les liens et sens de corrélation entre les différents paramètres.

Le choix des composantes étudiées (axe géométrique de l'ACP) est déterminé à partir de la courbe de décroissance et de l'analyse de la somme des variances des variables étudiées. Cette approche permet de confirmer que l'on peut négliger les autres composantes à partir de la 3^{ème} composante et ne garder que les deux premières composantes principales (soit 81,33% de variances sur axe 1 et 2), donc rester en 2 dimensions, sur deux axes ce qui permet une représentation du modèle en 2D sur deux axes orthogonaux principaux. Le tableau de corrélation et les courbes de décroissance ainsi que l'analyse des variances obtenus pour chaque analyse réalisée sont représentés en Annexe 8 (Annexe 8).

Design de l'analyse ACP

Seules les données quantitatives ont été utilisées pour réaliser les analyses ACP. Les analyses DRX et les IRTF n'ont donc pas été intégrées dans ces analyses. En revanche, ces analyses ont permis de prouver la pureté des pastilles et la substitution ionique a été validée.

Les 6 composantes de l'ACP correspondent aux 6 variantes de biomatériaux : HA dense, HA poreuse, SiHA dense, SiHA poreuse, CHA dense, CHA poreuse.

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse de la caractérisation a été réalisée avec les 8 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)

- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)

Excepté pour la taille des pores et le potentiel zêta, pour toutes les autres mesures, une analyse en composantes principales a été réalisée, afin d'avoir une vision d'ensemble des grandes tendances comparables ou non, des 6 variantes de céramiques phosphocalciques synthétisées. Cela a également permis de discerner les caractéristiques physico-chimiques qui peuvent être corrélées entre elles et celles qui peuvent être inversement corrélées entre elles (Figure 29).

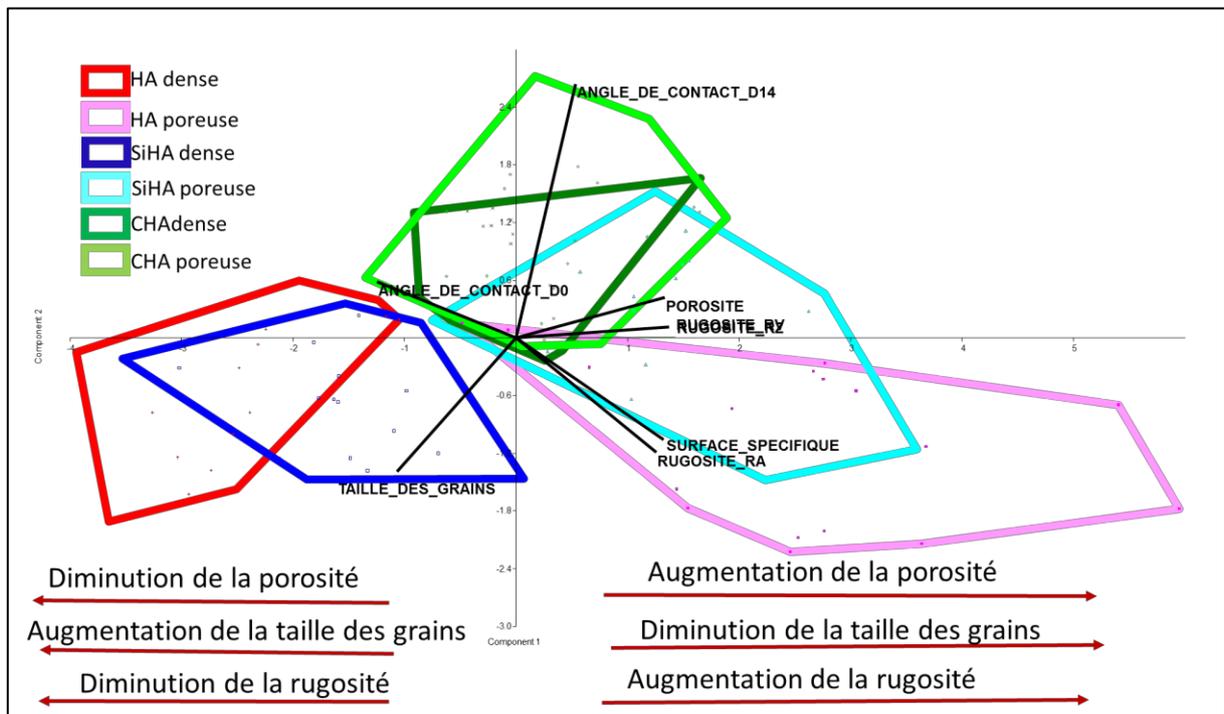


Figure 29 : analyse ACP des caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux.

Ces analyses permettent en effet de mettre en évidence des corrélations ou des corrélations inverses, en fonctions de différents paramètres analysés. Une enveloppe regroupe l'ensemble des valeurs des paramètres analysés pour une variante de biomatériau. Chaque vecteur représente un paramètre donné. En fonction de la direction du vecteur et l'orientation de l'enveloppe, il est possible de savoir si un paramètre donné est corrélé avec un sous type de biomatériau. Des enveloppes qui se superposent partagent des caractéristiques communes, par contre, des enveloppes qui sont distinctes et opposées possèdent des caractéristiques différentes.

A partir des analyses ACP, la première observation est que trois groupes peuvent être distingués :

- 1 **HA dense** et **SiHA dense**
- 2 **HA poreux** et **SiHA poreux**
- 3 **CHA dense** et **CHA poreux**

On en a déduit que l'influence distincte de la composition chimique de celle de la microstructure (porosité, topographie, surface spécifique) peut être discriminée pour les céramiques HA et SiHA.

En effet, ces analyses montrent qu'il sera possible d'analyser HA dense et SiHA dense pour mettre en évidence, l'influence de la substitution en silicium.

En comparant SiHA poreux et HA poreux, il sera possible de mettre en évidence le rôle de la substitution en silicium, mais en se rappelant que la porosité peut également influencer la réponse cellulaire, en jouant un rôle synergique avec celui de la microstructure.

La comparaison des structures HA et siHA dense avec HA et siHA poreux permet de mettre en évidence le rôle de la microstructure. De plus, la comparaison des groupes SiHA dense et HA dense peut permettre de discriminer l'influence de la substitution en silicium, de celle de la microstructure. Il est à noter que les groupes CHA dense et CHA poreux ne peuvent être discriminés du point de vue de la microstructure. En effet, les enveloppes de l'ACP sont superposées. De plus, ces enveloppes sont orientées différemment des autres groupes. Ces deux groupes possèdent des caractéristiques chimiques, mais aussi microstructurales différentes des autres groupes, mais propres à cette composition chimique.

La substitution en ions silicates et carbonate est d'emblée considérée comme significative et pourra être prise en compte comme élément influençant la réponse cellulaire. De plus, de ces analyses, des caractéristiques physico-chimiques sont susceptibles d'agir de façon corrélée sur l'activité cellulaire et non de façon directement indépendante.

Une corrélation inverse entre la taille des grains, la rugosité et la porosité a pu être observée. Une taille de grains supérieure est associée à une porosité moindre voire nulle et à une rugosité inférieure. Ce sont les 3 caractéristiques que partagent SiHA dense et HA dense. Par contre, les biomatériaux poreux HA et SiHA, comme attendus,

possèdent la porosité la plus importante qui est associée à une taille plus petite de grains et une rugosité plus importante. Les biomatériaux CHA dense et poreux se comportent de façon intermédiaire. Néanmoins, la tendance dégagée par l'axe principal vertical n'a pas pu être déterminée.

La corrélation inverse ($R = -0,5$) entre taille des grains et porosité est significative ($p = 1,12 \times 10^{-5}$).

Il a effectivement pu être observé des tailles plus petites de grains associées aux matériaux poreux par rapport aux matériaux denses pour les compositions chimiques HA et SiHA. Ces différences de taille de grains peuvent être associées à la température de frittage que l'on choisit moins élevée pour créer de la porosité par rapport à la température de frittage pour densifier (Champion, 2013). Cette différence n'a pas été observée pour la composante CHA du fait d'une température de frittage quasi similaire entre celle choisie pour créer des matériaux denses et celle choisie pour créer la porosité. La densification s'est réalisée en augmentant le temps de frittage car les analyses de dilatométrie ont montré que des températures supérieures à 1000 °C sont responsables de la décarbonatation et de la dédensification des matériaux CHA (Figure 20).

La surface spécifique et la porosité sont corrélées positivement ($R = 0,79$) ce qui suggère que lorsque la porosité augmente la surface spécifique augmente également (Table des corrélations obtenues pour les caractérisations des biomatériaux, Annexe 7).

II.1.3. Conclusion sur la caractérisation des biomatériaux

Les 6 variantes de biomatériaux ont été caractérisées afin de connaître leurs caractéristiques physiques et chimiques (Tableau 24).

Il est communément admis que les propriétés physico-chimiques des biomatériaux agissent sur la capacité d'adhésion des cellules et donc leur activité fonctionnelle. Néanmoins, des réponses sur le rôle précis de l'influence de la microstructure et de la composition chimique sur l'activité cellulaire, en rapport avec la régénération osseuse, restent à apporter. Dans la mesure où les conclusions issues de la littérature sur l'efficacité d'une substitution ionique et particulièrement en silicium et en carbonate ainsi que l'influence de la microstructure sur l'activité des ostéoblastes et des

ostéoclastes divergent (Tableau 3, Tableau 4, Tableau 7, Tableau 8), l'analyse ACP, une analyse multiparamétrique, nous a permis de discriminer l'influence de la microstructure et de la composition chimique des 6 céramiques de phosphate de calcium synthétisées, sur l'activité cellulaire. Ces analyses ont permis d'établir des premières tendances afin de déterminer les liens (corrélations) existants entre les facteurs physiques et biologiques. Cette démarche permet de distinguer les facteurs d'intérêt susceptibles d'influencer le comportement cellulaire sur un biomatériau et ainsi de les étudier de manière plus précise. Une étude comparative par rapport aux données de la littérature est bien sûr menée en parallèle dans la suite de la thèse.

Dans ces travaux de thèse, il a été choisi d'étudier en conditions comparables, l'influence de ces six biomatériaux, sur l'activité des deux types cellulaires impliqués dans le processus de régénération osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes.

- la première partie du chapitre : résultats et discussions, traitera des analyses biologiques avec la même approche statistique que précédemment : des analyses ACP. L'objectif de cette partie est de discriminer des tendances globales sur l'influence respective de la microstructure et de la composition chimique sur les réponses des deux types de cellules. Par la suite nous chercherons à d'établir une corrélation avec les concentrations en calcium mesurées dans le milieu de culture avec ou sans cellule. En effet, les céramiques de phosphate de calcium sont supposées libérer des éléments calcium et phosphore dans l'environnement, susceptibles de moduler l'activité cellulaire.
- La deuxième partie se focalisera sur l'étude comparative des propriétés physico-chimiques des 4 variantes de biomatériaux : SiHA dense, SiHA poreuse, HA dense, HA poreuse, sur l'activité ostéoblastique. En effet, les analyses ACP des caractéristiques physico-chimiques des 6 biocéramiques synthétisées, ont montré que l'influence du silicium et celle de la microstructure peuvent être discriminées en comparant ces 4 biomatériaux (Figure 29). Cette analyse comparative sera confrontée aux données de la littérature. En effet, au regard de la littérature (paragraphe 1.2.2.1.1), les conclusions divergent concernant l'efficacité d'une substitution ou d'une microstructure pour la réparation osseuse, du fait notamment d'un manque de caractérisation au

préalable des biomatériaux et d'études réalisées en conditions non-comparables.

- Les analyses ACP ont montré qu'il n'est pas possible de discriminer le rôle de la microstructure en ce qui concerne les biomatériaux CHA dense et poreux. Par contre, ces biomatériaux se comportant différemment de l'ensemble des 4 autres biomatériaux. L'influence de la substitution en carbonate dans l'apatite pourra être discriminée en comparant les CHA à l'HA stoechiométrique (Figure 29). La supériorité biologique des biomatériaux substitués en carbonates par rapport à de l'hydroxyapatite pure, est largement discutée dans la littérature (paragraphe 1.2.2.1.2). Une analyse comparative sur l'activité ostéoblastique et ostéoclastique n'incluant que les biomatériaux CHA dense, CHA poreuse, HA dense et HA poreuse, a été réalisée. La troisième partie du chapitre s'intéressera à la réponse
- Réponse ostéoblastique et ostéoclastique au biomatériau d'hydroxyapatite carbonatée de type A/B.
- La 4^{ème} partie sera consacrée à l'étude comparative des 6 variantes de biomatériaux sur l'activité ostéoclastique. Dans cette partie, une corrélation avec l'expression du VEGF-A par les cellules et leur activité de résorption a été réalisée.

Pour réaliser ces études, les cellules ont directement étéensemencées à la surface des pastilles. Différents critères et tests fonctionnels ont été réalisés selon un plan d'expérience. Le matériel et méthode pour l'approche biologique est présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre III

Approche biologique : matériel et méthode

Chapitre III. Approche biologique : matériel et méthode

III.1. Plan expérimental

Afin d'évaluer l'influence de la microstructure et de la composition chimique des 6 variantes de biomatériaux sur la réponse cellulaire, deux lignées cellulaires ont été utilisées. La lignée cellulaire murine de monocytes/macrophages RAW 264.7 (Sigma-Aldrich, Germany), précurseur d'ostéoclastes et la lignée murine pré-ostéoblastique MC3T3-E1 (DSMZ, Germany). Différents critères et tests fonctionnels ont été réalisés sur ces deux lignées.

L'interaction des cellules au contact des pastilles a été analysée en étudiant l'adhésion cellulaire (densité cellulaire, surface cellulaire, adhésions focales). La biocompatibilité des biomatériaux a été vérifiée en étudiant la viabilité et le métabolisme cellulaire. Concernant les tests fonctionnels, la prolifération et la différenciation cellulaire ont été étudiées à travers différents points de cinétique.

La lignée MC3T3-E1 étant une lignée pré-ostéoblastique, les tests biologiques ont été réalisés sur une cinétique de temps plutôt court, 1 h, 24 h ou 48 h (Figure 30). Des tests de différenciation à 7 jours ont également été réalisés (Figure 30).

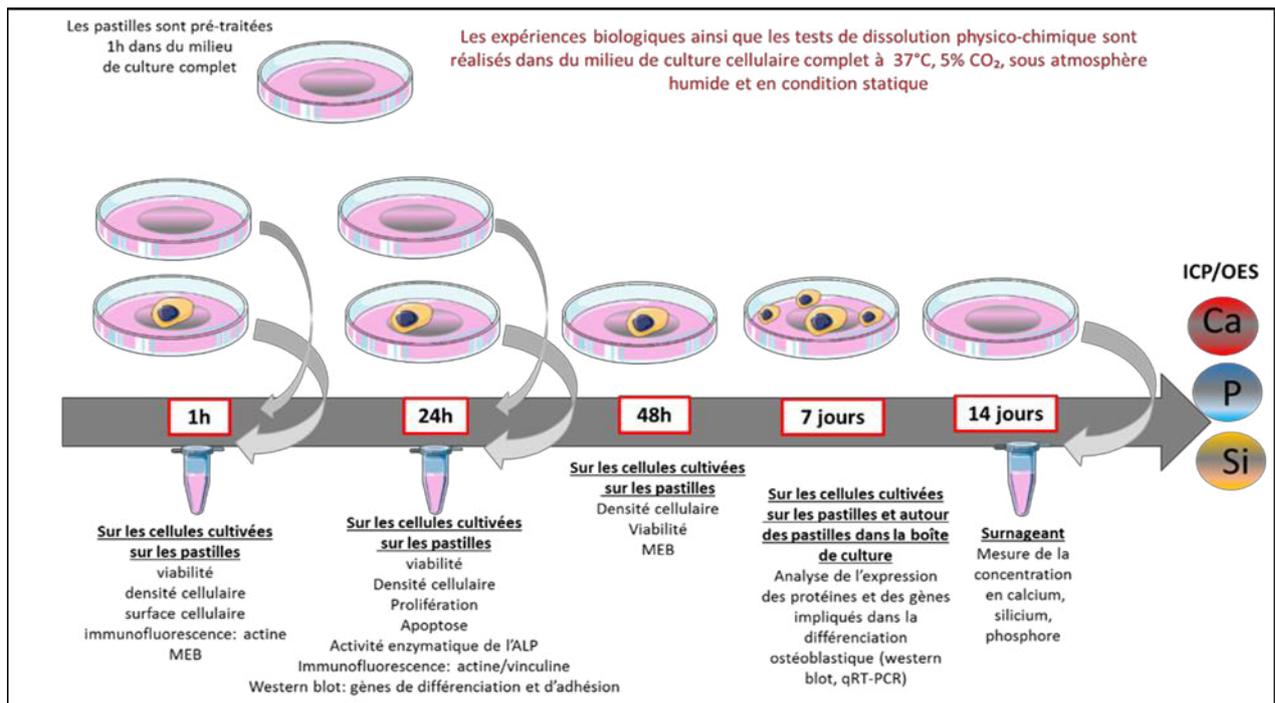


Figure 30 : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée pré-ostéoblastique MC3T3-E1

Concernant la lignée de monocytes/macrophages RAW 264.7, les analyses ont été réalisées à 14 jours afin de suivre la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes sous l'action du milieu de culture différenciant.

Les analyses biologiques avec les cellules RAW 264.7, ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut des biomatériaux d'Erlangen en Allemagne. Dans le cadre d'un stage de deux mois dans le laboratoire du Professeur Aldo R Boccaccini et supervisée par le docteur Rainer Detsch, j'ai pu cultiver cette lignée cellulaire sur l'ensemble de six variantes de biomatériaux et réaliser les différentes expériences biologiques présentées ci-dessous ([Figure 31](#)).

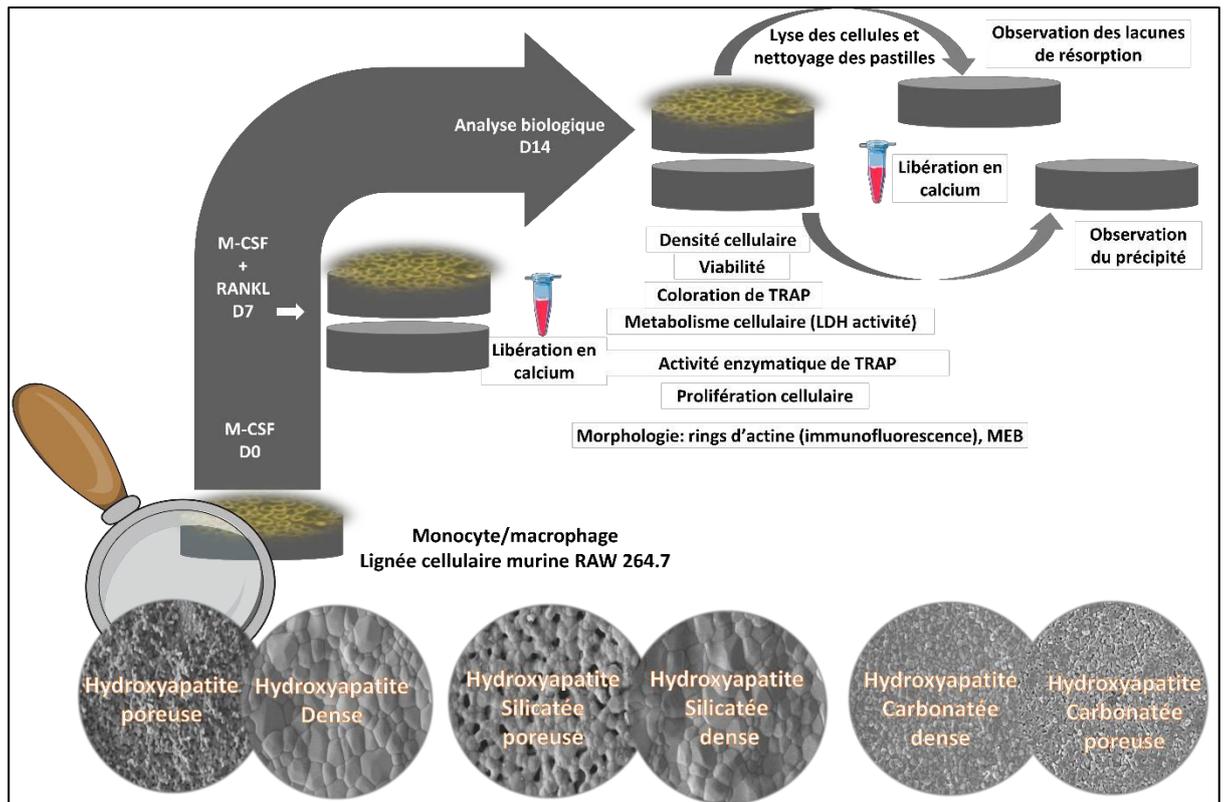


Figure 31 : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée de monocytes/macrophages RAW 264.7

III.2. Matériels et Méthodes

III.2.1. Milieux de culture

III.2.1.1 Milieu de culture pour la lignée MC3T3-E1

Le milieu de culture utilisé était du milieu α MEM (Gibco, United States) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF) (Biochrom, Germany), 50 UI/ml pénicilline/ 50 μ g/mL streptomycine (P/S) (Invitrogen, France) et 2mM de L-Glutamine (Invitrogen, France).

III.2.1.1.1. Milieu de culture de différenciation ostéogénique

Le milieu de différenciation utilisé était du milieu complet (décrit ci-dessus) auquel avait été ajoutés :

- 100 nM dexaméthasone (Sigma Aldrich, France)
- 10 mM beta-glycérophosphate (Sigma Aldrich, France)
- 50 μ M acide ascorbique (Sigma Aldrich, France)

III.2.1.2 Milieu de culture pour la lignée RAW 264.7

Le milieu de culture complet utilisé pour la culture des cellules RAW 264.7 était du RPMI (Gibco, United States) supplémenté avec 10% de SVF (life technology, France), 1% de pénicilline/ streptomycine (ThermoFisher, France) dans lequel a été ajouté le facteur de différenciation de stimulation des macrophages/*macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF, 25 ng/ml, Biochrom, Germany) qui favorise la fusion cellulaire. Au bout des 7 premiers jours de culture, le milieu a été changé avec un milieu complet contenant les deux facteurs de différenciation: M-CSF mais aussi le facteur de différenciation activateur du récepteur du ligand NFκB/*receptor activator of the NFκB ligand* (RANK-L, 40 ng / mL, Biochrome, Germany) qui lui a spécifiquement induit la différenciation en ostéoclastes.

III.2.1.3 Conditions de culture

Les cellules ont été cultivées en routine dans des flasques 75 cm² (Sarstedt, Germany), dans un incubateur à 37 °C, sous flux de 5% de CO₂ et atmosphère humide. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours. Les cellules ont été passées lorsque la confluence atteignait 80%. Les cellules utilisées pour les évaluations biologiques étaient de passage 3 à 7 maximum. Avant de réaliser l'évaluation biologique, les pastilles ont été nettoyées dans de l'éthanol absolu 1 min sous ultrasons. Elles ont ensuite été stérilisées dans un autoclave 21 min, 121 °C.

Il est important de souligner que pour favoriser l'interaction entre cellules et biomatériaux toutes les pastilles ont été préalablement traitées, c'est-à-dire immergées dans du milieu de culture complet pendant 1 h, avant d'êtreensemencées avec les cellules. Pour réaliser les évaluations biologiques, les cellules ont directement étéensemencées sur les pastilles.

III.2.2. Interaction des cellules au contact des différents biomatériaux

Pour chaque lignée, l'évaluation de la densité cellulaire et de la morphologie des cellules ont été réalisées.

III.2.2.1 Densité cellulaire

III.2.2.1.1. Densité cellulaire des MC3T3-E1

25 000 cellules/cm² ont étéensemencées pour chaque condition. Après 1 h, 24 h ou 48 h de culture, les cellules ont été fixées à la surface des pastilles avec du méthanol glacial pendant 7 min. Les pastilles ont été ensuite rincées avec du PBS 1X. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution de protéines albumine du sérum de bœuf, (BSA, Sigma Aldrich, France) 3% pendant 30 min. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du Hoechst 33342, (Thermofisher, France). Un nombre d'images en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany), significatif et représentatif de la densité cellulaire à la surface de chaque pastille a été réalisé. Le nombre de noyaux équivalent au nombre de cellules par champs a été rapporté au nombre de cellules par cm². Les résultats ont été normalisés par rapport à un contrôle interne : la lamelle de verre, (Thermofisher, France).

III.2.2.1.2. Densité cellulaire des RAW 264.7

1 000 000 de cellules / 1 mL de milieu de culture ont étéensemencées sur chaque pastille. Après 14 jours, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 1 h. Les cellules ont été rincées. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution de BSA 3% pendant 15 min puis les cellules ont été rincées au PBS 1X, (Gibco, United States). Les noyaux ont été marqués au SYTOX (Thermofisher, Germany) et la densité cellulaire a été estimée en comptant le nombre de noyaux par cm².

III.2.2.2 Adhésion cellulaire

III.2.2.2.1. Adhésion des cellules MC3T3-E1

Pour évaluer l'adhésion des deux types de cellules, le cytosquelette d'actine a été mis en évidence par immunofluorescence pour étudier la morphologie des cellules. La technique de dessiccation par contournement du point critique du dioxyde de carbone (CO₂), une technique de préparation des échantillons, a permis d'étudier l'interaction des cellules avec le substrat. Les images ont ensuite été prises

respectivement avec un microscope à épifluorescence et un microscope électronique à balayage.

Approche immunocytochimique

Après avoir fixé les cellules dans du méthanol glacial 7 min. Celles-ci ont été rincées 3 fois au PBS 1X -BSA 3%. Elles ont ensuite été rincées 3 fois au PBS 1X, puis un anticorps anti β actine dilué au 1/1000 dans une solution de PBS 1X / BSA 3% a été hybridé 1 nuit à 4 °C, (anti β actine, Sigma Aldrich, France, référence : A5441, Tableau 26). Après avoir rincé 3 fois la solution contenant l'anticorps primaire avec du PBS 1X, une solution contenant l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome AlexaFluor 488 ou 594, dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS 1X a été déposée sur les cellules pendant 30 min à l'obscurité (ThermoFisher, référence : SA5-10173, Tableau 27). Après avoir été monté dans un milieu de montage, les cellules ont été observées en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany), et 10 images sont réalisées sur plusieurs champs selon les biomatériaux sur lesquels les cellules étaient présentes. Les observations des cellules à la surface des pastilles ont été réalisées pour pouvoir analyser de façon qualitative la morphologie des cellules et leur cytosquelette. La quantification a été réalisée avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Dessiccation par contournement du point critique

Les cellules à la surface des pastilles ont été fixées à 4 °C toute la nuit avec une solution de glutaraldéhyde 2,5%, puis elles ont subi une série de bains dans de l'acétone à concentrations successivement croissantes (30%, 50%, 70%, 80%,90% et 100%) pour commencer l'étape de déshydratation. L'étape de déshydratation des cellules à la surface des pastilles a continué dans un appareil de dessiccation. Les pastilles contenant les cellules à leur surface ont ensuite été placées dans cette chambre à pression. Plusieurs bains avec du CO₂ liquide ont été réalisés pour finaliser la déshydratation, puis l'étape de dessiccation par contournement du point critique du CO₂ a été réalisée pour sécher les cellules à la surface des pastilles en les maintenant à une pression >73,77 bar et à une température >30,98 °C. Des images ont ensuite été réalisées par microscopie électronique à balayage (Jeol JSM-7400F, Japan). Cette

technique a été réalisée sur des cellules cultivées sur les pastilles pendant 1 h et pendant 48 h.

III.2.2.2.2. Adhésion des cellules RAW 264.7

De même que précédemment les caractéristiques morphologiques des cellules RAW 264.7 ont été analysées par la technique d'immunofluorescence et par dessiccation, contournement du point critique du CO₂.

Approche immunocytochimique

Après 14 jours, les cellules ont été fixées 15 min dans du paraformaldéhyde (PFA), à 3,7%, perméabilisées 5 min dans du triton 0,1%, puis les noyaux ont été marqués avec du SYTOX, (Thermofisher, Germany dilution 1/1000), et la phalloïdine-FITC (Molecular probes, The Netherlands, dilution 1/1000) a permis de marquer les rings d'actine.

Les images ont été prises avec le microscope à épifluorescence (Axiovert Zeiss, Germany). Le nombre total de cellules a pu être analysé par traitement d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Le nombre de cellules multinucléées sur le nombre total de cellules a pu aussi être déterminé (30 champs: 10 champs sur 3 pastilles indépendantes, grossissement X20). Le périmètre des cellules a aussi été analysé (90 cellules au total prises au hasard, soit : 30 cellules sur 3 pastilles indépendantes) en traçant le contour des cellules par traitement d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Dessiccation par contournement du point critique

Les cellules ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde (3%), de sodium cacodylate (0,2 M) et de paraformaldéhyde (3%), (Sigma Aldrich, USA) selon le protocole suivant : (1 mL de 50% de glutaraldéhyde (0,1%), 10 g de paraformaldéhyde, 25 g de sucrose, 500 mL de sodium cacodylate Trihydrate (solution 0,2 M)). Les cellules ont ensuite été déshydratées dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes : 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et 100%. Après la dessiccation par contournement du point critique dans la chambre de dessiccation (sigma aldrich), les cellules ont été analysées par un MEB (Auriga CrossBeam, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

III.2.2.2.3. Adhésions focales des MC3T3-E1

Après 24 h de culture dans le milieu de culture complet, l'adhésion des cellules a été analysée en comptant le nombre d'adhésions focales formées. Deux protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire : l'actine et la vinculine ont été marquées avec les anticorps spécifiques (anti-vinculine, R&D, France, référence : MAB68961 et anti β actine, Sigma Aldrich, France, référence : A5441, [Tableau 26](#)).

Avec la même approche que citée précédemment : après la fixation des cellules au méthanol glacial et la saturation des sites non-spécifiques par la BSA 3%, les deux protéines ont été marquées avec un anticorps spécifiquement dirigé contre les protéines d'intérêt (β actine et vinculin). Deux anticorps secondaires appropriés (chèvre anti lapin IgG, dilution : 1/1000, ThermoFisher, France, référence : A11012 et chèvre anti souris IgG, dilution : 1 goutte/500 μ l, ThermoFisher, France, référence : R37120, [Tableau 27](#)) ont servi à visualiser la fluorescence. Un nombre significatif et représentatif d'images a été réalisé en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany) pour compter le nombre d'adhésions focales par champ. La superposition du marquage actine et vinculine a été considérée comme étant une adhésion focale. Le nombre d'adhésions focales par champ a été ramené au nombre de noyaux sur ce champ pour estimer le nombre moyen d'adhésions focales par cellule.

III.2.3. Biocompatibilité des biomatériaux

III.2.3.1 Viabilité des cellules ostéoblastiques

III.2.3.1.1. Principe de l'expérience du marquage à la calcéine

La calcéine AM (Thermofisher, France) a été utilisée pour mesurer le taux de viabilité des ostéoblastes après 1 h, 24 h et 48 h de culture. Ce test est basé sur le principe de clivage de la molécule de calcéine par les estérases intracellulaires des cellules vivantes. Ces estérases ont clivé le groupe acétométhoxy des molécules de calcéine et ainsi permis le piégeage de la molécule à l'intérieur des cellules vivantes ainsi que l'émission d'une forte fluorescence verte. Le ratio cellules fluorescentes vertes sur noyaux totaux bleus a permis d'estimer le taux de viabilité cellulaire.

III.2.3.1.2. Protocole du marquage à la calcéine

Les cellules cultivées sur les biomatériaux ont été immergées pendant 15 min dans du milieu de culture basal (sans sérum de veau fœtal) supplémenté avec 10 μ M de calcéine AM. En effet, les protéines du sérum de veau fœtal peuvent complexer la calcéine, c'est pourquoi il est important de faire attention à ne pas utiliser de milieu contenant du sérum de veau fœtal pour cette expérience. Les cellules sont restées au contact de la calcéine 15 min dans l'incubateur à 37°C, puis, le milieu a été enlevé. Les cellules ont été fixées avec du méthanol glacial 7 min. Les noyaux ont ensuite été marqués avec du Hoechst 33342 (Thermo scientific, France, dilution 1/1000) pendant 5 min. Les images ont été effectuées avec le microscope à épifluorescence Axio Zeiss. Le traitement d'image a été réalisé sur un nombre significatif et représentatif d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), en comptant tous les noyaux marqués en bleu avec du Hoechst 33342 et les cellules vivantes fluorescentes vertes.

III.2.3.2 Viabilité des cellules ostéoclastiques

III.2.3.2.1. Test WST-8

Le test WST-8, (Sigma, Germany), a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Ce test diffère du test usuel MTT couramment utilisé dans la mesure où il n'est pas toxique et que les sels de formazan produits sont directement solubles dans le milieu de culture. Le principe demeure néanmoins le même. La molécule WST-8 est directement ajoutée sur les cellulesensemencées sur les pastilles (1 000 000 cellules/1 mL/ pastille dans un puits de 4 cm²). Les cellules vivantes vont réduire WST-8 grâce à leur déshydrogénase en sel de formazan orange. L'absorbance directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes a été mesurée dans un lecteur de plaque à 450 nm, (Phomo, Anthos Mikrosytème, Germany).

III.2.4. Étude de la mort des cellules MC3T3-E1

Le taux d'apoptose à la surface des biomatériaux a été calculé. A la suite de toutes les étapes d'immunocytochimie citées précédemment, à savoir : fixation des cellules avec du méthanol glacial, saturation avec de la BSA 3% et rinçage des cellules au PBS 1X ; les éventuelles cellules apoptotiques ont été marquées avec un anticorps anti caspase

3 clivée diluée au 1/400 dans la BSA 3% (Ozyme, France), Tableau 26). Un anticorps secondaire spécifique a également été utilisé pour révéler la fluorescence (chèvre anti lapin IgG, dilution : 1/1000, ThermoFisher, référence : A11012 Sigma Aldrich, France, Tableau 27). L'ensemble des noyaux a été marqué au Hoechst 33342 (Thermo scientific, France, dilution 1/1000) pendant 5 min. Le ratio cellules apoptotiques sur cellules totales a permis d'estimer le taux d'apoptose à la surface d'un biomatériau.

III.2.5. Test d'activité métabolique des RAW 264.7

Le métabolisme cellulaire a été estimé en quantifiant l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase, (LDH), des cellules adhérant aux biomatériaux. Un kit (Sigma, Germany) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après avoir enlevé le surnageant cellulaire et par conséquent les cellules mortes n'adhérant plus aux biomatériaux, les cellules vivantes adhérant aux biomatériaux ont été lysées avec une solution de lyse non dénaturante : (TRITON-1X, sucrose 5 % dans du PBS). Le lysat cellulaire a directement été mélangé au substrat. L'activité enzymatique a été réalisée par la conversion chimique du lactate en pyruvate (Figure 32). Le changement de forme par oxydation de la molécule se caractérise par le changement d'absorbance de la molécule. La quantité de réaction enzymatique a donc été estimée par le niveau d'absorbance mesuré à 490-690 nm dans un spectrophotomètre UV-VIS spectrometer (SPECORD 40 BU, analytik jena AG, Germany).

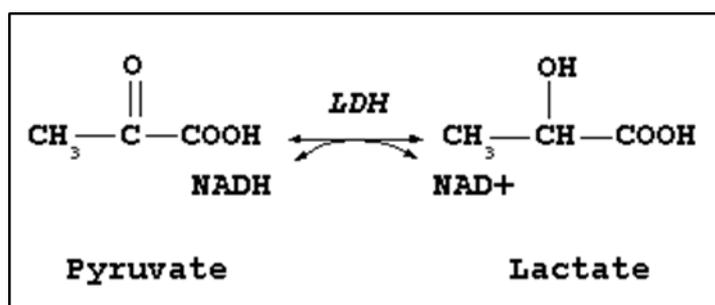


Figure 32 : principe de la réaction enzymatique de la lactate déshydrogénase.

L'enzyme LDH a converti la formation réversible par oxydation/réduction du pyruvate/lactate sous l'action de cofacteur/coenzyme : la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

III.2.6. Tests fonctionnels

III.2.6.1 Prolifération des cellules MC3T3-E1

Après 24 h de culture, le kit d'imagerie EdU (thermofisher, France) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Le réactif a été mis à incuber pendant 4 h avec les cellules. Le principe est basé sur l'intercalation de base analogue à la Thymine : EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé par les cellules en prolifération. L'émission de fluorescence a été permise grâce à une réaction de chimie-click, dans le noyau des cellules proliférantes ayant intégré cette base dans leur ADN. Un nombre significatif et représentatif d'images a également été réalisé par microscopie à épifluorescence, (Axio Zeiss, Germany). L'ensemble des noyaux a été compté et le rapport noyaux totaux (bleus et verts) et noyaux de cellules en prolifération (verts) a permis d'estimer le taux de prolifération.

III.2.6.2 Prolifération des cellules RAW 264.7

La prolifération des cellules ostéoclastiques a été estimée par l'incorporation de la molécule BromodeoxyUridine, (5-Bromo-2-DeoxyUridine, BrdU), anticorps analogue à la base thymidine dans l'ADN en réplication (phase S) du cycle cellulaire. Un kit a été utilisé, selon les recommandations du fabricant, (Roche Molecular diagnostics, Germany). Les réactifs ont directement été ajoutés sur les cellulesensemencées sur les pastilles, (1×10^6 pour 1 mL par pastille) et après 30 min, l'absorbance a été mesurée à 450 nm, dans un lecteur de plaque, (Phomo, Anthos Mikrosyteme, Germany). Le taux de prolifération est proportionnel à la quantité de coloration mesurée.

III.2.6.3 Différenciation des cellules ostéoblastiques

La différenciation cellulaire a été estimée en mesurant l'activité enzymatique de l'alcaline phosphatase et en étudiant l'expression des protéines et de gènes exprimés spécifiquement au cours de la différenciation : ALP, ostéopontine, collagène I, RUNX 2, ostéoclastine (Beck et al., 2001) ([Figure 4](#)).

Afin de réaliser ces expériences d'études d'expression génique et protéique, des pastilles ($\varnothing 18$ mm) ont été utilisées dans des boîtes de culture de 6 puits. L'objectif

était de récupérer les protéines et les ARN des cellules ensemencées directement sur la pastille mais aussi les protéines au fond des puits sur des cellules qui n'étaient pas en interaction directement sur la pastille (Figure 33).

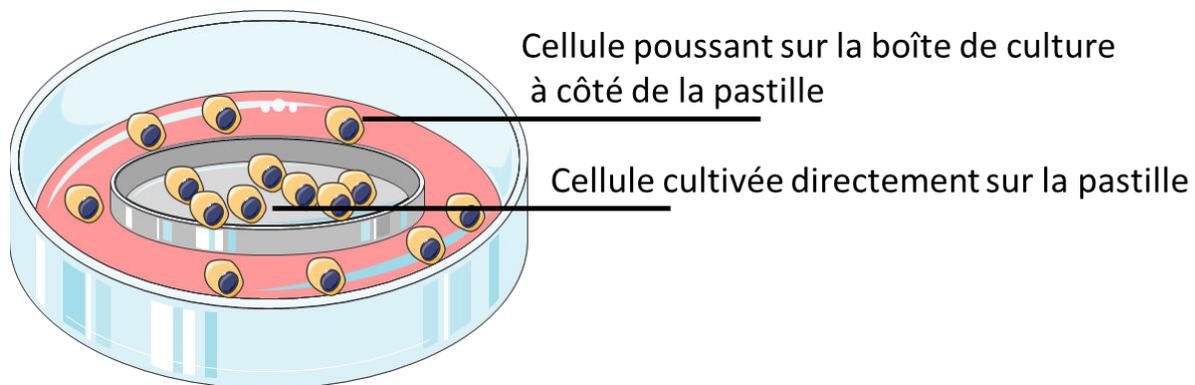


Figure 33 : plan de recherche pour étudier la différenciation cellulaire ostéoblastique

Une méthode efficace d'extraction a été utilisée pour extraire en une fois les protéines et les ARNs du même échantillon expérimental selon les travaux de Morse *et al*, (Morse *et al.*, 2006).

Cette méthode permet de réduire la quantité de matériel biologique ainsi que le nombre de biomatériaux utilisés. En plus de réduire les efforts expérimentaux et du gain de temps, elle permet également de simplifier l'interprétation des résultats en évitant les biais dus aux variations expérimentales. L'extraction d'ARNs a été réalisée avec un kit commercial (RNeasy, Sigma Aldrich) mais au lieu de jeter l'éluat comme d'habitude, il a été récupéré et congelé à -20°C pour faire précipiter les protéines. Les protocoles sont détaillés ci-dessous.

III.2.6.3.1. Etude de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique par qRT-PCR

L'ARN des cellules a été extrait avec un kit d'extraction d'ARN RNeasy® Plus Micro (Qiagen, France). Les cellules ont été rincées une fois en PBS 1X. Selon les recommandations du fabricant, un tampon de lyse enrichi en β -mercaptoéthanol a permis de lyser les cellules tout en protégeant les ARN de la dégradation.

Le lysat récupéré a été placé sur des colonnes « gDNA eliminator » et centrifugé à 17 000g pendant 50 s. L'ADN génomique a été ainsi piégé et l'éluat contenant les protéines a été sauvegardé pour étudier l'expression protéique des cellules.

Un volume identique d'éthanol 70% a été rajouté à l'éluat pour faire précipiter les acides nucléiques. Le mélange a été placé sur une colonne « RNA microspin » et le tout a été centrifugé à 17 000g pendant 30 s (à cette étape les éluats contenant les protéines ont été conservés à -20°C). L'ARN ainsi piégé dans ces colonnes a été lavé 3 fois puis élué à l'aide de 14 µL d'eau distillée. Les ARNs ont été dosés par spectrophotométrie à 230, 260 et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop2000, (ThermoFisher, France) et conservés à -20°C.

L'étape de qPCR se réalise à partir de l'ADNc. Après l'extraction d'ARN, une étape intermédiaire de RT-PCR a permis d'obtenir les ADN complémentaires, (ADNc), de l'ARN extrait. Cette réaction a été réalisée avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France), dans un thermocycler, (Techne Prime Thermal cyclers, UK). La qPCR a ensuite été réalisée avec des sondes Taqman spécifiques (Applied Biosystem) ([Tableau 25](#)) et un Kit Taqman Fast Universal PCR Master mix 2X (Applied Biosystem) sur la base du protocole du fabricant.

Nom des gènes	références sondes et amorces TaqMan
<i>RUNX2</i>	Mm00501584_m1
<i>Col1a2</i>	Mm004833888_m1
<i>ALP</i>	Mm00475834_m1
<i>18S</i>	Mm039228990_g1
<i>Actb</i>	Mm00607939_s1
<i>GAPDH</i>	Mm99999915_g1

Tableau 25 : liste des gènes utilisés pour la qPCR (TaqMan Applied Biosystem).

18S, Actb et GAPDH sont les gènes de ménages utilisés pour normaliser l'expression génique

III.2.6.3.1.1. Méthode de quantification de l'expression génique

Premièrement, les cycles seuils « *cycle threshold* » (Ct) des gènes ont été soustraits au Ct du gène de ménage variant le moins entre les conditions : c'est le ΔCt . Deuxièmement, le Ct d'une référence interne (la lamelle de verre), a été soustrait au ΔCt obtenu précédemment : c'est le $\Delta\Delta Ct$. La quantification relative (RQ) des gènes d'un échantillon est déterminée par la formule $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le gène choisi comme gène

de ménage pour normaliser les échantillons est le gène 18S qui ne varie pas quelque soit les conditions.

III.2.6.3.2. Etude de l'expression des protéines impliquées dans la différenciation ostéoblastique par western blot

Le premier éluat récupéré lors de l'extraction d'ARN a été congelé au minimum 24 h à -20°C pour faire précipiter les protéines. Un culot blanchâtre s'est formé témoignant de la présence des protéines. Après centrifugation (17 000g - 15 min à 4°C), le surnageant a été jeté et selon le protocole de (Morse et al., 2006), de l'éthanol absolu à -20°C a été ajouté sur les culots précipités pour les laver. Cette étape de lavage a été réalisée 3 fois. Le surnageant a été jeté et le culot mis à sécher toute une nuit à température ambiante.

Quant aux cellules autour de la pastille, elles ont été lysées avec du tampon Laemmli (1X)* (Laemmli, 1970).

Tous les lysats cellulaires ont ensuite été resuspendus dans du tampon de charge* pour visualiser la migration des protéines sur gel d'acrylamide (Biorad, France).

Les extraits protéiques en tampon Laemmli 1X ont été passés au sonificateur pour casser l'ADN et dosés par la méthode de Lowry*, (une méthode de dosage insensible aux détergents), avec un kit, (Dc protein assay, Biorad, France), selon les recommandations du fabricant.

Les protéines issues de l'éluat n'ont pas été dosées car il a été estimé que les cellules ont étéensemencées de façon identique sur toutes les pastilles et que cette méthode ne permet pas un résultat précis de la quantification, du fait de la difficulté de resuspension du culot protéique. Pour pouvoir comparer les conditions entre elles, un contrôle interne, la détection d'une protéine dite de ménage, (β -actine), a été utilisé pour normaliser les résultats.

Les lysats protéiques dilués au 1/4 dans le tampon de charge ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Precision plus protein™ dual color standard biorad) ont été chargés dans des gels de polyacrylamide (gradient 4-15% - Biorad) et séparés par électrophorèse dans du tampon de migration (1X)* (Biorad) à 110 V - 5 min puis 130 V - 55 min.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinyl difluoride), de porosité 0,45 µm, préalablement activée dans de l'éthanol absolu pendant 2 min, selon le principe en semi sec dans du tampon de transfert*, (Biorad), pendant 7 min à 25 V.

Le transfert des protéines sur membrane a été vérifié avec du rouge ponceau*. Les sites antigéniques aspécifiques ont été saturés en TBS 1X* - Tween 20 à 0.05%v/v - BSA 5%_{m/v}. Les membranes ont ensuite été hybridées avec les anticorps primaires* d'intérêt (Tableau 26), pendant une nuit à 4°C, sur un agitateur à rouleau. Les membranes sont rincées 3 fois au TBS 1X et hybridées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires correspondants (Tableau 27). Certaines membranes ont été déshybridées avec du tampon de déshybridation* pour la révélation d'autres protéines d'intérêt.

Les protéines d'intérêt ont été révélées par une réaction chimioluminescente avec un réactif, (clarity western ECL substrate Biorad), selon les recommandations du fabricant.

Marque	Espèce productrice	Espèce reconnue	Poids moléculaire (KDa)	Protéine reconnue	clonalité	dilution
Western Blot						
R&D system	Chèvre	Souris	75	ALP	polyclonale	1/200
Sigma Aldrich	Souris	Souris	45	Actine	monoclonale (AC10)	1/10000
ABCAM	Lapin	Souris	35	Ostéopontine	monoclonal (EPR3688)	1/1000
ABCAM	Lapin	Souris	57	RUNX2	polyclonale	1/1000
Immunocytochimie						
R&D, France, MAB68961	Lapin			Vinculine	M (728513),	1/300
Sigma Aldrich A5441	Chèvre			β actin	M (AC-15)	1/1000
Ozyme #9661	Lapin			Caspase 3 clivée (Asp175)	Polyclonale	1/400

Tableau 26 : liste des anticorps primaires utilisés

Marque	Espèce productrice	Espèce reconnue	Anticorps secondaires	dilution
Western Blot				
DAKO	Lapin	Chèvre	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
DAKO	Chèvre	Souris	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
DAKO	Chèvre	Lapin	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
Immunocytochimie				
ThermoFisher, A11012	Chèvre	Lapin IgG	conjugaison : AF594P	1/1000
ThermoFisher, SA5-10173	Chèvre	Souris IgG	AlexaFluor 488 ou 594	1/2000
ThermoFisher, R37120	Chèvre	Souris IgG	conjugaison : AF488P	1 goutte/500µL

Tableau 27 : liste des anticorps secondaires utilisés

Les western blots ont été quantifiés par traitement d'images en mesurant l'intensité de chemiluminescence avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les résultats sont normalisés par la protéine d'intérêt, la β -actine.

III.2.6.3.3. **Activité enzymatique de l'alkaline phosphatase au cours de la différenciation des cellules ostéoblastiques**

Après 24 h de culture, les protéines totales des 25 000 cellules / cm² de chaque condition d'analyses ont premièrement été extraites avec un tampon non dénaturant (PBS triton 0.1%). Le test a été réalisé selon les instructions du fabricant avec quelques modifications apportées (Sigma Aldrich). Le substrat p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) a été ajouté sur les protéines totales. La réaction a été mise à métaboliser à l'abri de la lumière et à 37°, 12 h. Le lendemain, la réaction a été stoppée avec de la soude 37%. L'absorbance a été mesurée dans un lecteur de plaque, (OPTIMA Reader), à 405 nm. Pour être en mesure de comparer tous les résultats et avoir des quantités comparables de protéines analysées pour chaque condition, chaque résultat obtenu pour l'activité enzymatique a été normalisé par la concentration en protéines totales correspondante.

III.2.6.4 Différenciation des cellules ostéoclastiques

III.2.6.4.1. Coloration des cellules positives à la phosphatase acide résistante à l'acide tartrique (TRAP)

L'état de différenciation des cellules a été mesuré de façon qualitative avec un marquage de l'enzyme TRAP exprimé par les ostéoclastes. Un kit, (Sigma Aldrich), a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ensemencées sur les pastilles, (1 000 000 cellules/1mL/pastille/dans un puits de culture 4 cm²), ont été fixées avec le réactif fixateur à température ambiante, rincées trois fois à l'eau distillée, puis incubées avec le substrat chromogène. Les cellules ont été rincées à l'eau distillée, puis, la coloration marron reflétant l'expression de TRAP a été analysée au microscope optique, (Axiovert Zeiss).

III.2.6.4.2. Activité enzymatique de TRAP 5b des cellules ostéoclastiques

L'état de différenciation des cellules a également été mesuré de façon quantitative, en réalisant des tests de quantification de l'activité enzymatique de TRAP.

Premièrement, la quantité de protéine totale a été mesurée. Après lyse des cellules avec un tampon non dénaturant (TRITON-1X, sucrose 5 % dans une solution de PBS 1X), les protéines totales contenues dans le lysat ont été détectées et quantifiées par la méthode de Bradford * (Sigma Aldrich). Pour réaliser le test enzymatique, 50 µL du lysat protéique ont été incubés avec le substrat spécifique de TRAP, à savoir, 2,5 mM de naphthol-ASBI-phosphate dissout dans 100 mM d'acétate de sodium et 50 mM de tartrate dissodium, (Sigma, Germany). Différents tests ont été réalisés à différents pH : 6,1 ; 4,9 et 5,5. Cependant, le mélange a été ajusté à pH 6,1 pour améliorer la spécificité de la réaction pour l'isoforme 5b de l'enzyme selon les travaux de Janckila (Janckila et al., 2001). En effet, cet isoforme réagit à un pH optimum plus élevé avoisinant les valeurs de 6 et est retrouvé dans l'os et le sérum agissant comme un marqueur de l'activité ostéoclastique et donc de la résorption osseuse, contrairement à l'isoforme TRAP5a. Après incubation du mélange réactionnel à 37°C, 12 h, à l'abri de la lumière, la réaction a été stoppée avec 0,1 mM de NaOH et l'absorbance mesurée à 405 nm dans un lecteur de plaque. Le résultat obtenu a été normalisé par la concentration totale en protéine préalablement mesurée pour chaque échantillon.

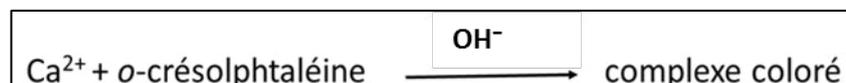
III.2.7. Dissolution et précipitation

III.2.7.1 Mesure de la quantité en calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoblastique

Pour évaluer l'influence de la libération en ions calcium, phosphore et silicium dans le milieu sur l'activité cellulaire, des mesures en éléments calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture ont été effectuées par la technique ICP/OES, (ICP/OES, Optima DV 8300). Cette opération consiste à collecter au bout d'1h, 24h ou 14 jours, le surnageant de milieu de culture dans lequel ont baigné soit des pastilles sans cellule, ou des pastilles sur lesquelles ont été cultivées des cellules (25 000 cellules/cm²). Le surnageant a été dilué au 1/10 dans de l'eau distillée et passé sous flamme, dans l'appareil ICP/OES. Les résultats obtenus sont analysés et comparés avec une courbe étalon de concentrations connues en éléments calcium, phosphore ou silicium.

III.2.7.2 Mesure de la quantité en calcium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoclastique et mesure du pH

La quantité de calcium présent dans le milieu de culture a été mesurée aux cinétiques de 7 et 14 jours. Un kit de quantification du calcium, fondé sur l'interaction du calcium avec la crésolphtaléine a été utilisé, (Sigma, Germany), selon les recommandations du fabricant. Le principe repose sur la formation d'un composé coloré formé en milieu alcalin, lorsque le calcium va se lier à la crésolphtaléine.



L'intensité de la couleur a été mesurée à 540 nm, dans un lecteur de plaque (platye reader Phomo, Anthos) et estimée selon une courbe étalon, réalisée avec une solution standard de concentration connue. L'intensité de la couleur formée est directement proportionnelle à la concentration de calcium présente dans l'échantillon testé.

Le pH du surnageant de culture cellulaire collecté après 7 et 14 jours à également été mesuré avec une microsonde, (Mettler Toledo apparatus), aussitôt après la collecte, pour éviter l'oxydation du milieu de culture.

III.2.8. Test ELISA en vue de la détection de la protéine VEGF-A sécrétée par les cellules RAW 264.7

Les surnageants des cultures cellulaires contenant les pastilles et les cellules RAW 264.7 ont été récoltés pour réaliser un test ELISA afin de détecter la sécrétion de protéines VEGF-A par les cellules RAW 264.7. Brièvement, Les tests « ELISA » (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilisent des plaques de microtitrage à puits multiples, revêtues d'anticorps de capture, pour capturer des protéines solubles. Les protéines liées sont ensuite détectées avec un anticorps de détection subséquent, qui est typiquement marqué avec une enzyme, ou biotinylé, puis suivi d'un conjugué streptavidine-enzyme. Un substrat colorimétrique est alors ajouté, ce qui entraîne un changement de couleur basé sur la quantité d'antigène capturé. En utilisant un lecteur de plaques et en traçant les valeurs résultantes sur une courbe standard, des valeurs quantitatives précises peuvent être obtenues. Le test a été réalisé selon les recommandations du fabricant (Test ELISA VEGF-A, Biolegend, United States). La lecture de l'absorbance a été réalisée à 450 nm. La quantification a ensuite été réalisée par régression linéaire à l'aide de logiciel Origin Pro 8.

III.3. Analyses statistiques

III.3.1. Anova

L'ANOVA permet de comparer les paramètres biologiques entre eux selon les conditions de culture.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel origine pro 8.

Un test statistique d'analyse entre groupes a été réalisé : le test ANOVA ONE WAY suivi du test *post hoc* de Fisher.

Les différences sont estimées significatives pour $p < 0,05$ (*) ; $p < 0,01$ (**) ; et $p < 0,001$ (***).

III.3.2. Analyses en composantes principales (ACP)

Les analyses en composantes principales ont été réalisées à partir du logiciel PAST version 2.73.

Design de l'analyse ACP

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des évaluations biologiques MC3T3-E1 a été réalisée avec les 12 variables suivantes :

- Apoptose 24h (n=30 minimum)
- Viabilité 1 h (n=30 minimum)
- Viabilité 24 h (n=30 minimum)
- Viabilité 48 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 1 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 24 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 48 h (n=30 minimum)
- Contact focaux 24 h (n=30 minimum)
- Prolifération 24 h (n=30 minimum)
- ALP 24 h (n=6)
- Surface cellulaire 1 h (n=30 minimum)
- Concentration protéique totale 24 h (n=6)

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des évaluations biologiques RAW 264.7 a été réalisée avec les 11 variables suivantes :

- Nombre de cellules à 2 noyaux (n=30 minimum)
- Nombre de cellules à 3 noyaux (n=30 minimum)
- Nombre de cellules à 4 noyaux (n=30 minimum)
- Concentration en VEGF-A 7 jours (n=6)
- Concentration en VEGF-A 14 jours (n=6)
- Viabilité LDH (n=6)
- Viabilité WST-8 (n=6)
- Prolifération (n=6)
- Densité cellulaire (n=30 minimum)
- Différenciation TRAP 5b (n=6)
- Périmètre des rings d'actine

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des concentrations calciques du milieu de culture des MC3T3-E1 en fonction des propriétés physico-chimiques a été réalisée avec les 13 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)
- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)
- Calcium 1 h avec cellules (n=3 minimum)
- Calcium 1 h sans cellule (n=3 minimum)
- Calcium 24 h avec cellules (n=3 minimum)
- Calcium 24 h sans cellule (n=3 minimum)
- Calcium 14 jours sans cellule (n=3 minimum)

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des concentrations calciques du milieu de culture des RAW 264.7 en fonction des propriétés physico-chimiques a été réalisée avec les 12 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)
- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)
- Calcium 7 jours avec cellules (n=6 minimum)
- Calcium 7 jours sans cellule (n=6 minimum)
- Calcium 14 jours sans cellule (n=6 minimum)
- Calcium 14 jours avec cellules (n=6 minimum)

Chapitre IV

Résultats et discussions

Chapitre IV. Résultats et discussions

IV.1. Etude de l'influence de la composition chimique et de la microstructure de céramiques de phosphate de calcium sur la réponse cellulaire ostéoblastique et ostéoclastique : approche statistique par analyse en composantes principales

IV.1.1. Contexte et objectif de l'étude

La compréhension de la régénération osseuse au niveau cellulaire et moléculaire a beaucoup évolué, et est toujours en cours. Par contre, l'influence de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux sur la réponse cellulaire est encore mal comprise. Dans la mesure où les conclusions sur l'efficacité d'une substitution ionique et particulièrement en silicium et en carbonate ainsi que l'influence de la microstructure sur l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes divergent, l'objectif de cette partie est de savoir si l'on pourra être en mesure de discriminer l'influence de la microstructure et de la composition chimique des 6 céramiques de phosphate de calcium synthétisées sur l'activité cellulaire. Pour ce faire, des analyses ACP ont été utilisées. Cela permet de sortir des tendances globales sur ce qui peut être corrélé, ce qui peut être inversement corrélé et savoir ce qui pourra être comparé ou non et méritera d'être étudié plus en détail dans les parties suivantes.

IV.1.1.1 Approche expérimentale

Etant donné que deux types cellulaires, (MC3T3-E1 et RAW 264.7) et plusieurs points de cinétique ont été utilisés, ([Figure 34](#)), les analyses ACP ont été réalisées en sélectionnant les résultats des évaluations biologiques, propres à chaque type cellulaire, afin de rendre l'information lisible et d'essayer d'en tirer le plus de corrélations possibles. En plus des analyses ACP réalisées avec les évaluations biologiques, deux analyses ACP ont été réalisées en prenant respectivement en compte les mesures de concentration calcique du milieu de culture des 6 biocéramiques, cultivées ou non avec les MC3T3-E1 et du milieu de culture des 6

biocéramiques, cultivées ou non avec les RAW 264.7. Cela, afin de tenter de corrélérer les réponses biologiques des cellules avec les concentrations en calcium du milieu. En effet, comme énoncé précédemment, les biocéramiques de phosphate de calcium libèrent du calcium dans l'environnement, communément reconnu pour réguler l'activité cellulaire de façon dose dépendante.

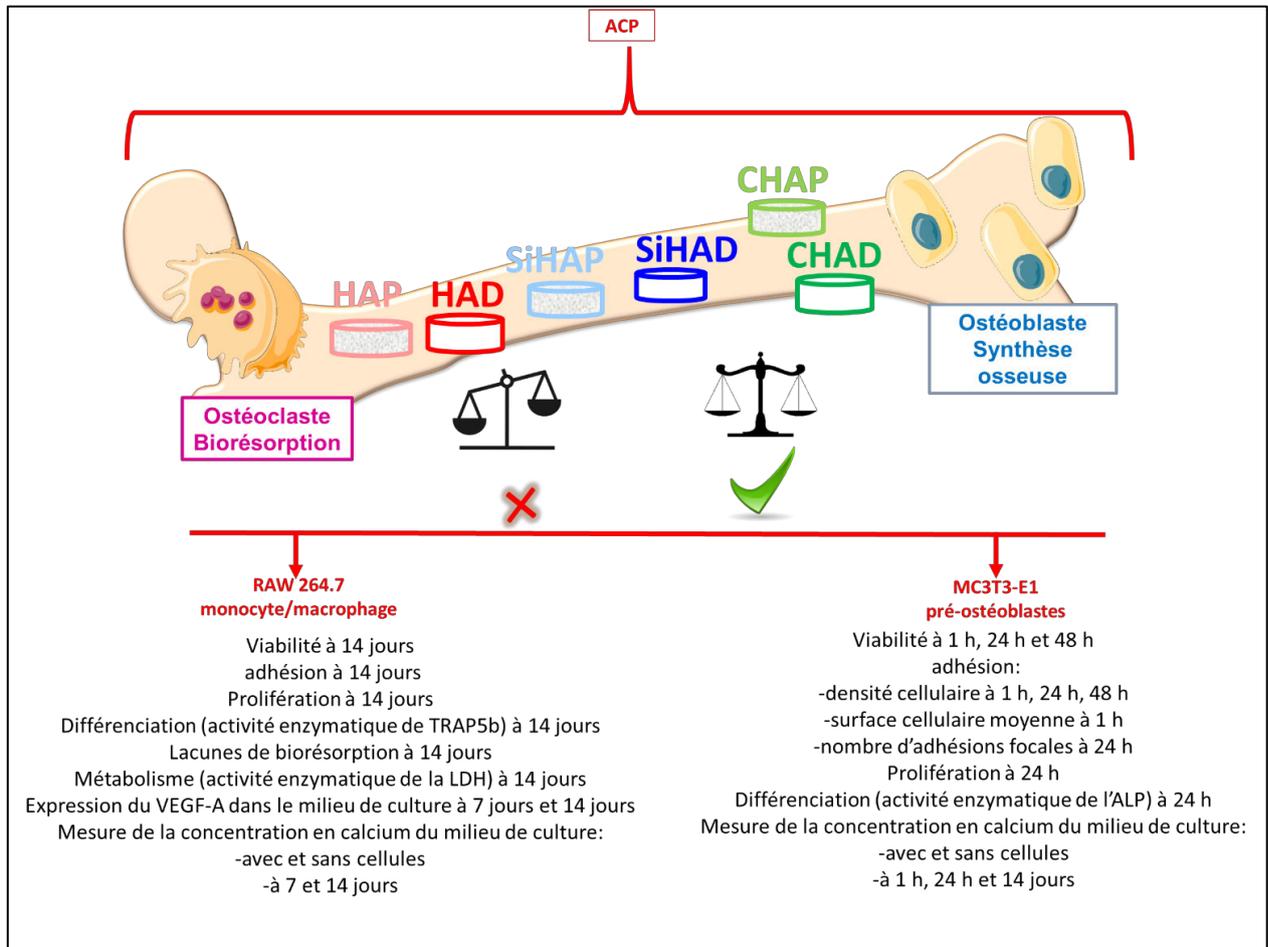


Figure 34 : plan expérimental des évaluations biologiques pour étudier la réponse cellulaire ostéoblastique et ostéoclastique aux 6 biocéramiques

Dans cette première approche, les résultats individuels de chaque caractérisation ne seront pas analysés en détail. Ils le seront dans les paragraphes IV.2 à IV.4 qui suivent. Seules les grandes tendances seront précisées ici.

IV.1.2. Réponse cellulaire ostéoblastique

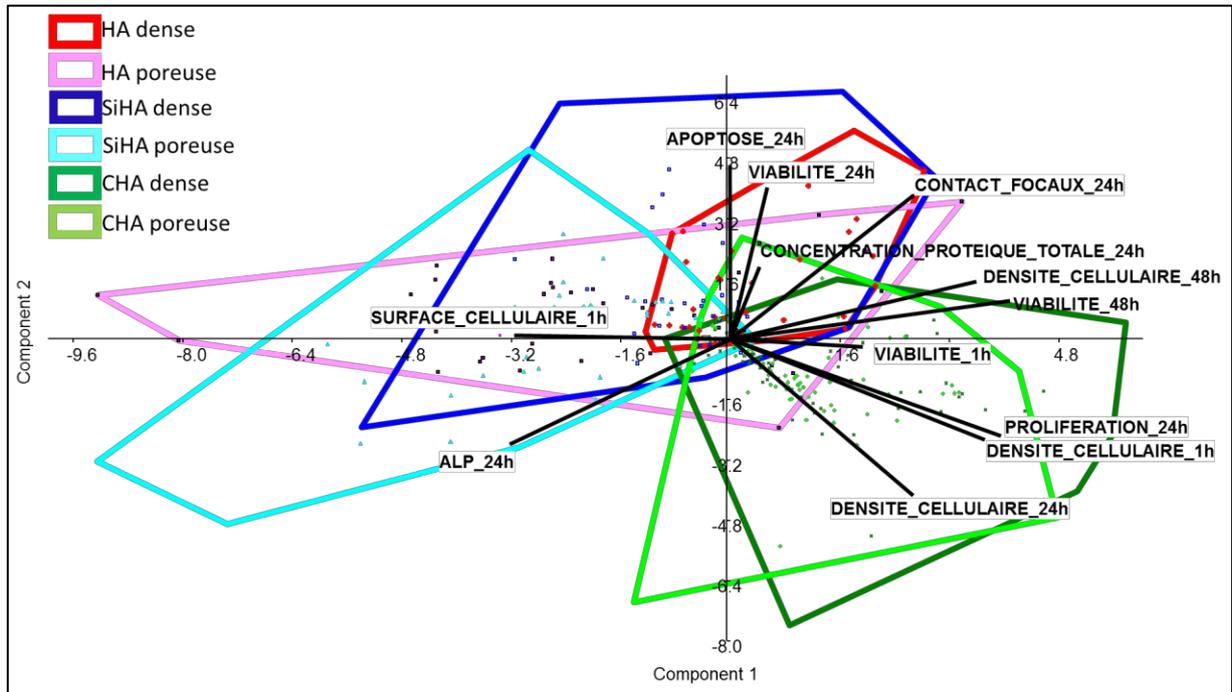


Figure 35 : réponse biologique des ostéoblastes aux 6 biocéramiques

La courbe de décroissance des composantes principales et la matrice finale de corrélation variables-composantes principales a permis de confirmer que l'on peut négliger les autres composantes à partir de la 3ème composante et ne garder que les deux composantes principales, donc rester en 2 dimensions, sur deux axes. Ces deux axes traitent 88 % de l'ensemble des informations (Annexe 10).

En fonction de l'orientation préférentielle des enveloppes, les groupes **CHA dense** et **CHA poreuse** présenteraient des comportements différents par rapport aux autres groupes. Une réponse biologique sera donc spécifique de ces deux biomatériaux comparée à tous les autres biomatériaux. L'orientation des vecteurs : densité cellulaire à 24 h, densité cellulaire à 1 h, prolifération cellulaire à 24 h, viabilité à 1 h, viabilité à 48 h et densité cellulaire à 48 h, laisse suggérer que ces réponses biologiques seront très certainement différentes sur ces biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure, comparées aux autres biomatériaux.

Cependant, les enveloppes de CHA dense et CHA poreuse se chevauchent dans leur quasi-totalité, laissant suggérer un comportement cellulaire identique sur ces deux

biomatériaux CHA, indépendamment de la microstructure. Cela est en adéquation avec les analyses ACP réalisées sur les caractéristiques physico-chimiques des 6 biocéramiques qui déjà laissent présumer qu'il serait compliqué de distinguer le rôle de la microstructure pour ces deux biomatériaux (Figure 29).

Les quatre autres enveloppes sont moins bien dissociées. Ces 4 autres groupes partageront probablement des réponses biologiques communes. Néanmoins, en fonction de l'orientation des vecteurs, il a été possible d'identifier un deuxième groupe. Il s'agit de **SiHA poreuse** et **HA poreuse**, qui ont des enveloppes orientées préférentiellement vers la même direction. Cela laisse penser que ces deux biomatériaux présenteront des réponses biologiques spécifiques, dues à leur microstructure poreuse commune.

SiHA dense possède une enveloppe avec une zone de recouvrement très étendue qui chevauche les enveloppes SiHA et HA poreuses, mais aussi HA dense. Par conséquent, cela signifie que le matériau SiHA dense partagera des caractéristiques communes avec SiHA poreuse et HA poreuse, mais aussi avec HA dense. Si les biomatériaux SiHA denses et poreuses partagent des caractéristiques communes on peut penser que le silicium est intervenu de façon spécifique dans la réponse cellulaire. L'orientation du vecteur surface cellulaire à 1 h laisse présumer que ce paramètre biologique est influencé par les biomatériaux SiHA denses et SiHA poreuses.

HA dense est un autre groupe à distinguer car son enveloppe plus étroite touche principalement l'enveloppe SiHA dense. Ce matériau partagerait davantage de caractéristiques communes avec SiHA dense. Cela laisse supposer que la microstructure dense, indépendamment de la composition chimique HA ou SiHA, influencera le comportement cellulaire notamment en ce qui concerne les contacts focaux au regard de l'orientation du vecteur associé à ce paramètre.

D'après cette analyse ACP, l'influence de la microstructure dense et poreuse et de la composition chimique, (substitution en ion silicate ou carbonate), pourra être possible à discriminer sur certains paramètres biologiques évalués.

L'analyse plus en détail des réponses biologiques, permet de constater que la surface cellulaire à 1 h est inversement corrélée à la viabilité cellulaire à 1 h, à la densité cellulaire à 1h, 24 h et 48 h et à la prolifération à 24 h. Il peut également être constaté que l'activité enzymatique de l'ALP à 24 h, est inversement corrélée à l'adhésion focale

à 24 h, à la viabilité à 1 h et à 48 h, à la prolifération à 24 h et à la densité cellulaire à 1 h, 24 h et 48 h. En revanche, une corrélation entre la densité cellulaire et la prolifération a été constatée, puisque les vecteurs sont parallèles.

IV.1.3. Réponse cellulaire ostéoclastique

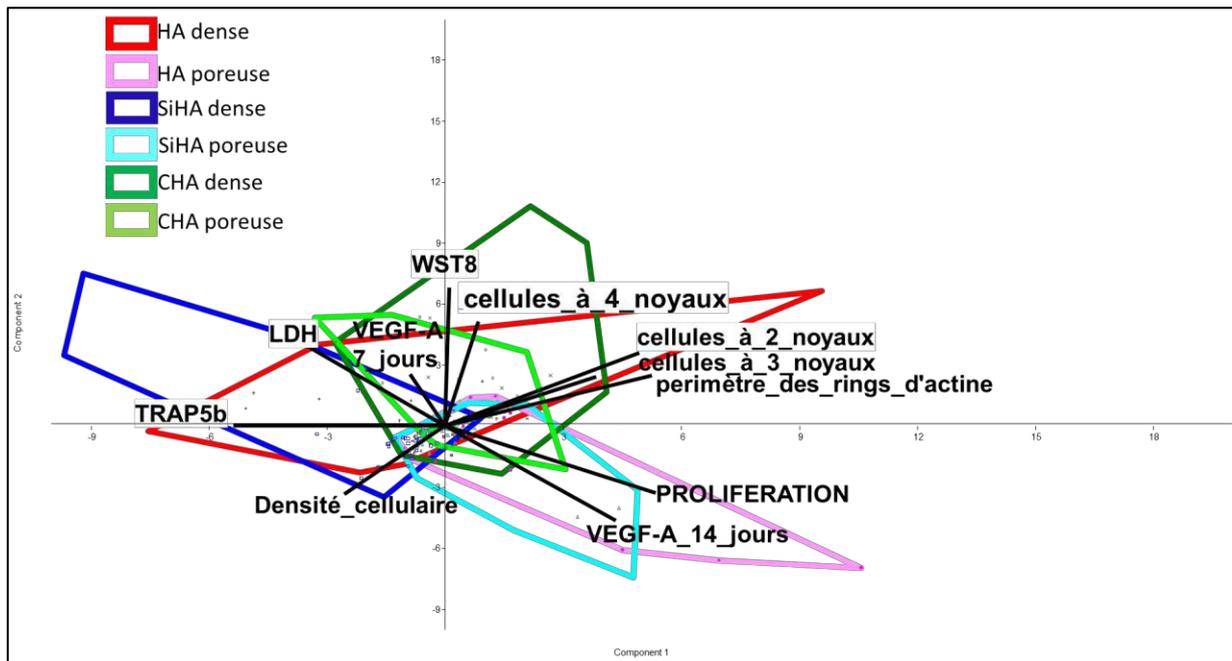


Figure 36 : réponse biologique des ostéoclastes aux 6 biocéramiques

La courbe de décroissance des composantes principales et la matrice finale de corrélation variables-composantes principales a permis de confirmer que l'on peut négliger les autres composantes à partir de la 3^{ème} composante et ne garder que les deux composantes principales, donc rester en 2 dimensions, sur deux axes. Ces deux axes traitent 88 % de l'ensemble des informations (Annexe 12).

L'analyse prenant en compte les réponses biologiques des ostéoclastes, a permis la distinction d'un groupe en particulier : **SiHA poreuse** et **HA poreuse**. Comme précédemment, l'orientation commune de ces deux enveloppes laisse supposer qu'elles partageront des réponses biologiques de façon spécifique et différente des autres groupes. L'orientation des vecteurs : prolifération et VEGF-A à 14 jours, laisse penser que ces réponses biologiques seront propres à ces biomatériaux.

HA dense et **SiHA dense** semblent être un autre groupe. Ces deux biomatériaux partageront des réponses biologiques similaires et différentes des autres groupes. Un effet de la microstructure dense, influencerait les réponses biologiques. L'orientation du vecteur TRAP 5b laisse supposer que ce sera son cas.

CHA dense et **CHA poreuse** semblent être un autre groupe qui se comporterait de façon différente des deux autres groupes. La réponse cellulaire WST8 semble particulièrement spécifique à ce groupe, étant donné l'orientation du vecteur.

Il est important de constater que ce sont les mêmes groupes qui ont été décrits de l'analyse ACP faite sur les caractéristiques physico-chimiques des 6 variantes de biocéramiques (Figure 29). De la même façon, il sera donc possible de discriminer le rôle de la substitution en silicium et de la microstructure, en comparant respectivement, les groupes SiHA et HA denses et SiHA dense et SiHA poreuse, ou HA dense et HA poreuse. Par contre, l'influence de la microstructure sera compliquée à discriminer pour CHA. En analysant plus en détail les paramètres biologiques évalués, une corrélation inverse entre TRAP 5b (différenciation) et la prolifération a pu être constatée. Une corrélation inverse entre la densité cellulaire et les cellules à plusieurs noyaux a également été constatée. Une autre corrélation inverse entre VEGF-A et TRAP 5b a été constatée. Par contre une corrélation directe a été observée entre la prolifération et l'expression de VEGF-A à 14 jours.

IV.1.4. Corrélation des concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques

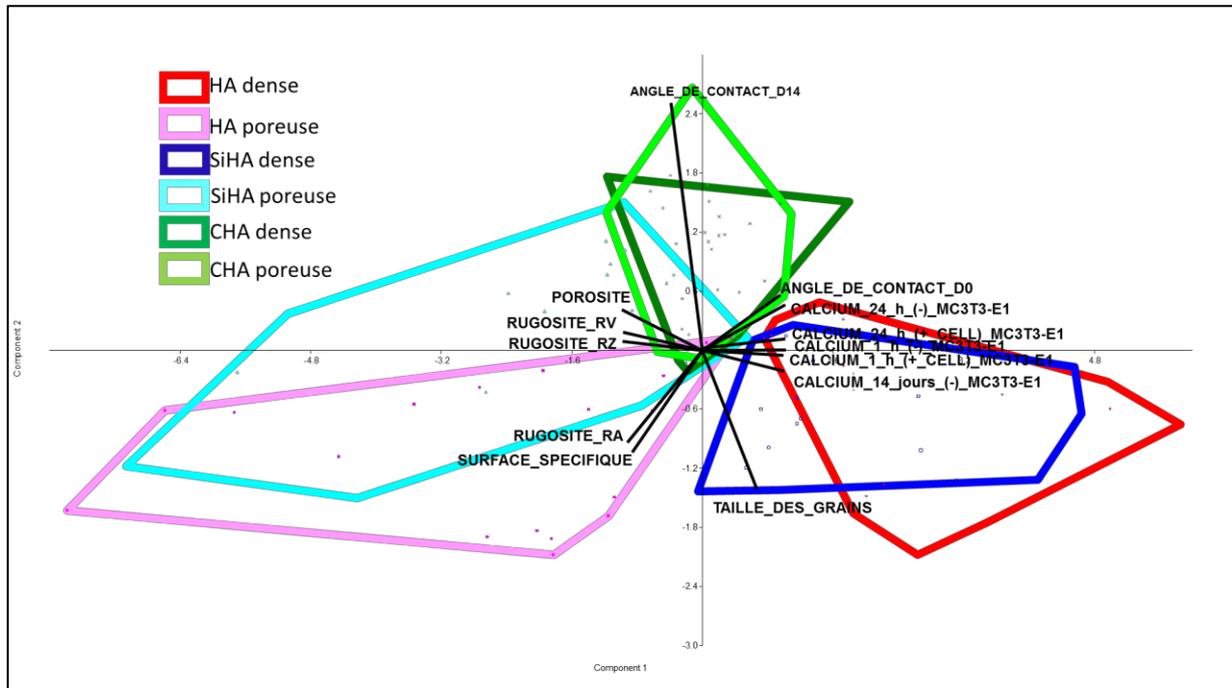


Figure 37 : analyses ACP englobant les valeurs des mesures de la concentration calcique du milieu de culture contenant les 6 biomatériaux cultivés (+) ou non (-) avec les cellules ostéoblastiques.

La courbe de décroissance des composantes principales et la matrice finale de corrélation variables-composantes principales a permis de confirmer que l'on peut bien négliger les autres composantes à partir de la 3^{ème} composante et ne garder que les deux composantes principales, donc rester en 2 dimensions, sur deux axes. Ces deux axes traitent 84 % de l'ensemble des informations (Annexe 14).

Pour les cultures d'ostéoblastes, (Figure 37), 3 mêmes groupes ont pu clairement être identifiés :

- HA poreuse et SiHA poreuse
- HA dense et SiHA dense
- CHA dense et CHA poreuse

Il serait donc possible de discriminer l'influence de la microstructure en comparant HA poreuse et HA dense, ou bien SiHA dense et SiHA poreuse. Le rôle du silicium pourra également être déterminé, en comparant HA dense et SiHA dense. Par contre,

l'influence de la microstructure ne pourra être a priori facilement discriminée, en comparant les biomatériaux CHA dense et CHA poreuse.

L'orientation des vecteurs des paramètres : concentration calcique du milieu de culture des ostéoblastes à 1 h, 24 h et 14 jours, avec ou sans cellules, laisse présumer une réponse identique et spécifique de la concentration calcique pour les groupes HA et SiHA dense. Elle sera différente pour HA et SiHA poreuses, qui paraissent similaires. CHA, quelle que soit la microstructure, présentera des concentrations calciques différentes des deux autres groupes. L'orientation des vecteurs : porosité, rugosité et surface spécifique, laisse prévoir que ces caractéristiques physiques microstructurales des biomatériaux seraient à l'origine des concentrations calciques différentes observées.

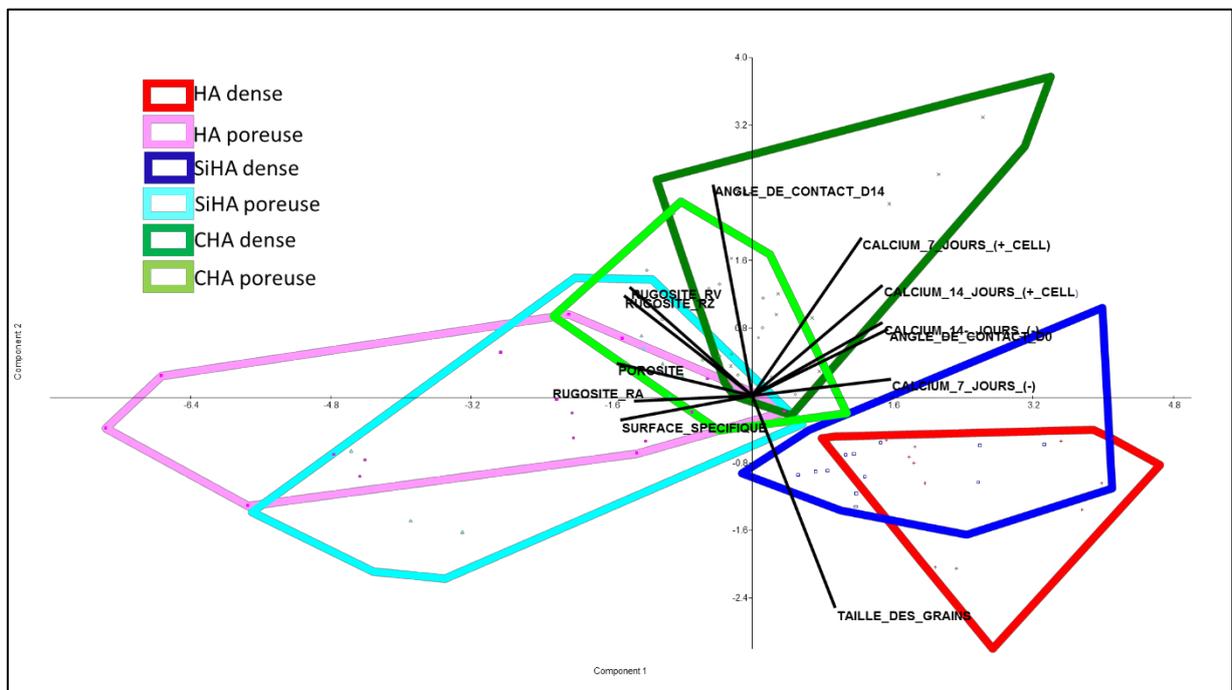


Figure 38 : analyses ACP englobant les valeurs des mesures de la concentration calcique du milieu de culture contenant les 6 biomatériaux cultivés (+) ou non (-) avec les cellules ostéoclastiques

La courbe de décroissance des composantes principales et la matrice finale de corrélation variables-composantes principales a permis de confirmer que l'on peut négliger les autres composantes à partir de la 3^{ème} composante et ne garder que les deux composantes principales, donc rester en 2 dimensions, sur deux axes. Ces deux axes traitent 83 % de l'ensemble des informations (Annexe 16).

Pour les cultures d'ostéoclastes, les ACP, (Figure 38), 3 mêmes groupes ont été identifiés :

- HA poreuse et SiHA poreuse
- HA dense et SiHA dense
- CHA dense et CHA poreuse

Les mêmes hypothèses peuvent être émises. A l'exception près du groupe CHA dense et poreuse, il semblerait qu'il sera plus facile de discriminer l'influence de la microstructure des biomatériaux CHA sur les concentrations calciques du milieu de culture des ostéoclastes à 7 et 14 jours, avec ou sans cellules. En effet, ces deux enveloppes semblent moins regroupées.

IV.1.5. Conclusion de l'étude

Les analyses ACP ont donné un aperçu des réponses biologiques et des concentrations calciques du milieu de culture cellulaire qui pourront être corrélées, inversement corrélées et associées à une catégorie de biomatériaux en particulier. L'influence de la composition chimique et de la microstructure pourra être discriminée. De façon générale, l'influence de la microstructure pour les biomatériaux SiHA et HA pourra être discriminée. Par contre, il sera plus complexe d'identifier l'influence de la microstructure pour les biomatériaux CHA.

Des études détaillées ont été réalisées et présentées dans les sous paragraphes suivants pour mieux comprendre l'influence spécifique de tous ces paramètres au regard de la littérature.

IV.2. Influence de la substitution en ions silicates et de la microstructure des céramiques d'hydroxyapatite sur l'activité ostéoblastique

IV.2.1. Contexte et objectif de l'étude

L'objectif de cette étude consiste à analyser l'influence de l'élément silicium, sur l'activité biologique pré-ostéoblastique, selon sa disponibilité, dans des matériaux d'hydroxyapatite silicatée. Cette évaluation biologique comprend des études dirigées sur l'adhésion, la viabilité, la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes. Afin de discriminer l'effet des propriétés physiques, (microstructure), du rôle effectif du silicium sur l'activité biologique des ostéoblastes, les cellules ont directement été cultivées au contact de 4 variantes de biomatériaux. Des pastilles d'hydroxyapatite silicatées, denses et poreuses, ont été utilisées et des pastilles d'hydroxyapatite stœchiométriques, denses et poreuses, ont servi de contrôle. De plus, la lame de verre a servi de contrôle interne pour déterminer si l'influence du silicium peut être considéré comme significativement favorable, par rapport à un modèle de culture communément utilisé et reconnu pour promouvoir la viabilité, l'adhésion et l'activité fonctionnelle des cellules. L'évaluation biologique a été réalisée avec la lignée cellulaire pré-ostéoblastique, MC3T3-E1. Différents critères et tests fonctionnels ont été définis sur des cinétiques de temps adaptées. L'adhésion et la viabilité ont été analysées sur une cinétique d'1 h, 24 h et 48 h. L'étude de la prolifération cellulaire a été réalisée à 24 h tout comme celle de la différenciation. Des études sur la différenciation ont aussi été réalisées à 7 jours, en fonction qu'il s'agisse de l'expression séquentielle des gènes ostéogéniques plutôt précoces ou tardives. La quantité d'élément silicium relarguée dans le milieu à 1 h, 24 h et 14 jours, par les pastilles, a été mesurée par ICP/OES. Le détail des protocoles est décrit au chapitre III (Chapitre III).

IV.2.2. Résultats

IV.2.2.1 Examen morphologique et adhésion cellulaire

Deux techniques d'imagerie ont été utilisées pour évaluer qualitativement la façon dont les pré-ostéoblastes adhèrent aux biomatériaux : la dessiccation par contournement du point critique du CO₂, ([Figure 39](#), [Figure 40](#)), ainsi que l'immunofluorescence, ([Figure 41](#), [Figure 42](#)).

IV.2.2.1.1. Images en MEB

Dès 1 h de culture, les cellules avaient adhéré à la surface de tous les biomatériaux. A 1 h, sur les images en MEB, il est possible de distinguer clairement les extensions membranaires, tout autour des cellules : les filopodes qui adhèrent aux grains des biomatériaux. Cependant, le corps cellulaire se présentait sous forme arrondie ([Figure 39](#)).

A 48 h, les filopodes étaient allongés, tout comme les corps cellulaires, qui s'étalaient au contact de tous les biomatériaux, ([Figure 40](#)). En revanche, les images en MEB montrent des cellules beaucoup plus aplaties sur la lame de verre à 48 h, alors qu'elles paraissaient plus bombées sur les biomatériaux. De plus, des noyaux de taille importante bien visibles et bien aplatiss, étaient nettement délimités par rapport au cytoplasme, ce qui n'est pas le cas sur les biomatériaux ([Figure 40](#)).

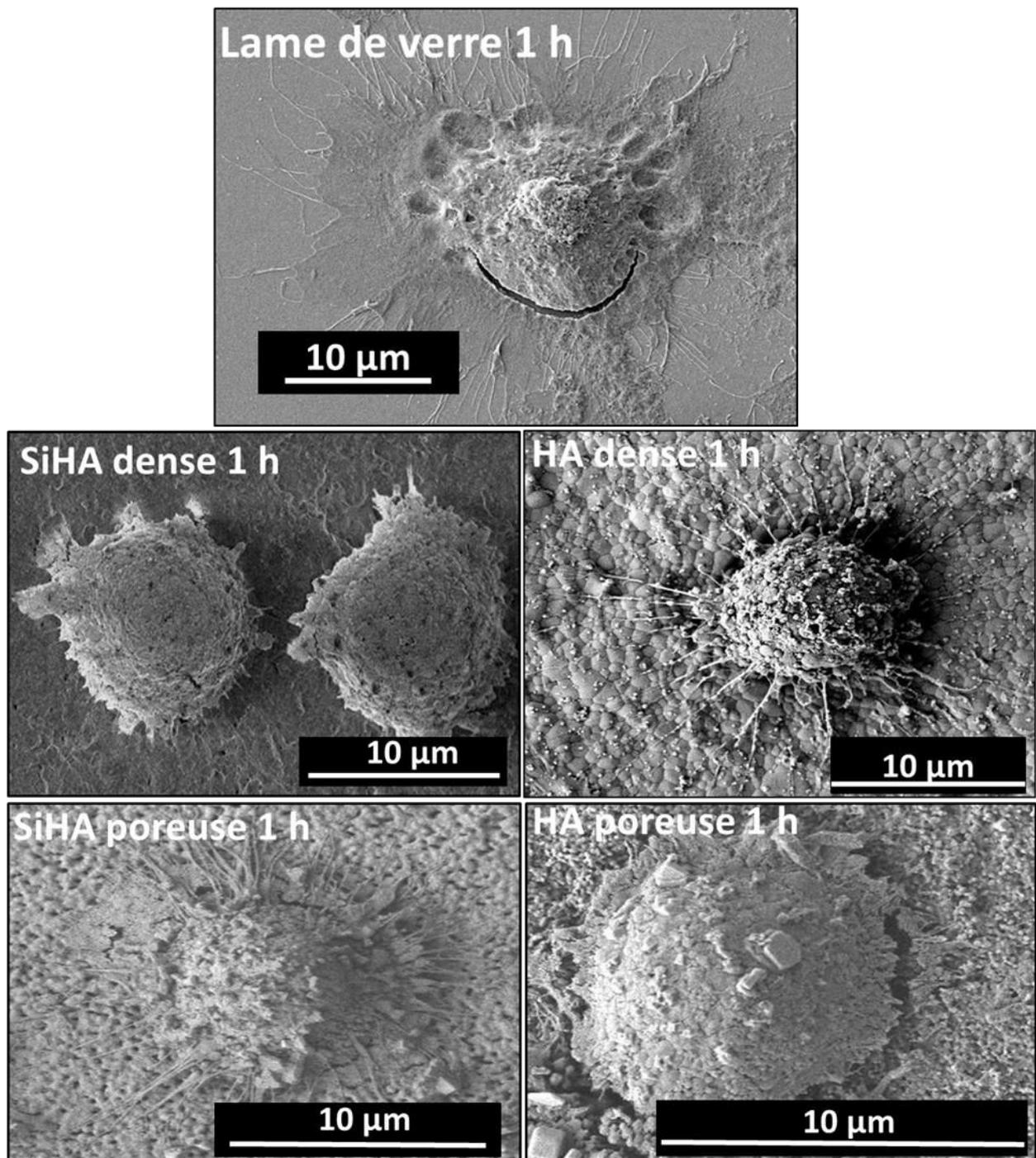


Figure 39 : images en microscopie électronique à balayage (MEB) des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture

Sur tous les biomatériaux les cellules ont adhéré après 1h de culture. Elles sont de forme arrondie après 1 h de culture et présentent des filopodes tout autour de leur corps cellulaire

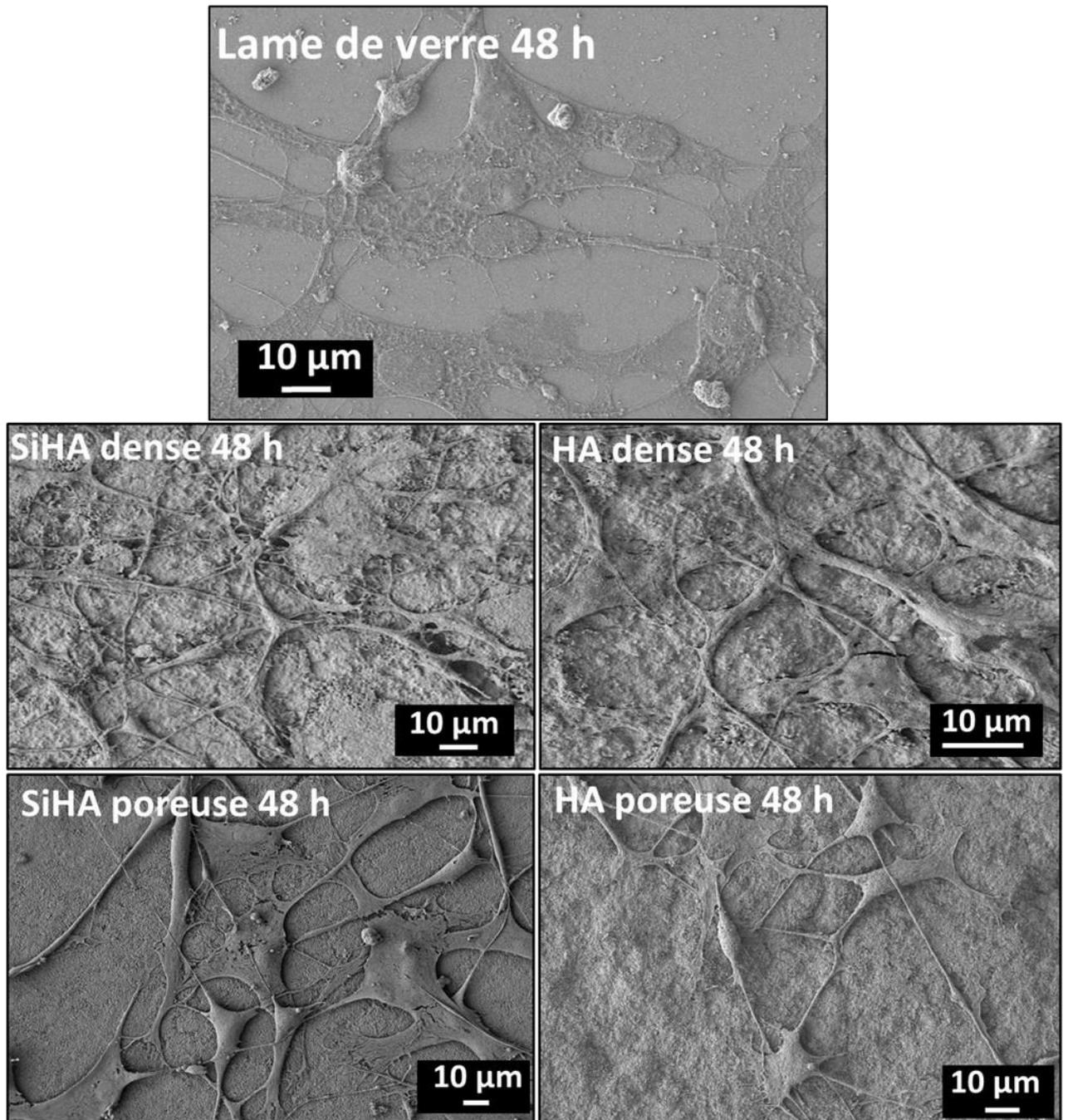


Figure 40 : images en MEB des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 48 h de culture

Après 48 h de culture, les cellules colonisent la surface de tous les biomatériaux. Le corps cellulaire est plus allongé ainsi que les extensions membranaires (filopodes).

IV.2.2.1.2. Images d'immunofluorescences

Les images d'immunofluorescences, ([Figure 41](#), [Figure 42](#)), ont confirmé les images en MEB. De façon générale, à 1 h, les cellules étaient de forme arrondie. Certaines d'entre elles présentaient des filopodes plus allongés. Cependant, une hétérogénéité de forme cellulaire a été constatée sur tous les biomatériaux. A cette étape, il n'a donc pas été possible de discriminer une morphologie cellulaire typique d'une composition, ou d'une microstructure de biomatériau.

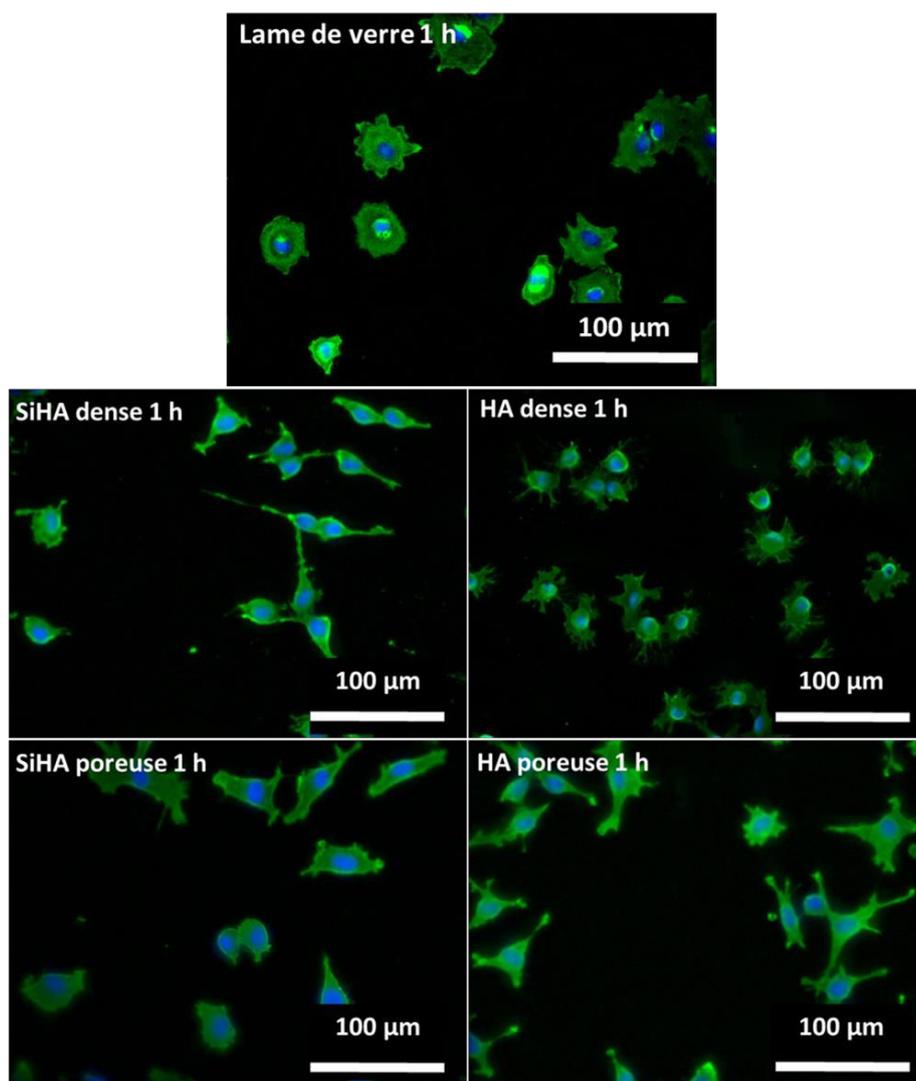


Figure 41 : images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture.

Les noyaux sont marqués en bleu et l'actine en vert

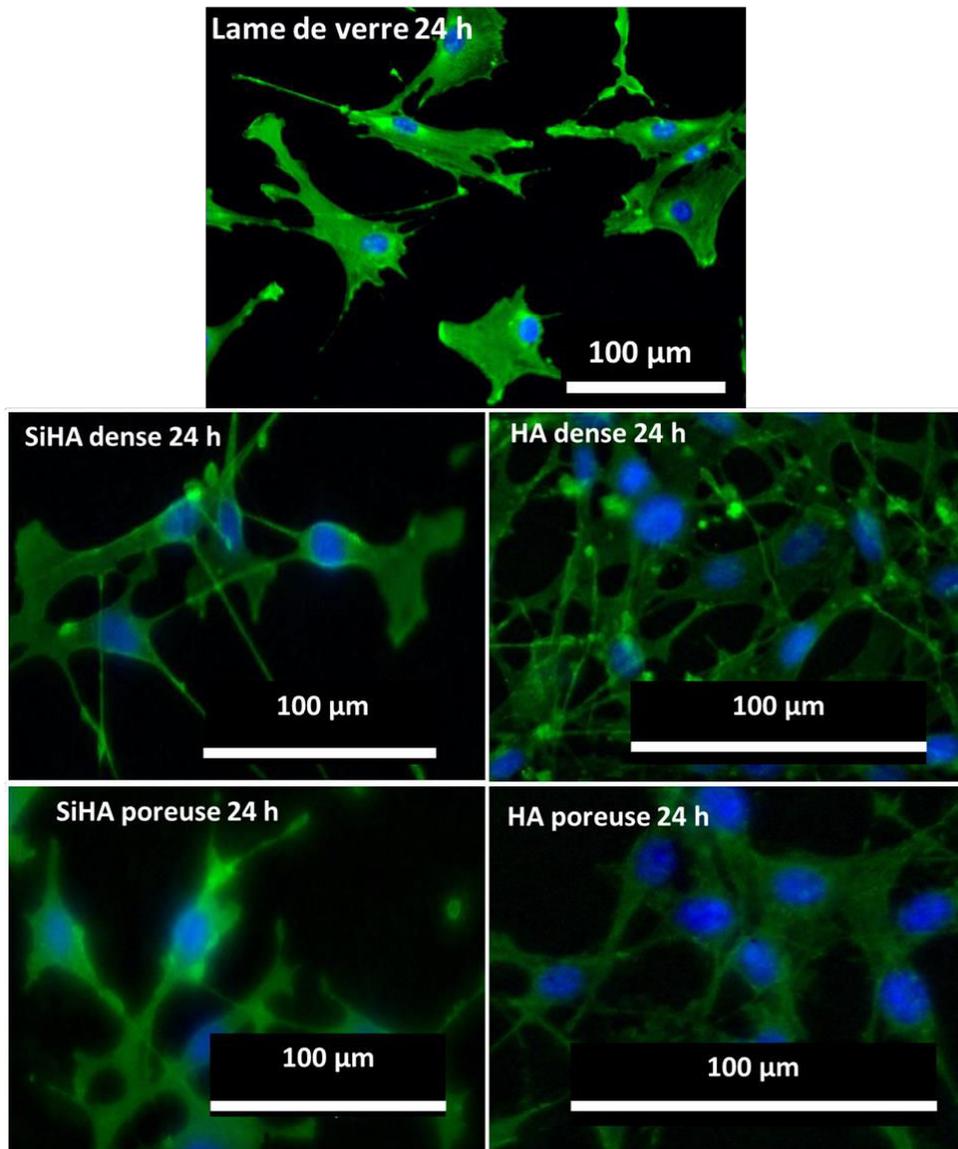


Figure 42 : images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 24 h de culture.

Les noyaux sont marqués en bleu et l'actine en vert

A 24 h, le corps cellulaire et les extensions membranaires étaient plus allongés, quelles que soient les compositions chimiques et les microstructures de biomatériaux.

L'immunocytochimie a révélé le cytosquelette d'actine, mais également la vinculine, une protéine impliquée dans les adhésions focales. A 1 h, la vinculine était exprimée dans le cytoplasme, mais principalement autour des noyaux, (en périnucléaire), sous forme ponctuelle, uniquement sur la lamelle de verre et les matériaux denses HA et SiHA (Figure 43).

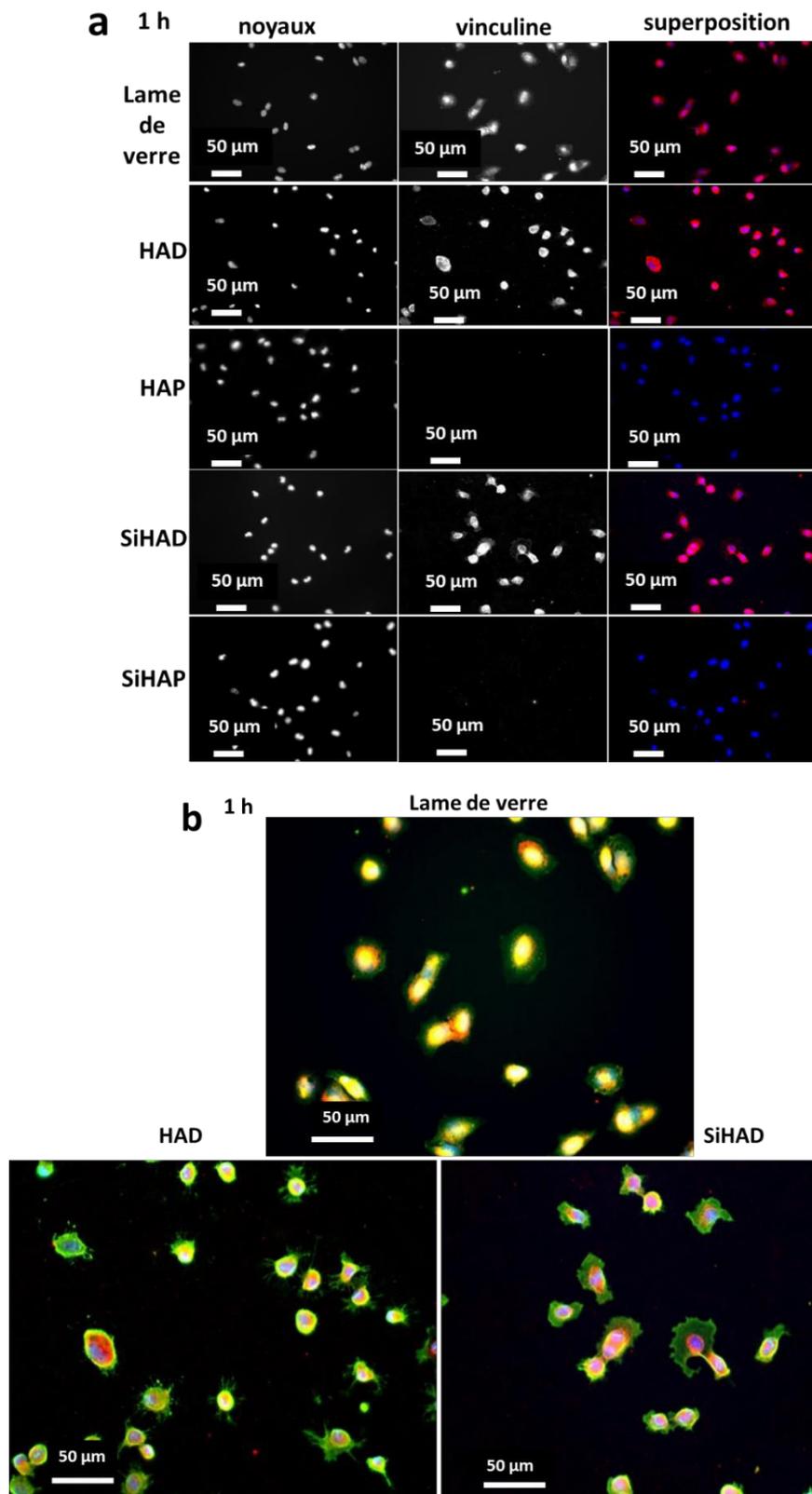


Figure 43 : images des immunofluorescences des cellules MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture.

a) le marquage en rouge représente la vinculine et celui en bleu les noyaux. b) grossissement des images montrant la superposition de l'actine (vert) et de la vinculine (rouge). Les noyaux sont représentés en bleu.

Après 24 h, au contact de tous les substrats, les filaments d'actine se sont réorganisés en faisceaux linéaires : les fibres de stress. Ces fibres sont observables sur tous les substrats: la lame de verre et les 4 variantes de biomatériaux testés, (Figure 41, Figure 42). Ces fibres sont particulièrement visibles sur les grossissements d'images de la figure 40, (Figure 44). A l'extrémité des fibres de stress, l'actine s'était réorganisée sous forme de plaque, formant des zones d'adhésions focales.

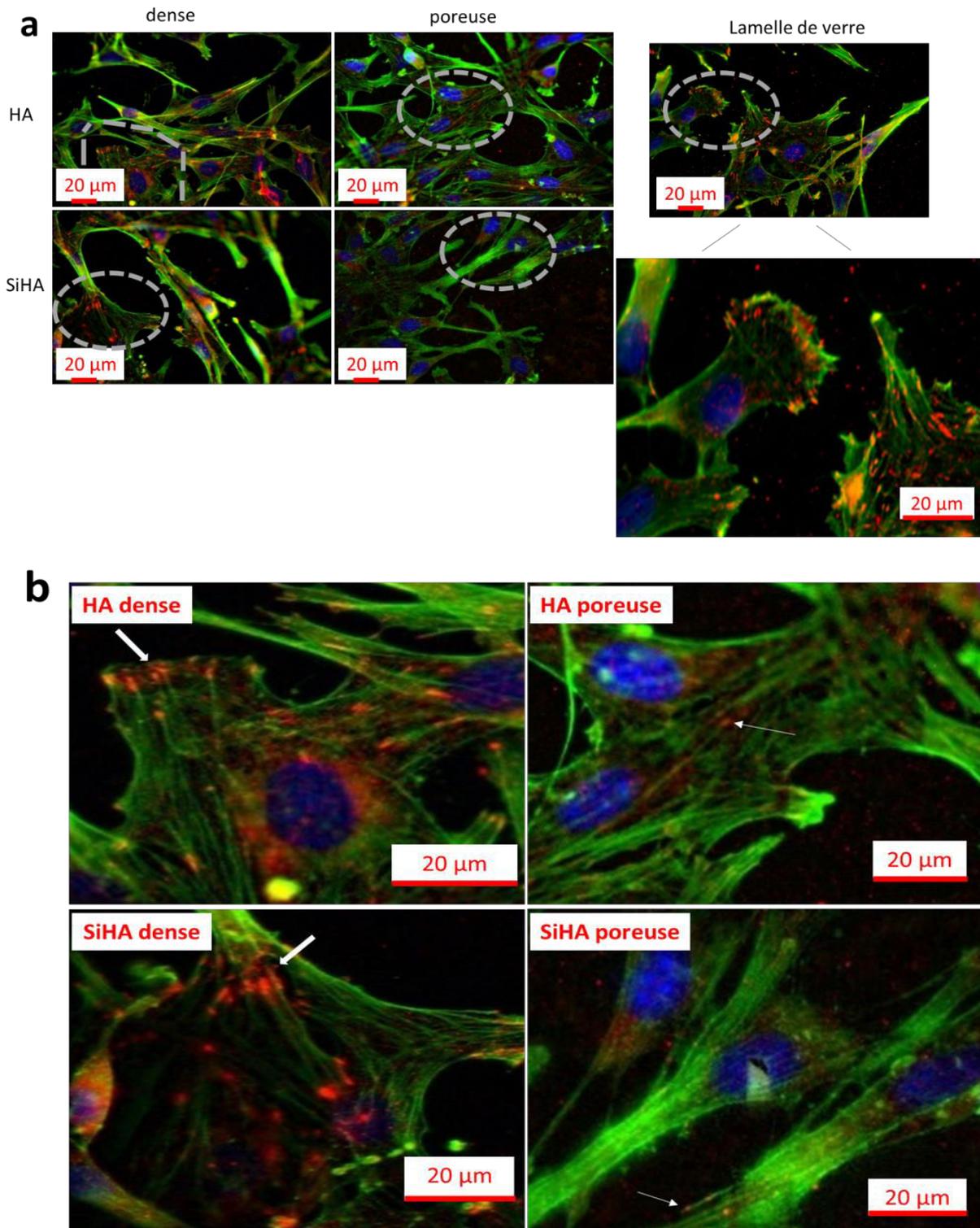


Figure 44 : (a) images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux après 24 h de culture : en bleu les noyaux, en vert l'actine et en rouge la vinculine. (b) grossissement (X40) de la zone entourée en gris

Des analyses quantitatives ont pu être réalisées, pour évaluer l'influence de certaines microstructures, ou d'une composition chimique plus favorable à l'adhésion cellulaire (Figure 45). La surface des cellules, sur 30 aires, choisies au hasard, ainsi que le nombre d'adhésions focales, ont pu être déterminés. C'est la superposition de l'actine et de la vinculine à l'extrémité d'une fibre de stress qui a été considérée comme une adhésion focale. Ces adhésions se visualisent sous la forme d'un marquage orange ponctuel (Figure 44).

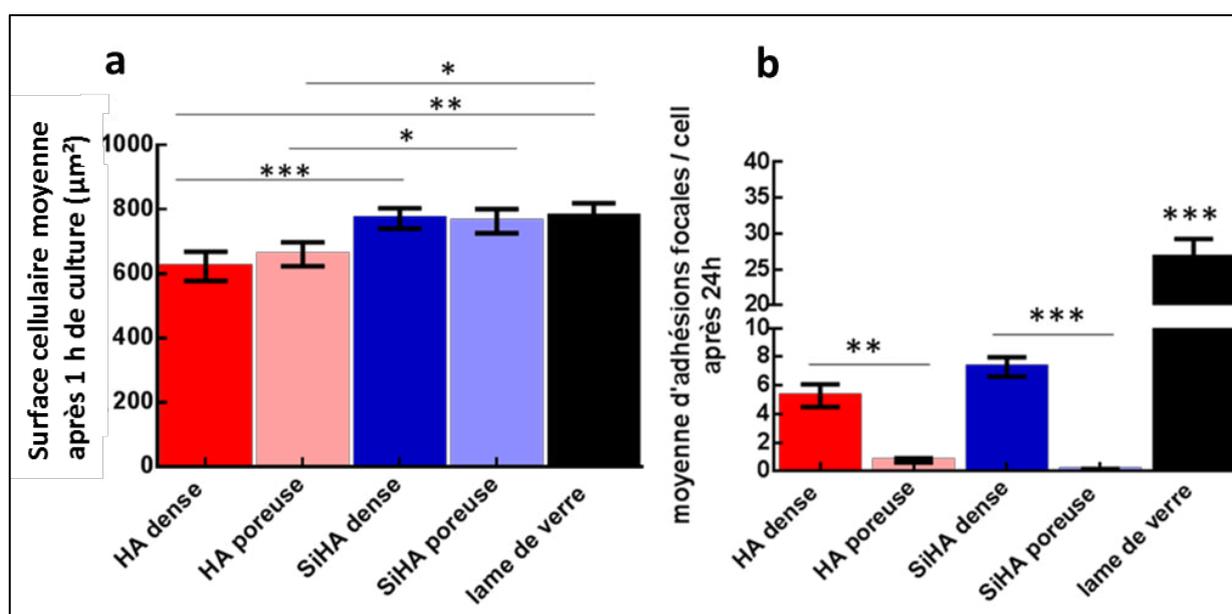


Figure 45 : analyse quantitative de l'adhésion des cellules aux biomatériaux.

Un minimum de 30 cellules par pastille a été analysé soit 30 cellules x 3 pastilles. Les adhésions focales de 10 zones ont été comptées et normalisées par le nombre de cellules par zones analysées soit 10 zones x 3 pastilles. Le résultat est la moyenne des 30 mesures ± SD

La surface cellulaire moyenne après 1 h de culture, est significativement supérieure sur les pastilles SiHA, denses et poreuses, par rapport aux pastilles HA, (Figure 45 a). De nombreuses adhésions focales sont observées sur les matériaux denses, HA et SiHA, suggérant que la composition chimique n'intervient pas dans la formation de ces dernières, (Figure 45 b). Au contraire, les adhésions focales diminuent en présence de microstructures poreuses, indépendamment de la composition chimique.

IV.2.2.2 Apoptose et viabilité cellulaire

La présence de contact cellulaire et d'adhésion focales, permet d'affirmer que les cellules interagissent avec le matériau. Cependant, il reste à évaluer le comportement de celles-ci à l'aide de tests de viabilité et de tests fonctionnels cellulaires.

IV.2.2.2.1. Mesure de l'apoptose cellulaire

En analysant l'apoptose cellulaire, il n'a pas pu être observé d'effet significatif de la microstructure, ni de la composition chimique. Elle est très faible sur tous les matériaux céramiques, du même ordre de grandeur que sur la lame de verre, (Figure 46).

IV.2.2.2.2. Test de la calcéine

A 1 h, le biomatériau HA poreux a montré un taux de viabilité significativement plus faible que toutes les autres conditions testées. A 24 h, le taux de viabilité était très élevé, (quasi égal à 100%) et du même ordre de grandeur sur tous les biomatériaux, y compris sur la lame de verre. A 48 h, la viabilité était significativement supérieure et du même ordre de grandeur sur HA dense et la lame de verre, comparée aux autres conditions (Figure 46).

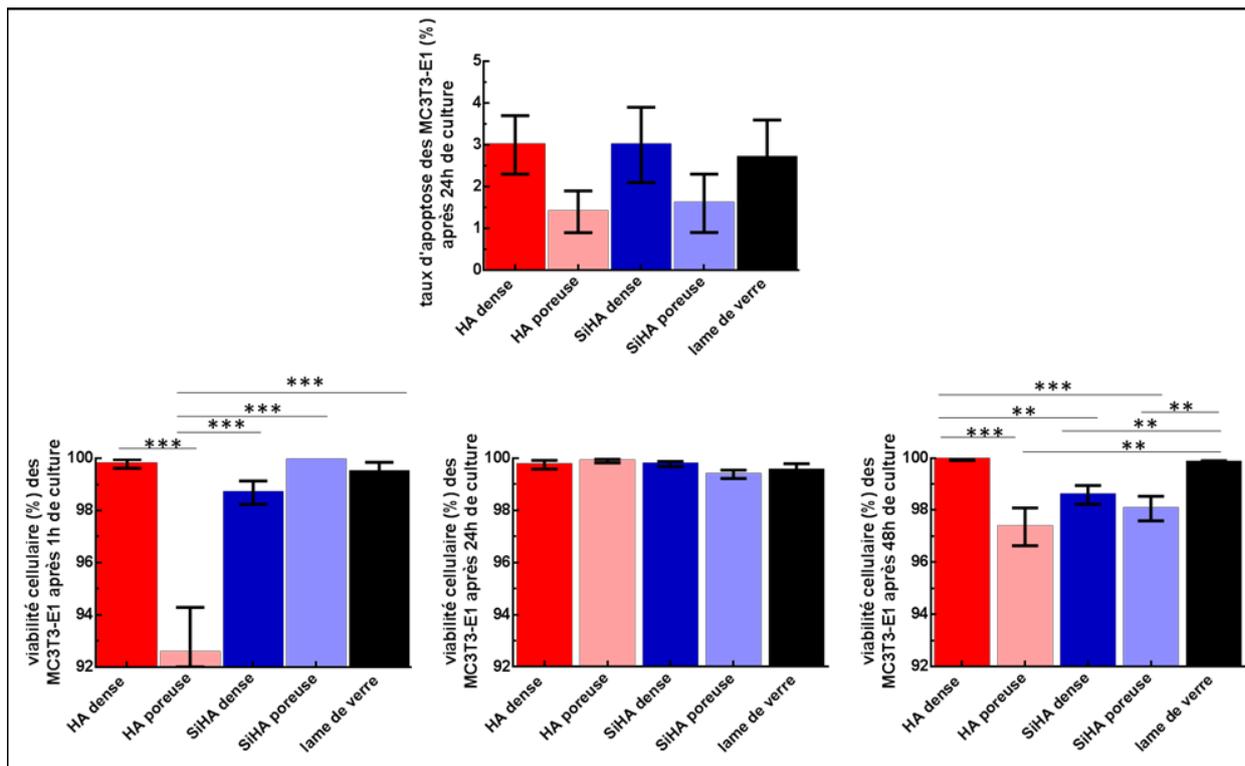


Figure 46 : viabilité des cellules cultivées à la surface des biomatériaux.

Les taux d'apoptose et de viabilité cellulaire sont mesurés par traitement d'image sur un minimum de 10 aires, sélectionnées au hasard, sur 3 pastilles indépendantes, soit 10 images x 3 pastilles = 30 images. Le résultat est la moyenne des 30 mesures \pm SD

IV.2.2.2.3. Densité cellulaire

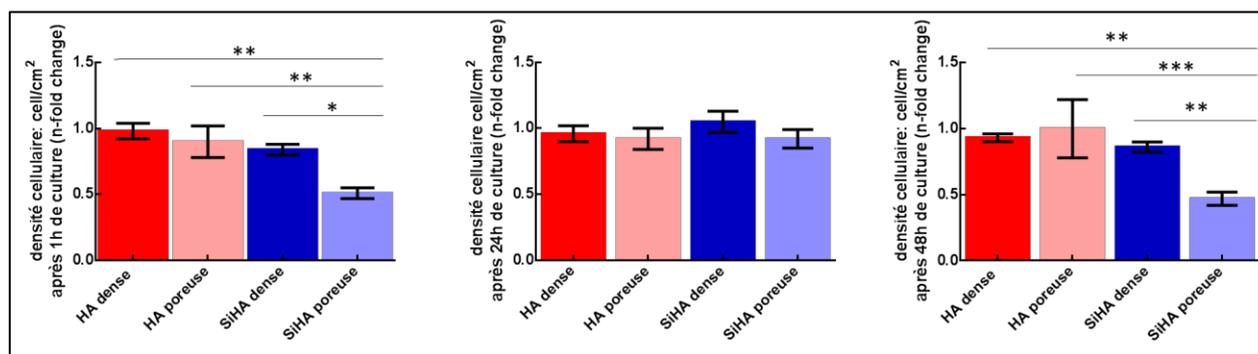


Figure 47 : densité cellulaire en surface des biomatériaux sur la cinétique d'1 h, 24 h et 48 h.

La densité cellulaire est mesurée par traitement d'images, sur un minimum de 10 aires, sélectionnées au hasard, sur 3 pastilles indépendantes, soit 10 images x 3 pastilles = 30 images. Le résultat est la moyenne des 30 mesures \pm SD. La normalisation est réalisée par rapport à la lame de verre (sur l'axe en ordonnée le *n-fold change* est exprimé par rapport à la lame de verre).

La densité cellulaire à la surface des substrats est donnée à la figure 47 (Figure 47). Après 1 h de culture, elle était significativement moins importante sur les matériaux SiHA poreux, comparée à toutes les autres conditions. Ce même résultat a aussi été observé après 48 h de culture. Deux fois moins de cellules ont adhéré au matériau SiHA, (un taux d'environ 0,5), alors que la densité cellulaire sur tous les autres biomatériaux était similaire à la densité sur la lame de verre, (environ 1). A 24 h, la densité cellulaire était similaire et du même ordre de grandeur, environ égale à 1, sur tous les biomatériaux.

IV.2.2.2.4. Tests fonctionnels

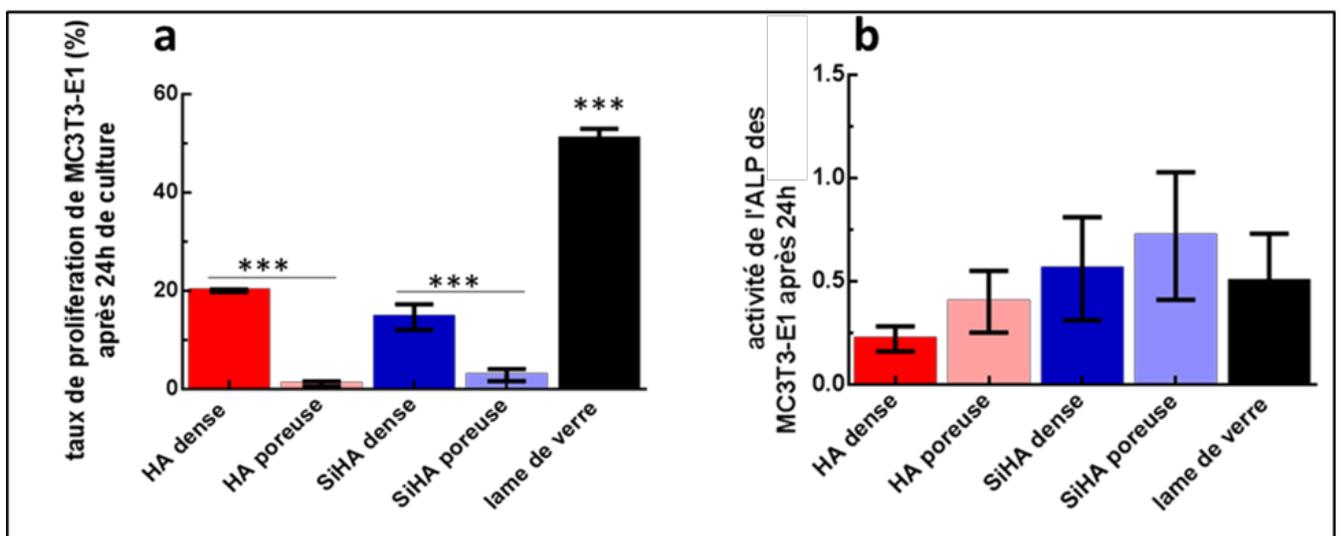


Figure 48 : analyse fonctionnelle des cellules.

a) prolifération évaluée par traitement d'images sur 10 images x 3 pastilles = 30 images. b) activité enzymatique de l'ALP, moyenne de 6 mesures indépendantes. Les barres d'erreurs sont les SD. Les résultats de l'activité enzymatique de l'ALP représentés sur le graphe ont été normalisés par la quantité totale de protéines contenue dans chaque échantillon.

La prolifération cellulaire était significativement supérieure sur les biomatériaux denses et la lame de verre, comparée aux matériaux poreux, (Figure 48 a), tandis qu'à 24 h, les niveaux d'activité de l'ALP étaient similaires entre les différents matériaux, (Figure 48 b). La mesure de l'ALP permet d'évaluer la différenciation des MC3T3-E1. Ces résultats confirment ainsi que les cellules qui prolifèrent ne se différencient pas.

IV.2.2.2.5. Etude de l'expression de protéines ostéogéniques

IV.2.2.2.5.1. Analyse de l'expression de protéines ostéogéniques selon la nature du biomatériau

L'étude de l'expression de protéines ostéogéniques, RUNX2 et ostéopontine, par les cellules cultivées sur les pastilles et celles cultivées autour des pastilles, a été réalisée par western blot. RUNX2, est un facteur de transcription qui va reconnaître le motif commun du promoteur qui code l'expression de plusieurs protéines ostéogéniques : ostéopontine, collagène... Il est donc exprimé de façon précoce par les ostéoblastes, (Olsen et al., 2000). Au contraire, l'ostéopontine et son pic d'expression apparaît plus tardivement au début de la minéralisation et servira par conséquent de marqueur tardif (Owen et al., 1990) (Figure 4), (Barré, 2012), (Marie, 2001).

IV.2.2.2.5.1.1. RUNX2

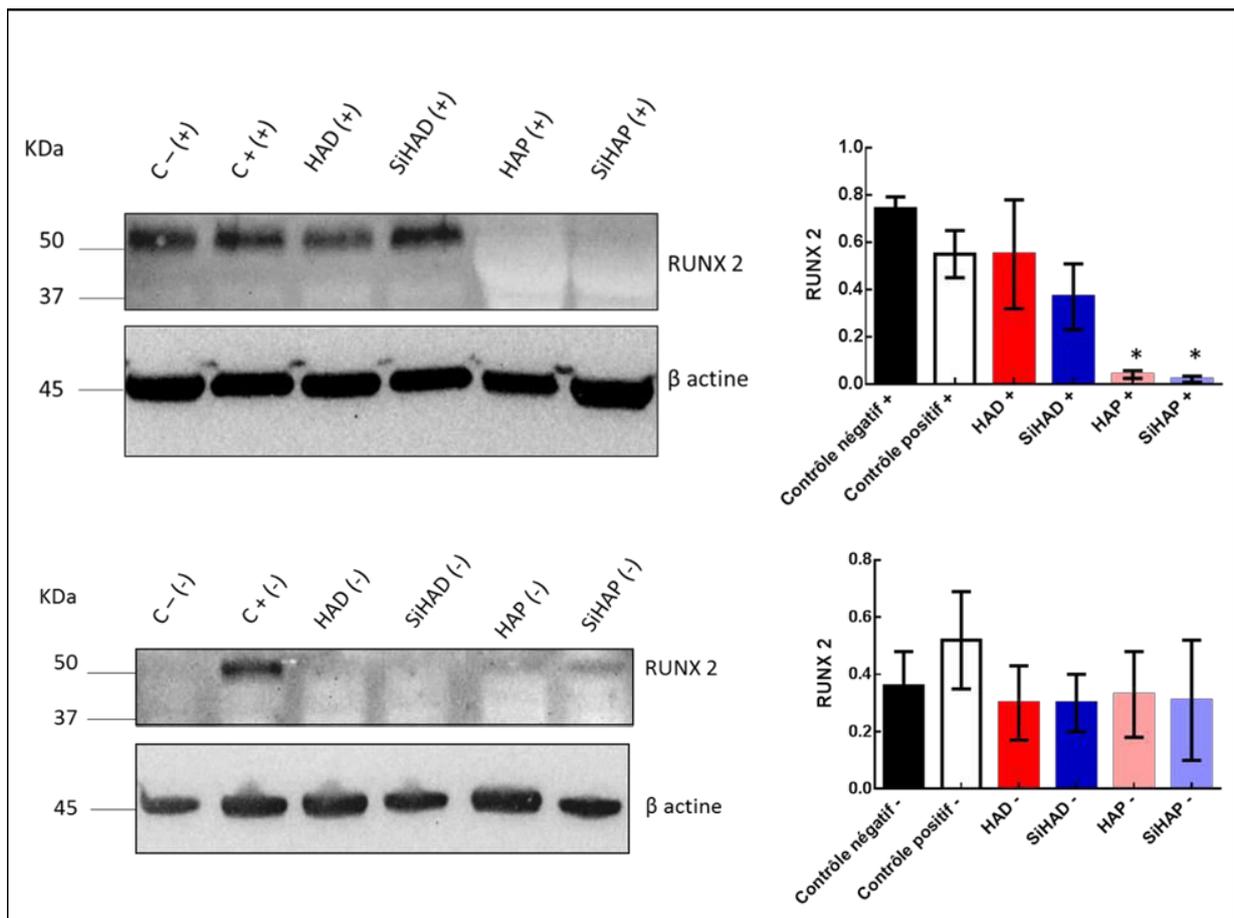


Figure 49 : expression protéique de RUNX 2 par les cellules cultivées sur les pastilles, pendant 7 jours (+) et celles cultivées sur le plastique, autour des pastilles, pendant 7 jours (-). La quantification a été normalisée par la protéine β actine.

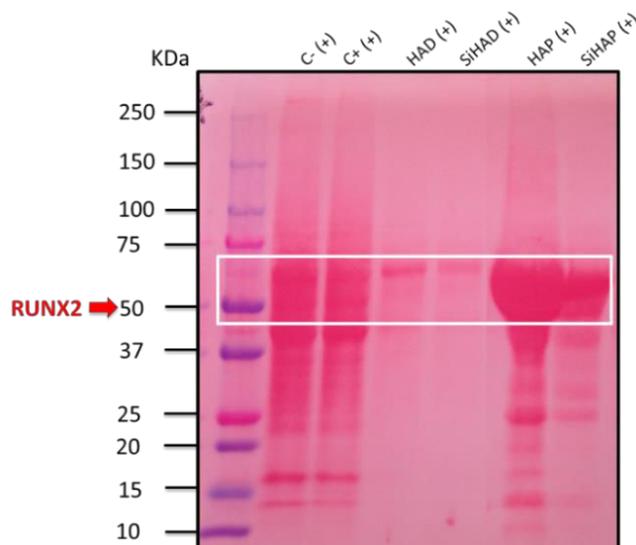


Figure 50 : membrane marquée au rouge ponceau

Les résultats des *western blots*, ([Figure 49](#), [Figure 50](#)), ont démontré que le profil d'expression des protéines ostéogéniques obtenu, était différent pour les cellules cultivées directement au contact et en surface des biomatériaux, de celles cultivées à côté des pastilles, sur le plastique de la plaque de culture, non directement au contact des biomatériaux.

A 7 jours, la protéine RUNX2 n'était pas exprimée sur les pastilles poreuses d'HA et de SiHA, alors qu'elle l'était sur les pastilles denses de HA et de SiHA, tout comme elle l'était sur le plastique, dans le milieu de croissance, (contrôle négatif) et dans le milieu de différenciation, (contrôle positif). Par contre, ces résultats sont à considérer avec précaution, puisqu'un doute quant à la fiabilité de la manipulation durant la phase d'hybridation de l'anticorps primaire à la membrane, persiste. En effet, le rouge ponceau a permis de confirmer que le transfert des protéines sur la membrane s'est effectué sans problème ([Figure 50](#)).

Par contre, les cellules qui n'étaient pas au contact des pastilles n'ont pas exprimé RUNX2, quelle que soit la composition et la microstructure de la pastille mise dans le puits de culture. Seul le contrôle positif : les cellules cultivées sur plastique, en présence de milieu différenciant, ont exprimé RUNX2, prouvant la validité de la manipulation et de l'anticorps ([Figure 49](#)).

IV.2.2.2.5.1.2. Ostéopontine

A 24 h, seules les cellules cultivées sur les biomatériaux poreux HA et SiHA exprimaient l'ostéopontine. Même les cellules traitées avec le milieu différenciant n'exprimaient pas encore la protéine après 24 h (Figure 51)

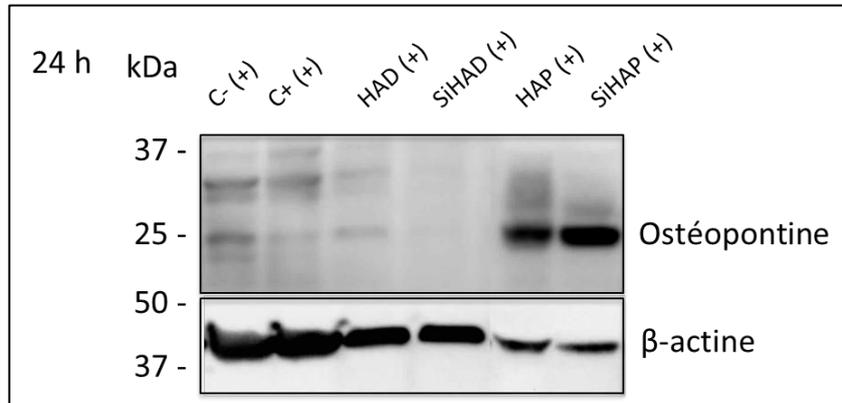


Figure 51 : expression protéique d'ostéopontine par les cellules cultivées 24 h, sur les pastilles.

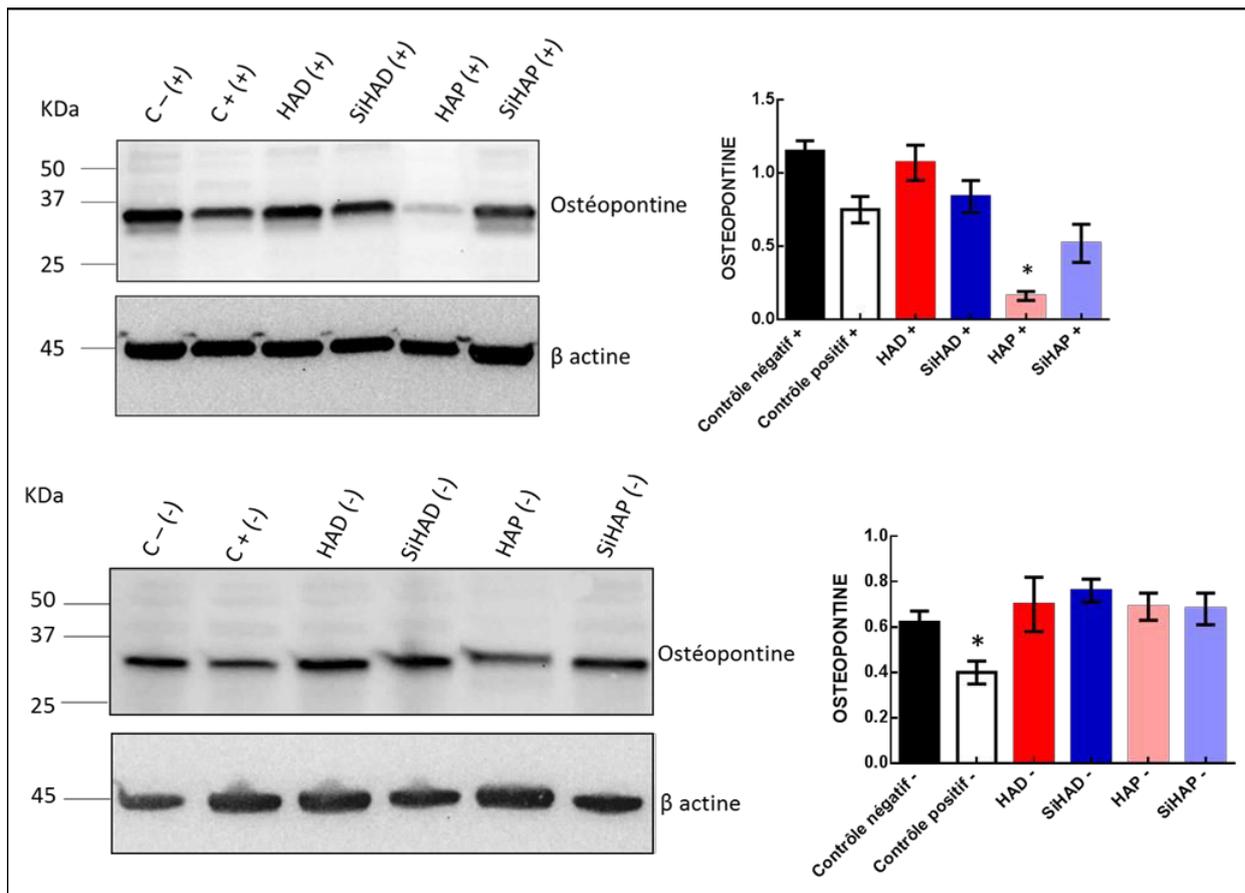


Figure 52 : expression protéique d'ostéopontine, par les cellules cultivées sur les pastilles, pendant 7 jours (+) et celles cultivées sur le plastique, autour des pastilles, pendant 7 jours (-). La quantification a été normalisée par la protéine β actine.

Au contraire, après 7 jours de culture, les cellules au contact des pastilles HA denses et SiHA denses, ainsi que celles cultivées sur le plastique, en présence de milieu différenciant ou non, avaient commencé à exprimer l'ostéopontine. L'expression d'ostéopontine n'était plus détectable pour les cellules cultivées sur les pastilles poreuses d' HA, alors qu'elle l'était encore dans les cellules cultivées sur SiHA poreux, (Figure 52). Les cellules cultivées autour des pastilles exprimaient toutes l'ostéopontine, quelle que soit la composition chimique et la microstructure de la pastille (Figure 52).

IV.2.2.2.6. Etude de l'expression de gènes ostéogéniques

Cette étude de l'expression génique de RUNX2, du collagène I (COLLI) et de l'ALP a été réalisée sur des cellules cultivées directement sur les pastilles, après 7 jours de culture. La cinétique d'expression de ces différents gènes est la suivante : RUNX2 est exprimé de façon précoce, tandis que COLLI, puis l'ALP, sont exprimés plus tardivement, (Figure 4).

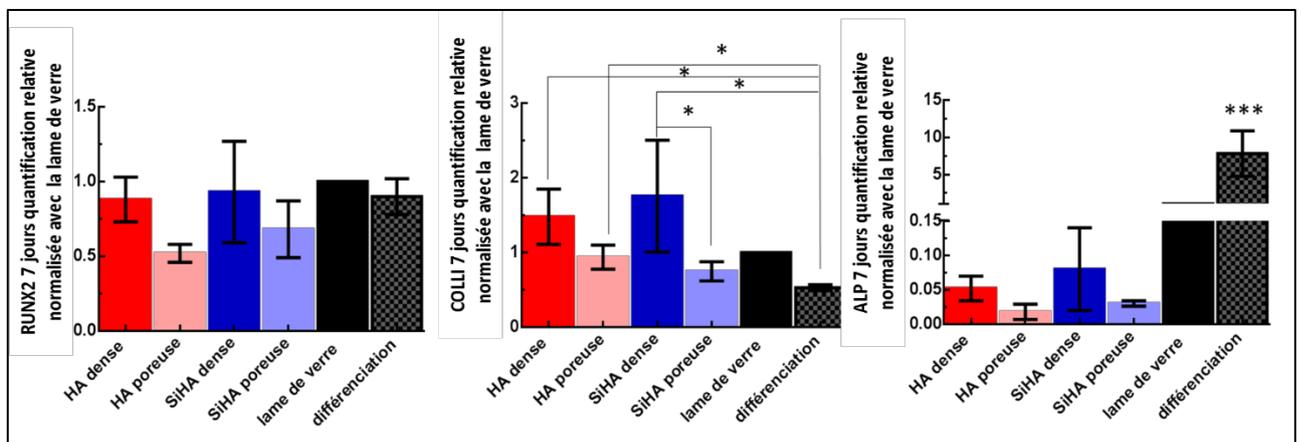


Figure 53 : expression génique de RUNX2, COLLI et ALP, à 7 jours de culture, par les cellules cultivées directement sur les pastilles.

Les valeurs sont la moyenne d'un minimum de 3 mesures ± SD

On ne peut parler que de tendance quant à l'expression de RUNX2 et d'ALP car les différences ne sont pas significatives et empêchent d'émettre des conclusions quant à l'influence de la microstructure et de la composition chimique. Par contre, il y a eu une différence significative de l'expression du collagène I par les cellules cultivées sur

SiHA denses, par rapport aux cellules cultivées sur SiHA poreux. Le gène codant pour le collagène I est significativement plus exprimé dans les cellules cultivées sur pastilles SiHA denses par comparaison à celles cultivées sur siHA poreuses, ([Figure 53](#)).

IV.2.2.3 Mesure des éléments silicium et calcium dans le milieu de culture

La différence de comportement cellulaire entre les cellules au contact direct ou bien indirect des pastilles laisserait penser que les cellules sont sensibles aux éléments libérés dans le milieu par les pastilles.

Ainsi, des mesures en ICP/OES, de concentration en élément silicium dans le milieu ensemencé ou non avec les MC3T3-E1 ont été réalisées.

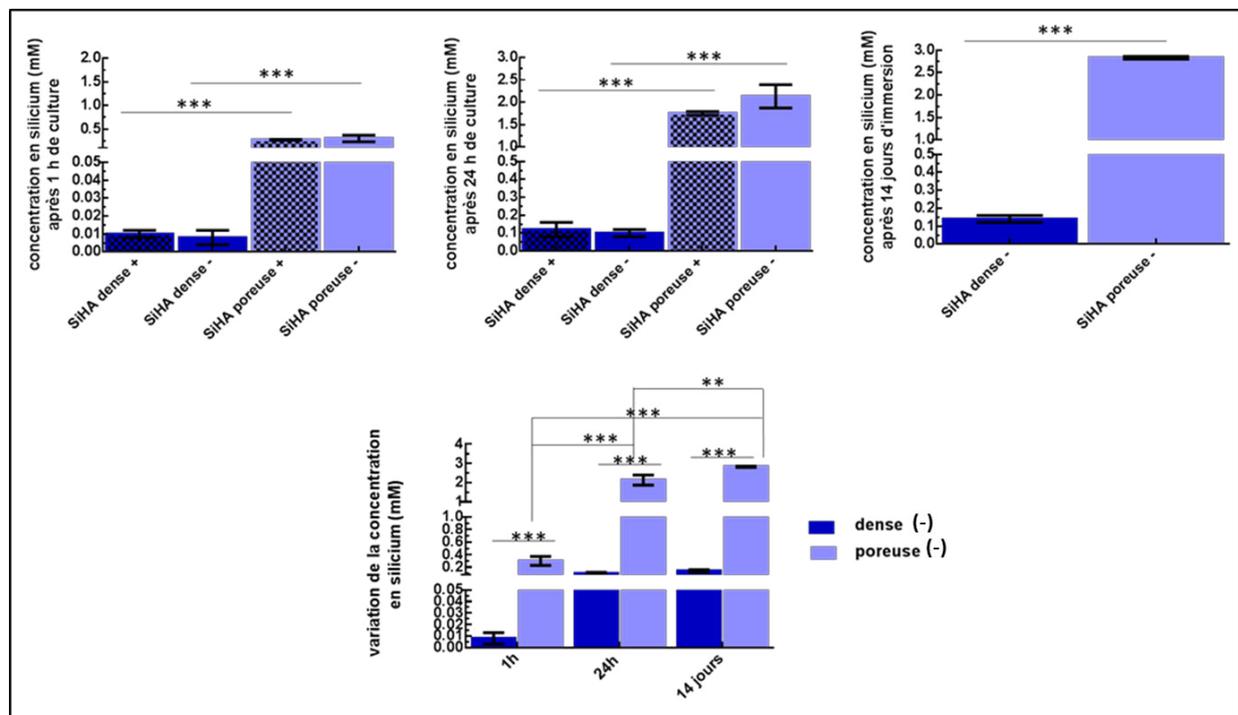


Figure 54 : cinétique de relargage de l'élément silicium dans le milieu de culture complet par les pastilles SiHA denses et poreuses cultivées (+) ou non (-) avec des MC3T3-E1

Il a pu être observé une augmentation de la libération en silicium dans le milieu après 1 h, 24 h et 14 jours, ([Figure 54](#)). Le silicium a donc été libéré en continu par les pastilles et ne précipite pas en surface comme cela a pu être observé pour le calcium dans la littérature (Hench, 1998). Comme attendu, plus de silicium a été libéré par les pastilles poreuses, comparées aux pastilles denses, soit 0,01 mM, contre 0,5 mM à 1 h. 50 fois plus de silicium a été libéré par les pastilles poreuses, comparées aux

pastilles denses. A 24 h, le taux de silicium libéré par les pastilles denses était 10 fois supérieur au taux libéré à 1 h. Ce taux libéré par les pastilles denses s'est stabilisé après 24 h, puis jusqu'à 14 jours, il était similaire et égal à 0,1 mM. Concernant les pastilles poreuses, 4 fois plus de silicium a été libéré de 1 h à 24 h. Ce taux s'est également stabilisé à 24 h, puisqu'il était similaire à 14 jours.

Par contre, la concentration en élément silicium relargué par les pastillesensemencées avec des cellules ne révélait aucune différence significative de celle des biomatériaux seuls. A 1 h, comme à 24 h, le niveau était très faible.

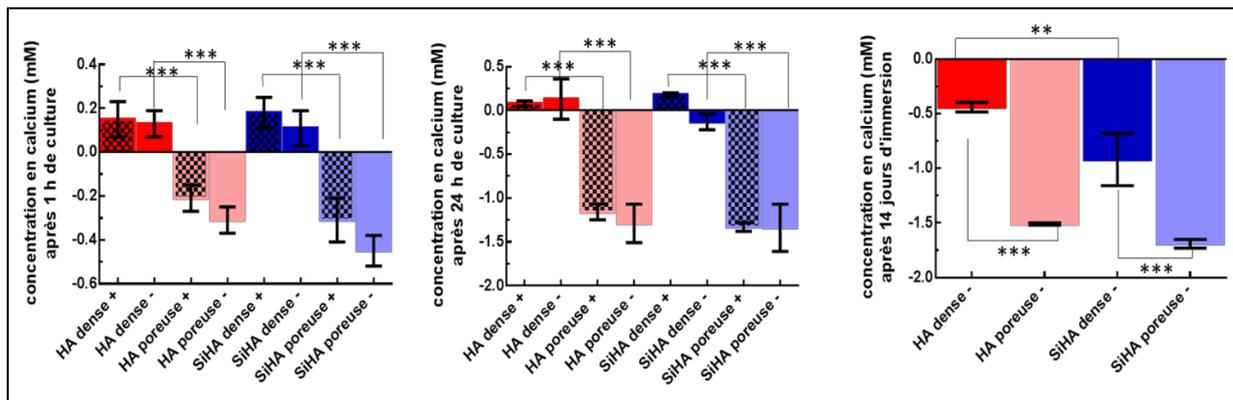


Figure 55 : concentration en élément calcium dans le milieu de culture complet, en présence des pastilles HA et SiHA, denses et poreuses, cultivées (+) ou non (-) avec des MC3T3-E1

Des mesures d'élément calcium libéré dans le milieu de culture ont également été réalisées, (Figure 55). Comme il a été montré précédemment que le silicium n'a pas précipité, il a pu être utilisé comme traceur pour suivre la libération en calcium par les pastilles. Selon la formule théorique de l'hydroxyapatite silicatée : $Ca_{10}(PO_4)_{5,6}(SiO_4)_{0,4}(OH)_{1,6}$, pour 0,4 mol de silicium relargué, 25 fois plus de calcium devrait l'être. Ainsi, si à 1 h, 0,01 mM de silicium a été libéré par les pastilles SiHA dense, une augmentation de 0,25 mM de calcium aurait du être trouvée dans le milieu de culture. Cette concentration aurait également du augmenter 50 fois plus à 24 h et atteindre les 12,5 mM et se stabiliser. A 1 h, 0,2 mM de calcium a été retrouvé dans le milieu de culture des pastilles SiHA denses, ce qui se rapproche de la valeur théorique attendue. Par contre, à 24 h, elle est très inférieure à la valeur théorique attendue, ce qui a prouvé une précipitation du calcium à la surface des pastilles.

Concernant les pastilles poreuses SiHA, dès 1 h, un phénomène de précipitation a pu être observé, contrairement à ce qui s'est passé avec les pastilles SiHA denses. La valeur théorique de calcium attendue dans le milieu de culture des SiHA poreux et

égale à 12,5 mM dès 1 h, était loin d'être retrouvée. Les variations de concentration en calcium étaient négatives, indiquant qu'il avait précipité davantage de calcium que la quantité théorique relarguée par la dissolution. Ces variations de concentrations de calcium du milieu de culture des pastilles SiHA denses et SiHA poreuses ont diminué de 1 h à 24 h, pour se stabiliser. La valeur en calcium du milieu était similaire de 24 h à 14 jours. Il est important de constater que le niveau de calcium du milieu de culture était similaire pour les pastilles HA denses et SiHA denses, pour un même point de cinétique. Il était également similaire entre les pastilles SiHA poreuses et HA poreuses, pour un même point de cinétique. La substitution en silicium dans l'apatite n'a donc pas modifié la cinétique de dissolution des pastilles de SiHA comparées aux pastilles HA. Seul un effet de microstructure et donc de microporosité a influencé différemment la teneur en calcium du milieu de culture. De même, la présence de cellules cultivées à la surface des pastilles, n'a pas modifié de façon significative, le niveau de calcium du milieu de culture contenant les pastilles seules, comparées aux pastilles cultivées avec des cellules. Par contre, sur des temps plus longs de 14 jours, on peut constater une différence significative entre le niveau de calcium du milieu contenant les pastilles HA denses, comparées au milieu contenant les pastilles SiHA denses.

IV.2.3. Discussions

IV.2.3.1 Adhésion et comportement des ostéoblastes au contact des biomatériaux

La morphologie des cellules n'est pas modifiée, quelque soit le biomatériau considéré, à 1 h ou 48 h, suggérant ainsi que ce paramètre est indépendant de la composition chimique et de la microstructure des biomatériaux. Néanmoins, les mécanismes d'adhésion des cellules au contact des biomatériaux, semblent quelque peu différents de ceux des cellules sur la lame de verre, à 48 h. Comme la lame de verre est un substrat dont les propriétés sont connues pour favoriser l'adhésion cellulaire, il est possible de dire que tous les biomatériaux, bien que favorisant l'adhésion cellulaire, sont moins efficaces que la lame de verre.

L'action favorable des microstructures denses sur la formation des contacts focaux est observée, quelle que soit la composition chimique. Ce phénomène pourrait dépendre,

d'une part, de la cinétique d'expression de certaines protéines impliquées dans l'adhérence et d'autre part, de la taille des grains et de la surface disponible. L'expression périnucléaire de la vinculine à 1 h observée sur les biomatériaux denses, quelle que soit leur composition chimique, ainsi que sur la lame de verre, (contrôle), suggère que les cellules ont commencé à former des contacts focaux pour adhérer au substrat (Figure 43). Cette étape d'adhésion est généralement précédée d'une étape d'attachement de courte durée, mettant en jeu des liaisons physico-chimiques de types interactions ioniques, ou forces de Van der Waals, (Anselme, 2000). L'absence d'expression de la vinculine dans les cellules cultivées sur les biomatériaux poreux HA ou SiHA, suggère donc que sur ces derniers, les cellules seraient encore au stade précoce d'attachement, contrairement à ce qui a pu être observé sur les biomatériaux denses, (Anselme, 2000). Etant donné que la taille des grains est du même ordre de grandeur sur les pastilles denses, HA et SiHA, (Tableau 24), on peut penser que le paramètre influant, est l'absence de porosité, qui favorise l'adhésion focale des cellules à la surface des biomatériaux. Les pores qui forment des trous de taille importante empêchent l'adhésion des cellules. On aurait pu s'attendre à ce que les résultats présentés ici aillent dans le même sens que les conclusions émises par de nombreuses études : la rugosité favorise l'adhésion cellulaire. Dans l'étude de Deligianni, des tests de cisaillement pour détacher les cellules ont montré que la force requise devait être supérieure pour détacher les cellules sur des biomatériaux de rugosité moyenne, croissante, égale à $0,733 \pm 0,203 \mu\text{m}$, $2,856 \pm 0,180 \mu\text{m}$ et $4,680 \pm 0,433 \mu\text{m}$, (Deligianni et al., 2000). Ces résultats montrent que des conclusions peuvent paraître contradictoires si des études sont réalisées en conditions non-comparables et que les biomatériaux ne sont pas rigoureusement caractérisés au préalable. En effet, dans son étude, les biomatériaux sont denses et polis avec du papier SiC, de différentes tailles de grains. Les biomatériaux comparés ici, sont bruts, non polis, certains sont denses, alors que d'autres sont poreux. Les résultats de cette analyse suggèrent que la présence de porosité augmente la force à appliquer pour détacher les cellules du biomatériau, car elle augmente la rugosité de surface. Hors, ici, la rugosité moyenne entre un biomatériau poreux SiHA et un biomatériau dense SiHA est du même ordre de grandeur (Tableau 24). L'élément discriminant ici, est bien la microporosité, mais cette dernière agirait défavorablement sur l'adhésion, par la présence de trous et non par une augmentation de la rugosité.

Concernant la surface cellulaire, l'influence bénéfique de la composition chimique SiHA, de façon indépendante de la microstructure, sur l'étalement des cellules à la surface des biomatériaux, a pu être constatée. Celles-ci présentent une surface supérieure après 1 h de culture, (Figure 45). Cet effet bénéfique pourrait être dû à l'exposition de groupements silicate en surface des pastilles, qui interagissent directement avec des protéines de la membrane cellulaire. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Schwarz qui définit le silicium comme un constituant de certains glycosaminoglycanes et polyuronides, (Schwarz, 1973). Celui-ci se présente sous forme d'un silanolate, un éther (ou ester-like) dérivé de l'acide silicique, qui pourrait se lier avec d'autres groupements fonctionnels pour jouer un rôle dans l'organisation structurale des glycosaminoglycanes et polyuronides qui sont des constituants essentiels de la MEC et du tissu conjonctif (Schwarz, 1973). Le silicium présent dans les biomatériaux SiHA, pourrait ainsi renforcer les interactions entre les cellules et le substrat, en optimisant l'architecture de l'implant osseux.

En prenant en compte les résultats des analyses de la surface cellulaire, à 1 h et le nombre d'adhésions focales, à 24 h, il peut être déduit que l'étalement cellulaire, à 1 h, qui a été influencé par la composition chimique SiHA, n'a pas influencé la qualité de l'adhésion plus tardive, à 24 h. Même si les cellules étaient plus étalées sur les biomatériaux SiHA poreux, c'est une microstructure dense et non la composition chimique, qui a favorisé par la suite l'expression d'adhésions focales. De l'adhésion cellulaire va dépendre l'activité cellulaire, (Anselme, 2000). Cependant, il est difficile d'affirmer à ce stade, qu'un nombre important d'adhésions focales est préférable. Néanmoins, le nombre d'adhésions focales a été trouvé significativement plus grand sur la lame de verre, comparé à tous les biomatériaux. La corrélation des résultats de certains critères, (viabilité, cellulaire, densité cellulaire) et tests fonctionnels (prolifération, différenciation, apoptose), a permis de connaître l'intérêt des contacts focaux sur la réponse biologique, au contact des biomatériaux de différentes microstructures et compositions chimiques.

IV.2.3.2 Biocompatibilité

Quelle que soit la composition chimique des matériaux, l'indice apoptotique est similaire et reste très faible, environ 3% d'apoptose au maximum. La microstructure n'induit pas non plus une apoptose significative comme cela a pu être observé. Il

n'existe donc pas d'effet cytotoxique du biomatériau entraînant l'apoptose cellulaire, comme cela a pu déjà être montré par l'étude de Zocca *et al*, sur des céramiques silicatées poreuses, (Zocca et al., 2015). Le taux de viabilité a été trouvé compris entre 90-100%, pour tous les biomatériaux, (Figure 46), ce qui reste un taux excellent et confirme la biocompatibilité de tous les biomatériaux, quelle que soit la composition chimique et la microstructure. Le facteur biocompatibilité, n'est donc pas le facteur limitant, qui a permis de discriminer le rôle de la composition chimique et de la microstructure sur la réponse cellulaire. En revanche, un effet de microstructure a semblé intervenir sur la densité cellulaire. Sur SiHA poreux, la densité cellulaire est moins importante que sur les autres matériaux. Ce substrat conviendrait donc moins bien aux cellules. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une surface cellulaire plus importante sur ce matériau et par conséquent, moins de cellules peuvent adhérer au substrat, faute de surface disponible. Cela pourrait également être expliqué par la diminution des contacts focaux, qui aurait provoqué une moins bonne adhésion des cellules aux substrats et par conséquent, leur détachement du substrat (Figure 45). Il peut ainsi être supposé que les cellules se détacheraient plus facilement sur ces matériaux, après 1 h et 48 h de culture, alors qu'à 24 h la densité cellulaire s'était stabilisée, (Figure 47).

Il est intéressant de constater que sur la cinétique de 1 h, 24 h et 48 h, réalisée pour étudier la viabilité cellulaire et la densité cellulaire, le point de cinétique de 24 h, était celui pour lequel les cellules ne présentaient aucune différence, quelle que soit la microstructure et la composition chimique des biomatériaux. 24 h, semblent être une étape d'adaptation des cellules, aux propriétés physico-chimiques des biomatériaux. Par contre, à 1 h et 48 h, des différences de réponses cellulaires au niveau de la microstructure ont été observées. Au temps précoce, 1 h, les cellules subiraient une phase d'adaptation, dépendante de la microstructure du biomatériau. A 24h, cette phase semble s'arrêter. A 48 h, une fois la phase d'adaptation terminée, les cellules débutent une nouvelle phase, au cours de laquelle, elles peuvent proliférer ou se différencier, en fonction de la composition chimique du matériau. Le choix d'une bonne cinétique pour mettre en évidence des différences de comportement cellulaire et éviter de passer à côté d'une information, ou d'émettre des conclusions erronées quant à l'influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux, est donc important.

IV.2.3.2.1. **Fonctionnalité des cellules au contact des biomatériaux**

IV.2.3.2.1.1. Prolifération et différenciation cellulaire

Dans ces travaux de thèses, aucune tension mécanique n'a été appliquée aux cellules, cependant, grâce aux études de Li, (Li et al., 2015), de Buckley, (Buckley et al., 1988), de Koike, (Koike et al., 2005) et de Miyajima, (Miyajima, 1990), il pourrait être émis l'hypothèse que l'état de surface des substrats, les propriétés physiques des biomatériaux, et dans le cas présent, la présence ou l'absence de porosité, ont été ressentis différemment par la cellule. En réponse aux propriétés physiques des biomatériaux, les cellules ont adapté leur activité cellulaire. En effet, ces propriétés d'adaptation des cellules aux caractéristiques physiques du substrat ont déjà été largement démontrées comme une caractéristique originale des cellules osseuses et en particulier des ostéocytes et des ostéoblastes. Ces cellules présentent une grande sensibilité aux contraintes mécaniques, qui leur permet de maintenir l'intégrité du tissu osseux et le maintien de la masse osseuse, par le contrôle orchestré de l'activité de résorption osseuse par les ostéoclastes et de formation osseuse par les ostéoblastes, c'est le remodelage osseux, (Komori, 2013), (Oers et al., 2014).

Les résultats de la prolifération ont prouvé qu'une corrélation existe entre les contacts focaux et l'activité proliférative des cellules, comme préalablement suggéré par les analyses ACP, ([Figure 35](#)). Plus l'adhésion aux biomatériaux est importante, plus les cellules prolifèrent. Cette hypothèse peut s'appuyer sur le fait que les cellules ont besoin d'un ancrage stable pour réorganiser leur cytosquelette et entreprendre le cycle de division cellulaire d'une cellule mère en deux cellules filles : la mitose. L'adhésion des cellules aux biomatériaux pourrait dépendre des adhésions focales qui agissent comme des tensions internes au niveau de la cellule, et peuvent se répercuter sur les noyaux cellulaires. Ces tensions serviraient de signaux pour l'activation de la division cellulaire. En effet, Makhija a démontré que les forces générées par le cytosquelette, sont transmises au noyau et à la chromatine, via les laminines, qui font le lien entre le cytosquelette et l'enveloppe nucléaire. Ces forces provoquent la déformation du noyau et influencent l'activité cellulaire, (Makhija et al., 2016). A 24 h, l'augmentation de la prolifération constatée sur les biomatériaux poreux, pourrait conduire à un ralentissement des mécanismes de différenciation, comme cela a pu être constaté (Shi et al., 2015), (Karageorgiou and Kaplan, 2005), (Takahashi and Tabata, 2004).

Cependant, dans le cas des biomatériaux, aucune différence significative en terme de différenciation, (activité enzymatique de l'ALP à 24 h), n'est observée, ce qui suggère que la microstructure des biomatériaux n'influence pas la différenciation, à l'inverse de la prolifération.

La présence ou l'absence de pores au niveau de la microstructure, favorisent un ancrage des cellules aux biomatériaux et pourraient induire une réorganisation du cytosquelette, créant ainsi des tensions internes aux cellules. Cette hypothèse peut être étayée par des travaux cités précédemment qui ont démontré que la prolifération tout comme la différenciation sont stimulées par les contraintes mécaniques. Des tests de tensions mécaniques ont permis de déterminer la tension mécanique optimale pour la différenciation et la prolifération de cellules souches stromales ST2. Ces résultats indiquent que les contraintes mécaniques de plus faible amplitude stimulent la différenciation ostéoblastique des cellules stromales, contrairement à la prolifération qui l'est pour des amplitudes plus élevées, (Koike et al., 2005). Dans notre cas, aucun changement de la différenciation entre les biomatériaux n'est constaté. Néanmoins, lorsque les cellules expriment d'importants contacts focaux, les tensions s'exerçant sur ces dernières pourraient être d'amplitudes élevées ce qui conduit à une augmentation de la prolifération. Notre modèle semble donc en accord avec celui de Koike. Bien qu'il n'y ait pas eu de contrainte mécanique directement appliquée aux cellules, permettant de corréliser directement les résultats obtenus dans cette étude aux résultats de la littérature, les propriétés physiques des substrats, leur microstructure et particulièrement la microporosité, via la présence ou l'absence de trous, ont agi comme des tensions internes dans la cellule. Au bilan, c'est la microporosité, plus que la composition chimique, qui a influencé l'activité fonctionnelle, (prolifération et différenciation) des cellules, à 24 h. En effet, au regard des caractérisations physico-chimiques réalisées préalablement, il a pu être démontré que ce sont les paramètres physiques qui varient entre un biomatériau dense et poreux. En effet, tous les biomatériaux denses ont la même mouillabilité et potentiel zêta (Tableau 24). En ce qui concerne la topographie des biomatériaux, les résultats obtenus doivent être pris avec précautions, du fait des limitations, dues à la technique. Néanmoins, la RA des biomatériaux denses SiHA est similaire à celle des biomatériaux poreux SiHA. L'élément discriminant est la présence ou l'absence de micropores.

Expression des marqueurs ostéogéniques

A 24 h, l'ostéopontine est principalement exprimé par les cellules sur HA et SiHA poreux, suggérant que la microstructure poreuse favorise l'expression de marqueurs de différenciation cellulaire, ce qui est en accord avec la diminution de la prolifération constatée. Des travaux antérieurs ont également montré qu'une structure poreuse favorise la différenciation et l'expression de l'ostéopontine, (Bernhardt et al., 2013). L'expression de l'ostéopontine dans les matériaux denses suggère une différenciation active sur ces matériaux, à partir de 7 jours. Il existerait donc un décalage dans le temps du mécanisme de différenciation dû à la microstructure. Au contraire, sur HA poreuse l'expression de l'ostéopontine disparaît, tandis qu'elle est maintenue sur SiHA poreuse. L'effet exogène du silicium sur la différenciation des ostéoblastes est renforcé sur les matériaux silicatés, (Gupta et al., 2010). A 7 jours, le silicium pourrait favoriser le maintien de l'état de différenciation des ostéoblastes sur les pastilles SiHA poreuses. L'expression transcriptionnelle du collagène de type I coïncide avec l'expression protéique de l'ostéopontine à 7 jours ([Figure 52](#), [Figure 53](#)). On peut émettre l'hypothèse d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle du collagène de type I, par l'ostéopontine. La régulation de l'expression de l'ostéopontine par le collagène de type I est déjà connue (Viale-Bouroncle et al., 2014). Cependant, il pourrait exister un mécanisme de régulation croisée, (boucle de régulation), permettant lors de l'augmentation de l'ostéopontine, d'activer l'expression transcriptionnelle de collagène I, afin de favoriser la différenciation. Si dans la littérature la plupart des effets du silicium sur l'expression de marqueurs ostéogéniques concernent l'ALP et le collagène de type I, (Díaz-Rodríguez et al., 2015), (Carlisle, 1970), (Pandis et al., 2015), (Reffitt et al., 2003), dans cette étude, un effet du silicium a été constaté sur le maintien de l'expression d'ostéopontine dans le temps par les cellules ostéoblastiques.

IV.2.3.2.2. Influence de la concentration en silicium et calcium du milieu de culture sur l'activité cellulaire

A 1 h, les concentrations en silicium retrouvées dans le milieu de culture avec ou sans cellule ont laissé supposer que les cellules n'ont pas consommé le silicium relargué par les pastilles SiHA denses et poreuses. Les résultats biologiques observés sur les pastilles SiHA, qu'elles soient denses ou poreuses, n'ont donc pas été directement influencés par la libération en silicium. Par contre, à 24 h, comme 0,5 mM de silicium

en moins a été libéré par les pastilles SiHA poreuses cultivées avec les cellules, on pourrait supposer que les cellules ont utilisé du silicium. Cela pourrait expliquer le fait qu'à 7 jours, les cellules cultivées sur SiHA poreux exprimaient encore l'ostéopontine, alors que celles cultivées sur HA poreux, ne l'exprimaient plus. En effet, Reffitt a prouvé que les cellules ostéoblastiques humaines, MG63, traitées avec 0,01 et 0,02 mM d'acide orthosilique expriment davantage l'ALP, le collagène de type I et l'ostéoclastine, (Reffitt et al., 2003). Beaucoup d'études ont d'ailleurs montré l'influence bénéfique du silicium sur la différenciation de cellules ostéoblastiques. Le silicium favoriserait la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et la formation de matrice minéralisée, (Pandis et al., 2015). La libération de silicates par des bioverres augmente l'expression de l'activité de l'ALP par les MC3T3-E1, (Shah Mohammadi et al., 2014). Le calcium est aussi un élément très utilisé par les cellules osseuses, (Marie, 2010). De plus, Il pourrait exister une compétition entre l'absorption du silicium (sous forme silice) et du calcium, qui possède la même voie d'absorption, (Jugdaohsingh, 2007). En effet, le calcium est un élément susceptible d'être relargué en quantité importante par tous les biomatériaux de phosphate de calcium, (Hench, 1998). Néanmoins, le calcium retrouvé dans la solution, est celui relargué par les pastilles, diminué du calcium précipité, (Elliott, 1994). Cependant, comme les mesures de concentrations en calcium du milieu de culture n'ont pas permis de mettre en évidence une consommation par les cellules du fait du phénomène de précipitation, il est difficile de prouver que les cellules ont consommé du calcium. Néanmoins, en plus des effets directs de microporosité énoncés précédemment, la différence de comportement des pastilles denses et poreuses, en terme de concentration en calcium dans le milieu de culture, laisse suggérer que ces concentrations différentes en calcium, retrouvées dans le milieu de culture, pourraient être à l'origine des différents comportements cellulaires observés entre les cellules cultivées sur une pastille dense, comparée aux cellules cultivées sur une pastille poreuse. Cette hypothèse ne peut toutefois pas être maintenue, car les analyses de l'expression protéique ostéogénique réalisée sur les cellules cultivées sur la pastille et celles cultivées autour de la pastille, ont prouvé que l'influence de la microstructure a eu lieu lorsque les cellules ont été cultivées directement sur la pastille. Les cellules cultivées autour de la pastille, quelle que soit la microporosité, ou la composition chimique, exprimaient les protéines ostéogéniques de façon similaire.

IV.2.4. Conclusion de l'étude

Cette étude a montré que la première étape d'attachement des cellules est influencée par la microstructure des biomatériaux, quelle que soit la composition chimique. La microstructure dense s'est avérée plus avantageuse pour l'adhésion cellulaire. En effet, après 1 h, les cellules ont développé des contacts focaux ciblés, principalement en périnucléaire. Par la suite, les cellules avaient adhéré aux biomatériaux plus fortement, en développant des adhésions focales, à l'extrémité des fibres de stress d'actine, répartis dans tout le cytoplasme cellulaire. La substitution en silicium a cependant été plus favorable à un étalement cellulaire. Quelle que soit la microstructure, des cellules de plus grande surface ont été retrouvées sur les biomatériaux SiHA. De l'ensemble des résultats concernant les mécanismes d'adhésion, on peut en déduire que c'est le matériau SiHA dense qui s'est avéré le plus favorable pour l'adhésion cellulaire, puisque les cellules étaient plus étalées et développaient plus de contacts focaux.

Un excellent taux de viabilité a été observé, quelle que soit la composition et la microstructure des biomatériaux. Les études de viabilité n'ont fait que confirmer des résultats bien admis : les biocéramiques de phosphate de calcium sont biocompatibles.

L'activité enzymatique de l'ALP et l'expression protéique de l'ostéopontine ont montré qu'une microstructure poreuse a favorisé la différenciation plus rapide des cellules, comparée aux biomatériaux denses, sur lesquels les cellules prolifèrent plus. Par contre, une synergie entre la microstructure poreuse et la substitution en silicium semble maintenir les cellules dans un état différencié et semble agir directement sur le maintien de l'expression d'ostéopontine par les cellules.

L'effet du silicium sur la différenciation a pu être confirmé par les mesures de niveau de silicium dans le milieu de culture. C'est probablement l'utilisation de ce silicium par les cellules, qui a permis aux cellules sur les pastilles poreuses SiHA, d'exprimer l'ostéopontine à 7 jours, alors que les cellules sur des pastilles d'HA, mais sans silicium, ne l'exprimaient pas. Il a été montré qu'il y a eu reprécipitation du calcium sur les biomatériaux, donc, incapacité à connaître le niveau de calcium véritablement consommé par les cellules. Cependant, les analyses réalisées sur les cellules cultivées à côté de la pastille ont prouvé qu'il n'y a pas eu de différence d'expression protéique en fonction de la microstructure de la pastille. Par conséquent, on peut en

déduire que les différences de calcium retrouvées dans le milieu de culture des pastilles poreuses, comparées aux pastilles denses, n'ont pas contribué à influencer l'expression de protéine ostéogénique à 7 jours. Finalement, un effet de la microstructure a été observé principalement sur l'adhésion cellulaire et l'activité fonctionnelle des cellules. La substitution en silicium a également joué un rôle sur l'étalement des cellules, mais ce paramètre n'a pas influencé l'activité fonctionnelle des cellules par la suite. Le biomatériau poreux SiHA semble plus particulièrement adapté pour orienter l'activité des cellules ostéoprogénitrices en cellules matures capables de synthétiser la matrice osseuse.

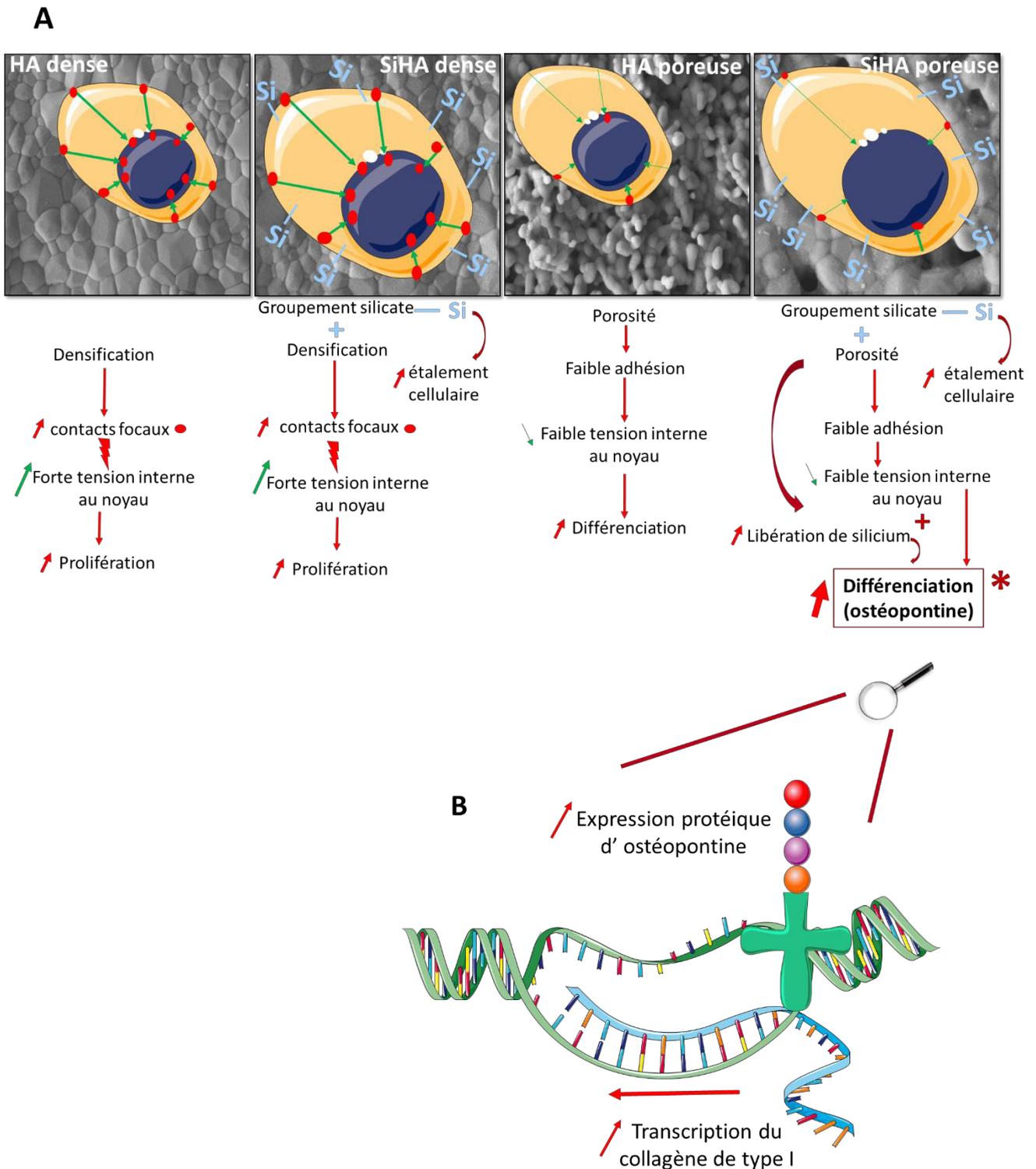


Figure 56 : schéma récapitulatif de l'influence de la microstructure et des ions silicates sur l'activité ostéoblastique.

A) répercussion des mécanismes d'adhésion sur l'activité fonctionnelle des MC3T3-E1 B) régulation transcriptionnelle du collagène de type I par l'ostéopontine (ce schéma est issu de l'hypothèse formulée selon les quelques résultats obtenus. Des manipulations supplémentaires (l'inactivation du gène et/ou de la protéine ostéopontine par exemple) sont indispensables pour valider cette hypothèse.

IV.3. Réponse ostéoblastique et ostéoclastique au biomatériau d'hydroxyapatite carbonatée de type A/B

IV.3.1. Contexte et objectif de l'étude

Les études sur le rôle de la substitution en ions carbonates dans la structure apatitique font l'objet de beaucoup d'attention car cette composition chimique se rapproche grandement de celle de la phase minérale de l'os naturel. Scientifiques et cliniciens espèrent en des résultats biologiques améliorés de l'hydroxyapatite carbonatée pour optimiser la régénération osseuse.

Les analyses ACP précédentes ont montré qu'il sera compliqué de discriminer l'influence de la microstructure des biomatériaux CHA denses et CHA poreux sur l'activité ostéoblastique et ostéoclastique. Cependant, la composition chimique, (substitution en carbonates), a été identifiée pour influencer l'activité cellulaire, de façon particulière et différente, des biomatériaux HA et SiHA, quelle que soit la microstructure, (Figure 35, Figure 36).

Dans cette partie, les réponses des cellules osseuses, en contact avec l'hydroxyapatite pure, de microstructure dense ou poreuse et l'hydroxyapatite substituée en carbonate, de microstructure dense ou poreuse, ont été étudiées. L'hydroxyapatite stœchiométrique HA, dense et poreuse, $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, a été utilisée en tant que référence. L'hydroxyapatite carbonatée CHA, à 4,4 % massique, de type A/B : $(Ca_{9,5}(PO_4)_{5,5}(CO_3)_{0,48}(OH)_{1,08}(CO_3)_{0,21})$, de microstructure dense et poreuse, a été utilisée comme substrat pour les cultures cellulaires. Ces biomatériaux céramiques ont été préalablement caractérisés par l'analyse de la pureté de phase, la porosité ouverte, la taille et la distribution des pores, la taille des grains, la surface spécifique, la rugosité de surface, le potentiel zêta et la mouillabilité (Tableau 24) Des tests *in vitro* avec la lignée murine de cellules pré-ostéoblastiques, MC3T3-E1 et la lignée RAW 264.7, de monocytes/macrophages, ont été réalisés. Ces deux lignées cellulaires sont censées donner un aperçu des fonctions des deux types de cellules principalement impliquées dans le processus de régénération osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Une cinétique appropriée a été utilisée pour étudier différents critères et différentes fonctionnalités : l'adhésion, la prolifération, la différenciation, la viabilité et le métabolisme cellulaire. L'objectif principal était de

déterminer si le biomatériau CHA : $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,08}(\text{CO}_3)_{0,23}$ possédait des propriétés supérieures au biomatériau HA en matière d'induction de la régénération osseuse.

IV.3.2. Résultats

IV.3.2.1 Comportement des MC3T3-E1 au contact des différents biomatériaux

IV.3.2.1.1. Morphologie, densité et viabilité cellulaires

Les images en MEB ont confirmé la biocompatibilité des 4 biomatériaux. Les cellules ont adhéré sur les 4 biomatériaux – une forme arrondie, à 1 h, suivie d'un étalement du corps cellulaire et de la formation de filopodes, à 48 h –, ([Figure 57](#)). Les 4 biomatériaux sont donc capables d'induire une réponse cellulaire permettant le maintien de l'activité fonctionnelle des cellules ostéoblastiques indispensables à la formation d'une matrice minérale osseuse.

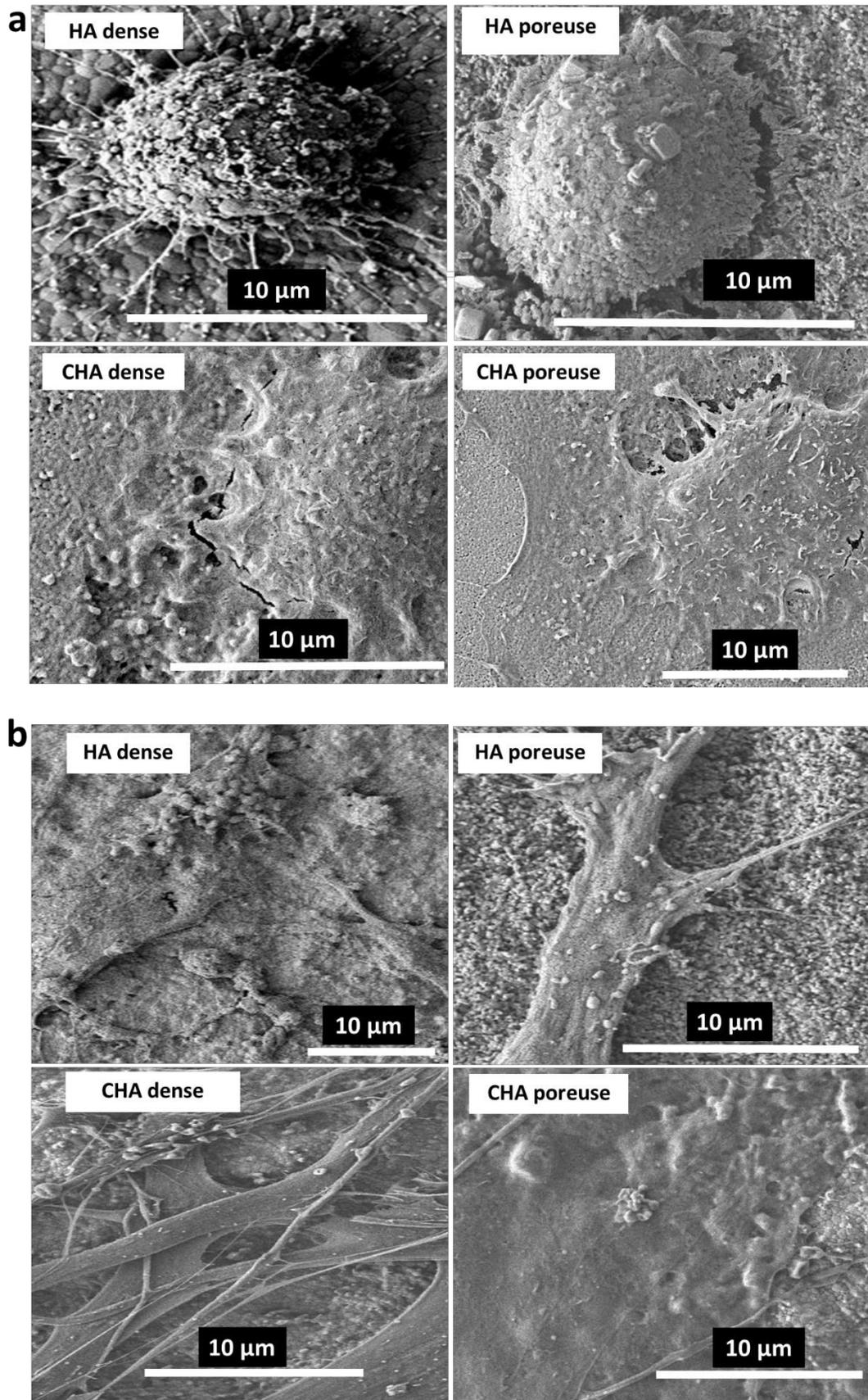


Figure 57 : images en MEB des cellules MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux a) après 1 h de culture et b) après 48 h de culture.

Les MC3T3-E1 cultivées au contact des 4 variantes de biomatériaux, après 1 h et 24 h de culture, formaient une couche cellulaire homogène à la surface des pastilles et positive pour le marquage à la calcéine. A 24 h, le corps cellulaire était plus allongé, avec des extensions membranaires : les filopodes. A 48 h, la couche cellulaire commençait à être confluite, sur tous les biomatériaux et particulièrement pour les biomatériaux CHA, denses et poreuses, (Figure 58).

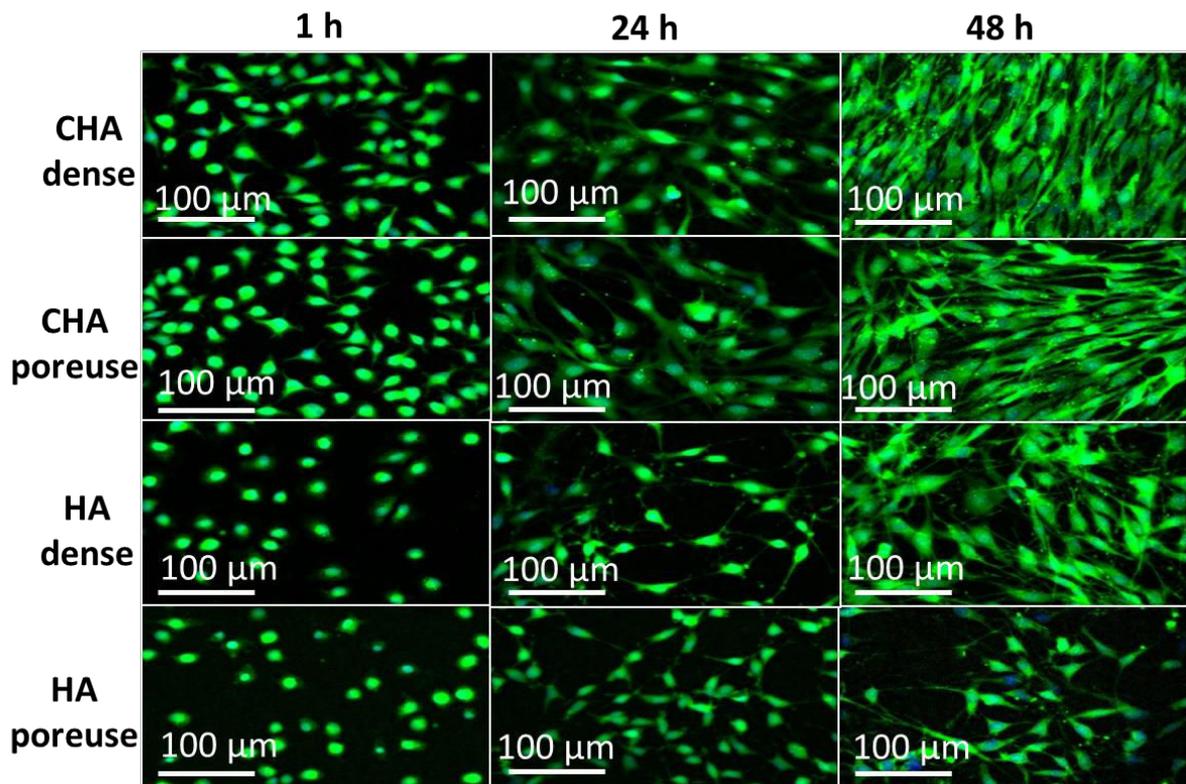


Figure 58 : images en microscopie à épifluorescence des cellules MC3T3-E1

Marquage par la calcéine (vert) des cellules MC3T3 –E1. La présence de la calcéine qui est un colorant vital dans les cellules, indique que la viabilité cellulaire est bonne sur l’ensemble des matériaux et qu’elle ne se dégrade pas avec le temps.

La qualité de l’adhésion cellulaire peut être estimée en comptant le nombre de cellules adhérentes aux biomatériaux : densité cellulaire. Ainsi, les cellules totales adhérentes ont été comptées. Les cellules positives pour la calcéine : viabilité cellulaire, ont également été estimé.

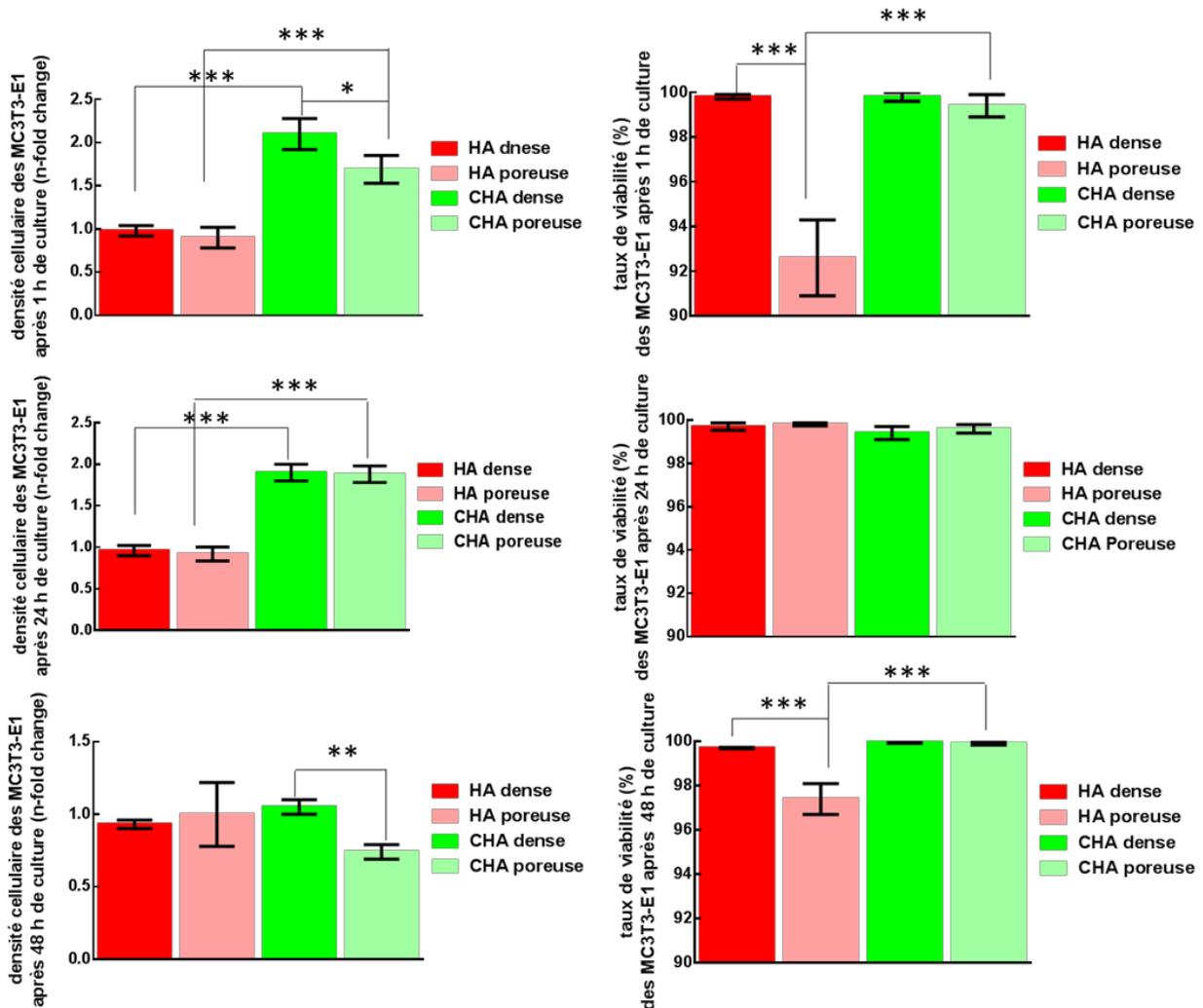


Figure 59 : densité et viabilité des cellules MC3T3-E1 au contact des différents biomatériaux après 1 h, 24 h et 48 h de culture.

La densité et la viabilité cellulaire ont été analysées sur 10 images x 3 pastilles, soit 30 images. Le résultat est une moyenne \pm SD. La densité cellulaire est normalisée par la valeur du contrôle : la lame de verre. (Sur l'axe en ordonnée le *n-fold change* est exprimé par rapport à la lame de verre). Le rapport cellules marquées par la calcéine / cellules totales permet d'analyser la viabilité.

L'analyse de la densité cellulaire à 1 h et 24 h, montre que les cellules sont plus nombreuses, sur les biomatériaux CHA, denses et poreux, tandis qu'à 48 h, la densité cellulaire était similaire sur les 4 biomatériaux. Néanmoins, cette densité est significativement inférieure sur CHA poreuse en comparaison de CHA dense, à 1 h. Concernant la viabilité cellulaire, les résultats confirment les données de la littérature, (Detsch et al., 2010), sur la biocompatibilité des matériaux CHA et des HA, avec un

taux de viabilité de 90 à 100%. Bien que la viabilité cellulaire soit le plus faible pour les HA poreuses, à 1 h et 48 h, les variations restent relativement minimales avec des taux de viabilité d'environ 92 et 97% (Figure 59).

IV.3.2.1.2. Tests fonctionnels

La prolifération augmente significativement sur les matériaux CHA par rapport aux biomatériaux HA possédant la même microstructure. En revanche, la prolifération sur les biomatériaux HA est significativement plus forte lorsque la microstructure est dense comparée aux biomatériaux poreux (Figure 60 a). La différenciation estimée par l'activité de l'ALP, pour un même point de cinétique, 24 h, ne montre pas de différences significatives (Figure 60 b).

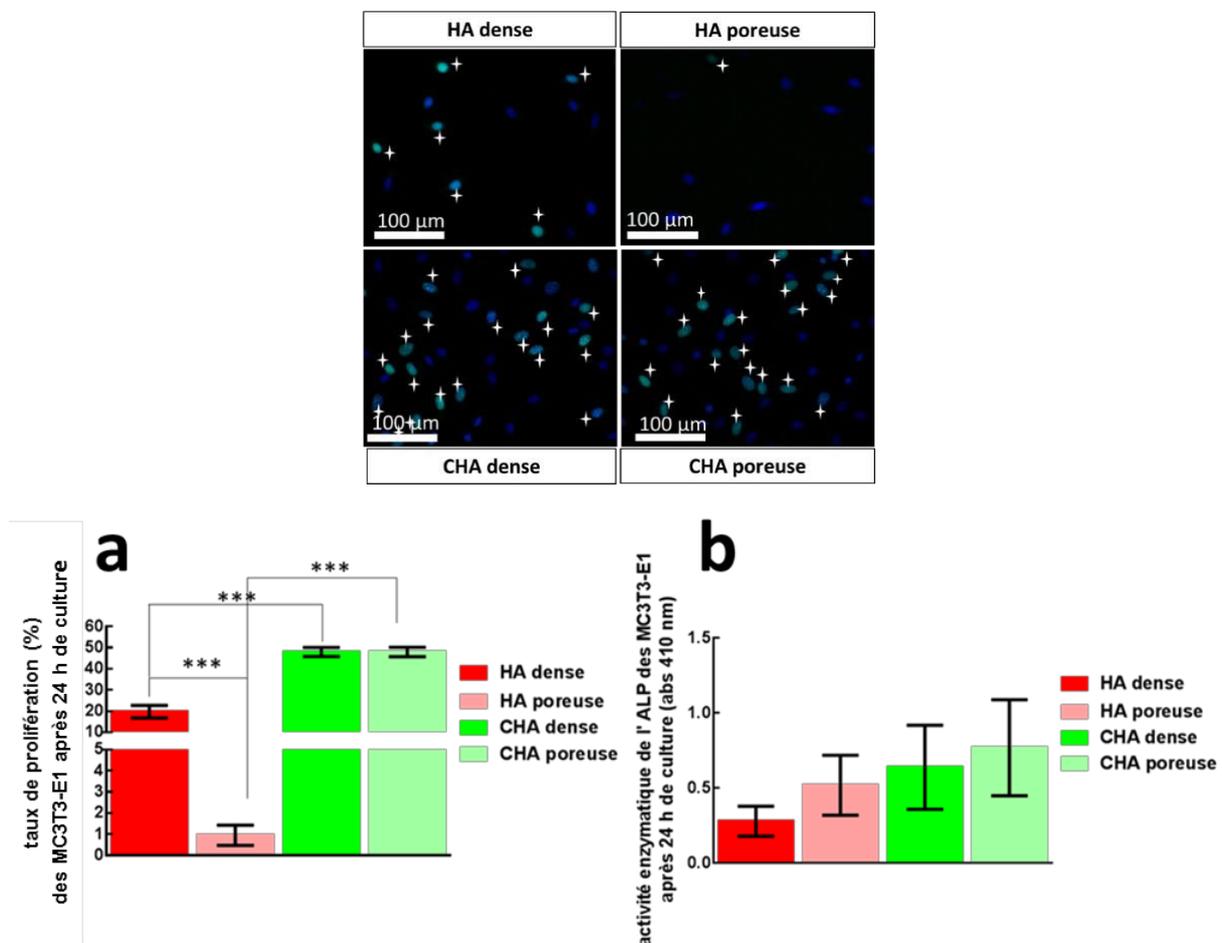


Figure 60 : analyses fonctionnelles (prolifération et différenciation) des MC3T3-E1, cultivées 24 h sur les biomatériaux.

Les images en microscopie à épifluorescence représentent les noyaux cellulaires marqués à l'EdU. Le taux de prolifération est mesuré en analysant 10 images x 3 pastilles, soit 30 pastilles,

en calculant le ratio nombre de cellules proliférantes / cellules totales. L'activité enzymatique de l'ALP a été mesurée 6 fois. Les résultats sont la moyenne des 6 mesures \pm SD.

IV.3.2.2 Mesure en calcium du milieu de culture

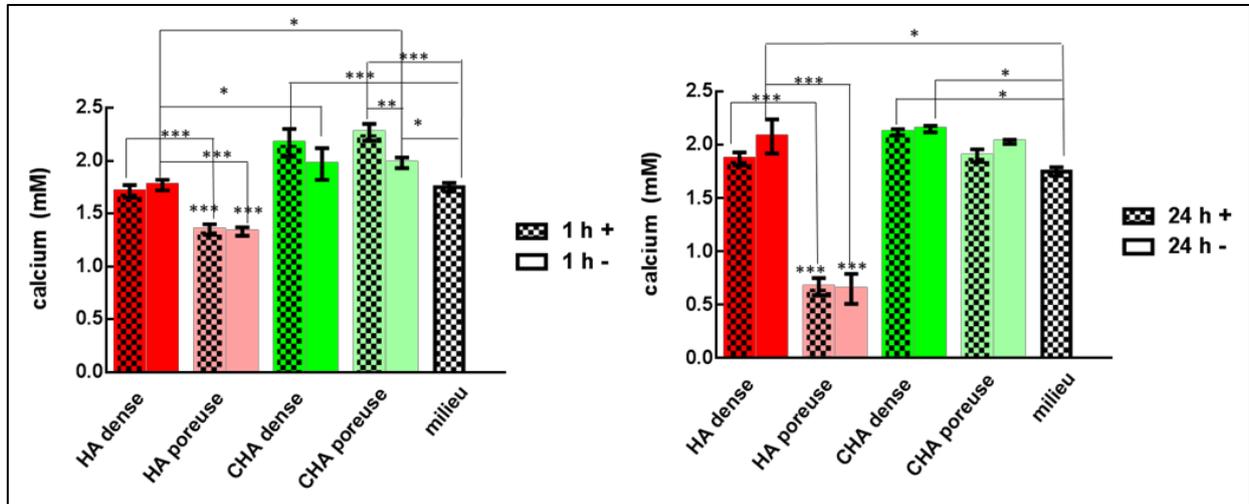


Figure 61 : concentration en calcium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec les cellules (+) ou sans cellule (-), après 1 h et 24 h.

Les résultats sont la moyenne d'un minimum de 4 mesures \pm SD. Les résultats sont les valeurs brutes (la valeur initiale du milieu de culture n'a pas été soustraite).

En comparant le calcium dans le milieu de culture des 4 biocéramiques,ensemencées ou non avec des cellules, il peut être constaté que le niveau de calcium n'est pas significativement différent, en présence et en l'absence de cellules, excepté pour CHA poreux. A 1 h, significativement plus de calcium a été mesuré dans le milieu contenant les pastillesensemencées avec les cellules, comparées aux pastilles seules. Plus de calcium a également été retrouvé dans le milieu de culture des pastilles CHA, par rapport à la concentration en calcium dans le contrôle, (milieu de culture). La teneur en calcium était quasi similaire dans le milieu de culture de HA denses, comparée au contrôle. Par contre, elle était inférieure dans le milieu de culture de HA poreuses, comparée au contrôle. A 24 h, il y a eu une augmentation en calcium dans le milieu par rapport à 1 h, pour HA dense. Il y a eu par contre une diminution de la concentration calcique de 1 h à 24 h, dans le milieu de HA poreuse. Le niveau en calcium est resté quasi stable de 1 h à 24 h dans le milieu des CHA, quelle que soit la microstructure.

IV.3.2.3 Comportement cellulaire des RAW 264.7 au contact des différents biomatériaux

IV.3.2.3.1. Adhésion et différenciation cellulaire

IV.3.2.3.1.1. Immunofluorescence

Après 14 jours dans le milieu de culture différenciant, sur tous les biomatériaux, la présence de cellules multinucléées a pu être observée (Figure 62, flèches blanches). Par contre un mélange de cellules mononucléées et multinucléées persistait. Des cellules aux noyaux de tailles importantes excentrés dans le cytoplasme : les macrophages (étoiles jaunes sur la figure), et des cellules mononucléées de plus petites tailles : les monocytes (flèches roses), pouvaient encore être visibles (Figure 62 b).

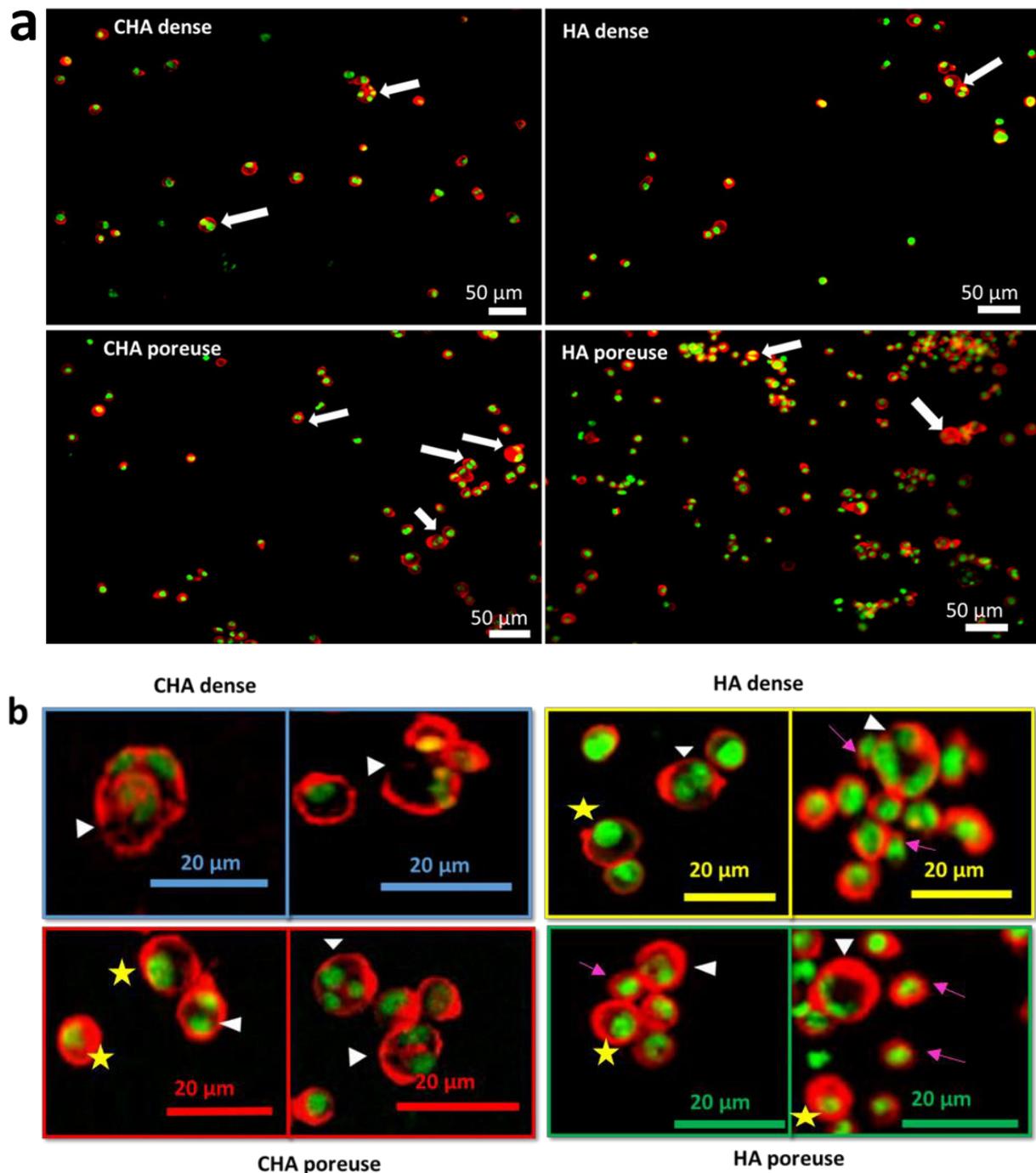


Figure 62 : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7 cultivées sur les biomatériaux dans le milieu différenciant (M-CSF et RANK-L) après 14 jours de culture. a) faible grossissement (X10) et b) zoom sur une cellule multinucléée

Vert : noyaux marqués avec du sytox et **rouge** : ring d'actine marqués avec la phalloïdine. Les triangles blancs montrent des ostéoclastes multinucléés. Les flèches roses montrent des monocytes. Les étoiles jaunes montrent des macrophages.

TRAP est une enzyme exprimé par les ostéoclastes. Le marquage des cellules pour TRAP est un test couramment utilisé pour vérifier la différenciation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes (paragraphe III.2.6.4.1). Le marquage des cellules pour TRAP, a confirmé que les cellules multinucléées observées sur les biomatériaux étaient bien des ostéoclastes (Figure 63).

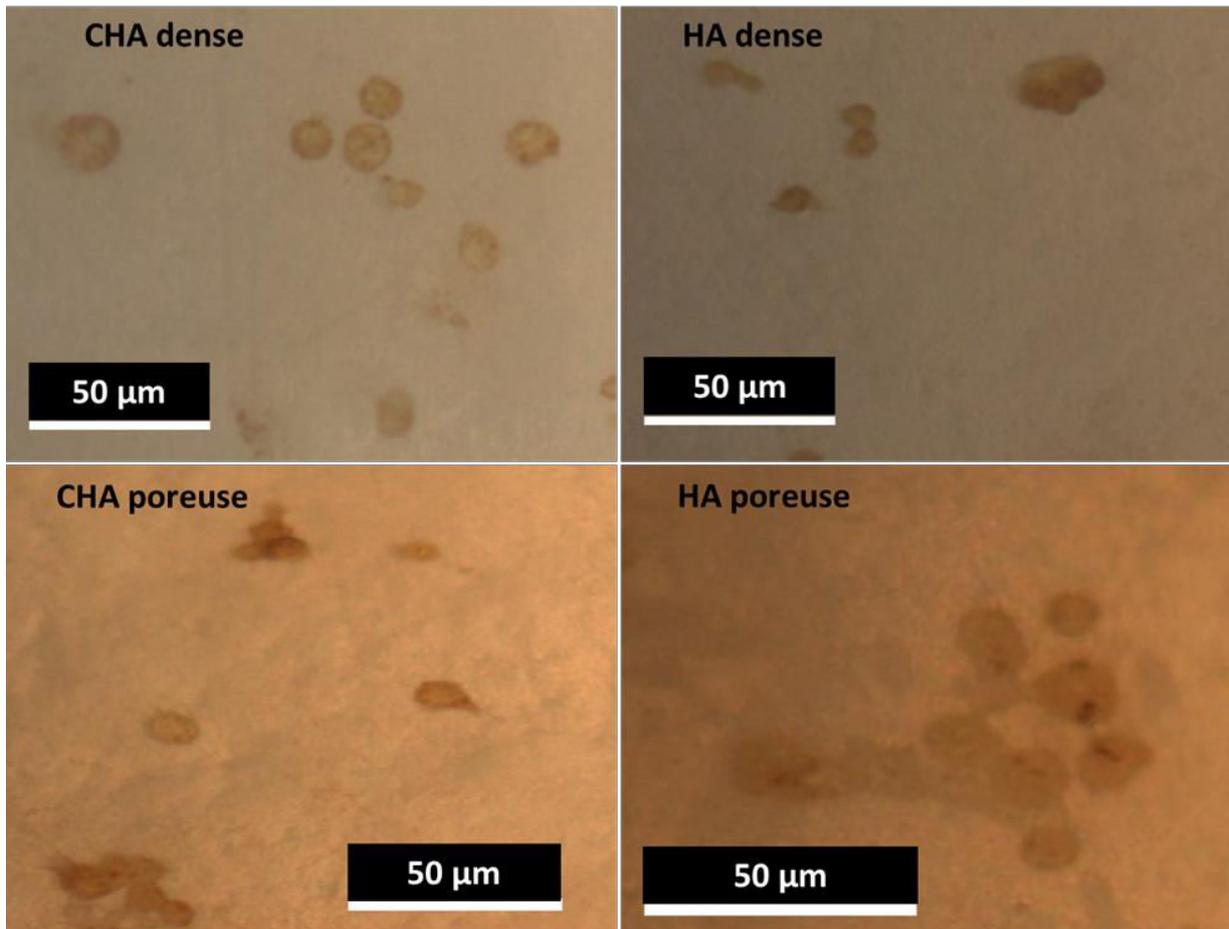


Figure 63 : expression de TRAP dans les cellules RAW 264.7 cultivées sur différents biomatériaux, dans un milieu de culture différenciant.

IV.3.2.3.1.2. MEB

Les images en MEB ont confirmé la présence d'ostéoclastes en montrant la morphologie typique de ces cellules (Figure 10). Le dôme polarisé au pôle apical des cellules (sorte de rugosité) a pu être observé. La bordure en brosse localisée tout autour des cellules et la zone de scellement entre la cellule et le biomatériau ont également été visualisées (Figure 64).

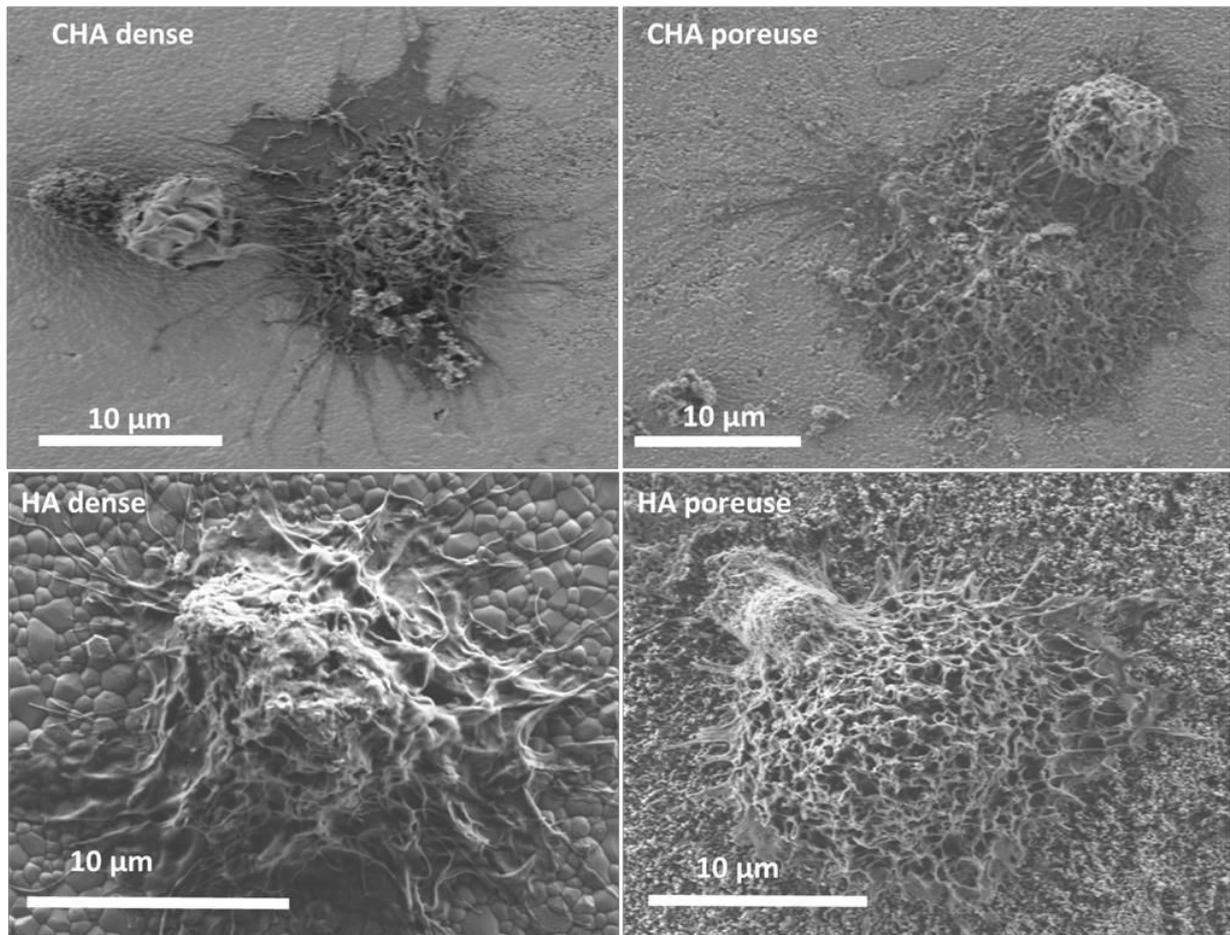


Figure 64 : images en MEB des cellules RAW 264.7 cultivées dans le milieu différenciant sur les biomatériaux pendant 14 jours

IV.3.2.3.1.3. Estimation quantitative de l'adhésion et de la différenciation

La densité cellulaire et le nombre de cellules multinucléées ont été analysés. Le résultat de la densité cellulaire a été normalisé par les valeurs obtenues sur la lame de verre, utilisée comme contrôle. La densité de cellules sur le biomatériau HA poreux est 2 fois supérieure à celle sur le biomatériau CHA poreux, suggérant que la composition chimique pourrait influencer la densité cellulaire. Cependant, cette hypothèse est en partie controversée par la différence significative observée entre CHA dense et poreuse. La densité cellulaire sur CHA poreuse était similaire à la densité sur la lame de verre et égale à environ 1 ($0,90 \pm 0,16$) (Figure 65 a). En revanche, de façon générale, un faible taux de cellules multinucléées a été observé sur tous les biomatériaux, (un taux allant de $0,001 \pm 0,0007$ à $0,1 \pm 0,02$). Des cellules de 2 à 4 noyaux ont été observées sur tous les biomatériaux. Un nombre significativement plus important de cellules multinucléées à 4 noyaux a été retrouvé sur CHA dense, (Figure 65 d) mais restait négligeable, ($0,006 \pm 0,004$).

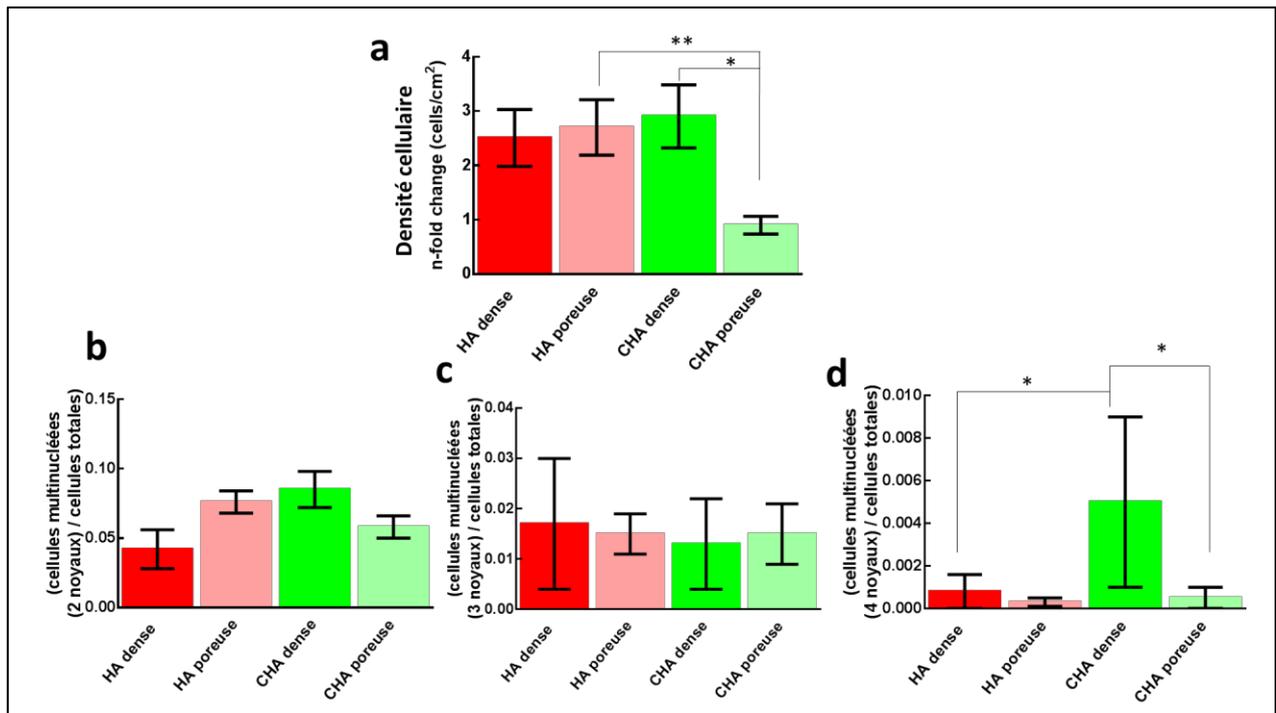


Figure 65 : analyse de la densité cellulaire et de la différenciation des cellules RAW 264.7. a) densité cellulaire et b), c), d), nombre de cellules multinucléées.

Les résultats ont été normalisés par rapport à la lame de verre.

Les analyses sont réalisées sur 10 champs x 3 pastilles indépendantes, soit 30 images. Les résultats sont la moyenne des 30 mesures \pm SD.

IV.3.2.3.2. Viabilité cellulaire

Deux tests complémentaires ont été réalisés pour estimer la cytobiocompatibilité des 4 biomatériaux. Un test de cytotoxicité : le test WST8 et un test de mesure de l'activité de la LDH (paragraphe III.2.3.2.1 et paragraphe III.2.5). Les résultats ont été normalisés avec la lame de verre, utilisée comme contrôle interne.

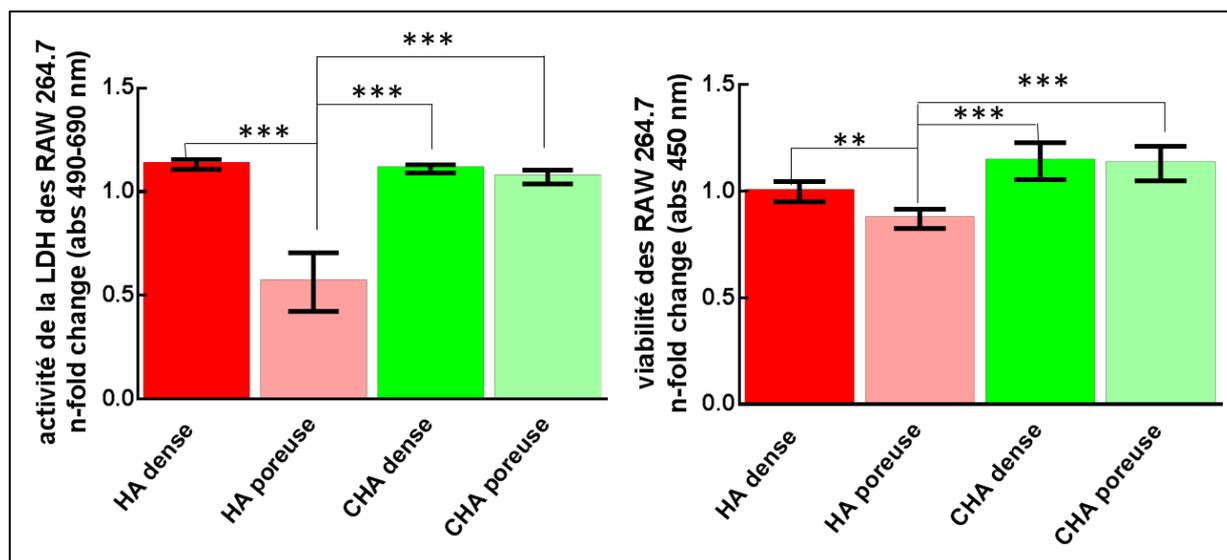


Figure 66 : tests de viabilité des RAW 264.7.

Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD. La normalisation est réalisée par rapport à la lame de verre (sur l'axe en ordonnée le *n-fold change* est exprimé par rapport à la lame de verre).

Concernant le test de l'activité de la LDH, significativement moins d'activité cellulaire a été observée sur HA poreuse, comparée aux autres matériaux. Cette activité était près de deux fois inférieure, comparée à la lame de verre et égal à $0,56 \pm 0,14$, (Figure 66).

Le test WST8 a confirmé un taux de viabilité cellulaire significativement plus faible pour HA poreuse ($0,87 \pm 0,04$), par rapport aux autres biomatériaux mais également par rapport au contrôle interne : la lame de verre. Indépendamment de la microstructure, les biomatériaux CHA ont montré un taux de viabilité supérieur à celui de la lame de verre. Le taux est de $1,14 \pm 0,09$ pour CHA dense et $1,13 \pm 0,08$ pour CHA poreuse respectivement (Figure 66).

IV.3.2.3.3. Tests fonctionnels

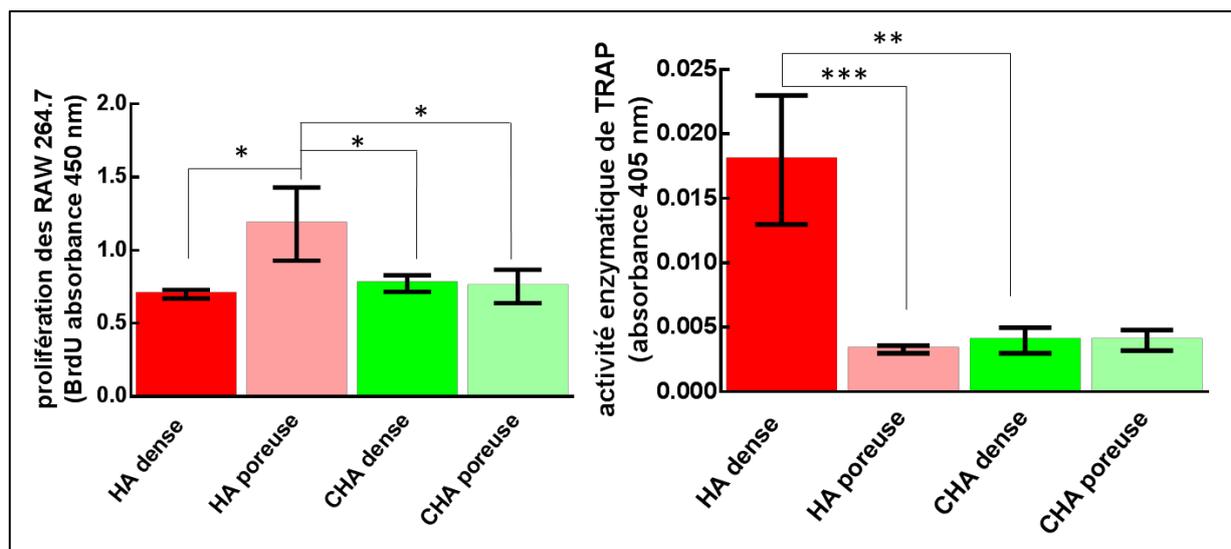


Figure 67 : étude de la prolifération et de l'activité enzymatique de TRAP, (marqueur de différenciation ostéoclastique), dans les cellules RAW 264.7, cultivées sur différents matériaux.

Les histogrammes représentent la moyenne de 3 ou 6 réplicats indépendants \pm SD.

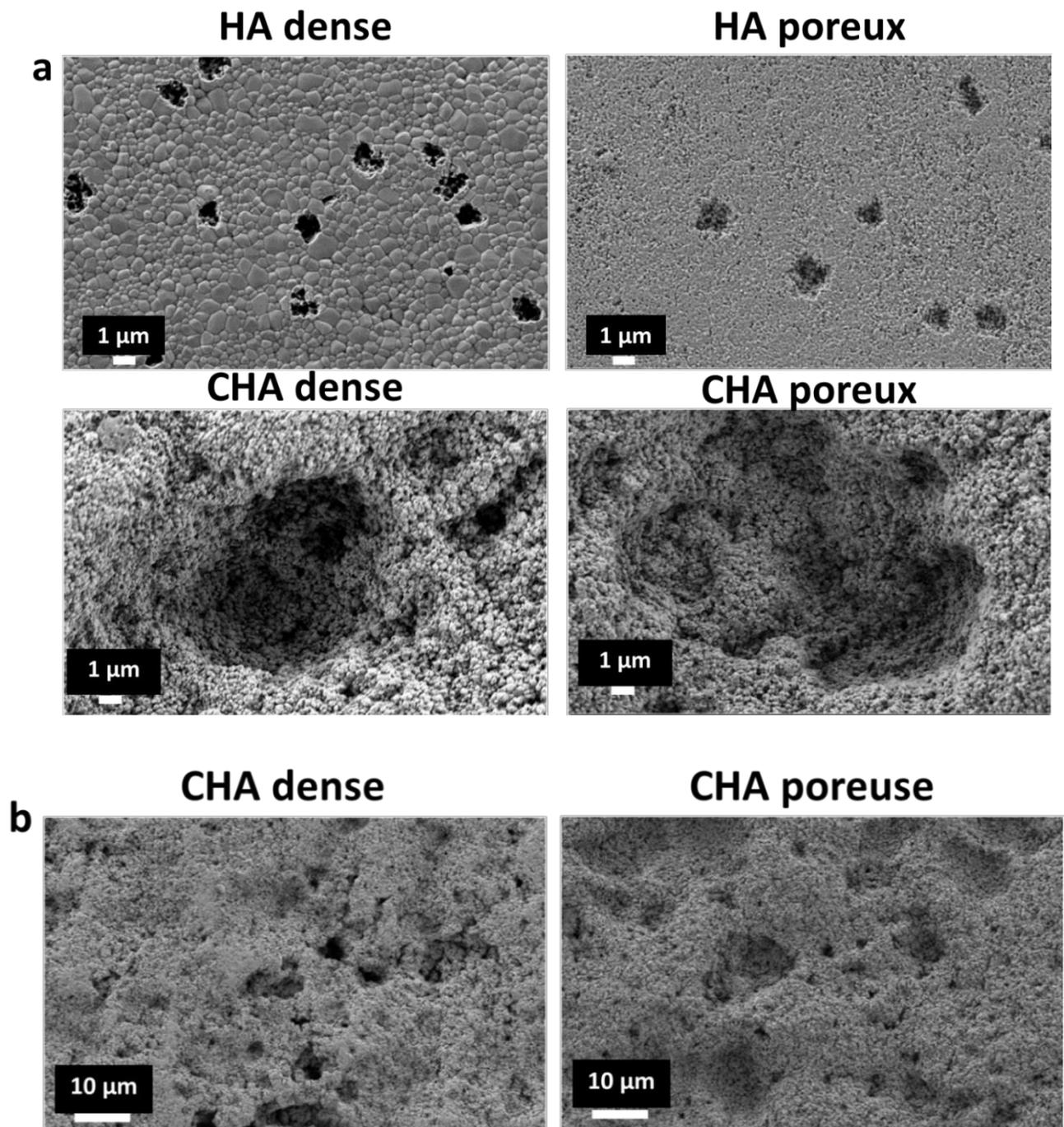
Le taux de prolifération était similaire sur tous les biomatériaux. Aucune différence significative n'a été constatée entre les biomatériaux. Le taux était légèrement inférieur à celui du contrôle interne : la lame de verre, pour les biomatériaux HA denses et CHA, quelle que soit la microstructure. Le taux était similaire entre les biomatériaux HA poreux et la lame de verre, avec une absorbance respective de $0,99 \pm 0,13$ et $0,99 \pm 0,16$.

Concernant, l'activité enzymatique de TRAP 5b, elle était significativement supérieure sur HA dense, en comparaison des autres biomatériaux. La valeur d'absorbance était près de trois fois supérieure à tous les autres biomatériaux, mais restait, cependant, très faible et égale à $0,018 \pm 0,005$. Dans le cas du biomatériau HA poreux, le taux de prolifération est maximum tandis que l'activité enzymatique de TRAP 5b est la plus faible de toutes les valeurs mesurées pour les différents biomatériaux (Figure 67).

IV.3.2.3.4. Biorésorption

Des lacunes de résorption ont pu être observées sur tous les biomatériaux. Par contre, la morphologie des lacunes était différente en fonction de la composition. Sur les biomatériaux HA, quelle que soit la microstructure, de petites lacunes de résorption aux contours bien délimités, ont pu être observées. Sur les biomatériaux CHA, quelle

que soit la microstructure, des lacunes de taille 10 fois supérieure avec des contours irréguliers ont été observées, (Figure 68 a). En considérant des images à plus faible grossissement, il est possible de constater que sur les biomatériaux CHA, la totalité de la surface est endommagée de façon homogène avec des lacunes de tailles différentes, (Figure 68 b). Un grossissement supérieur a permis de constater l'altération de la surface des grains (Figure 68 c).



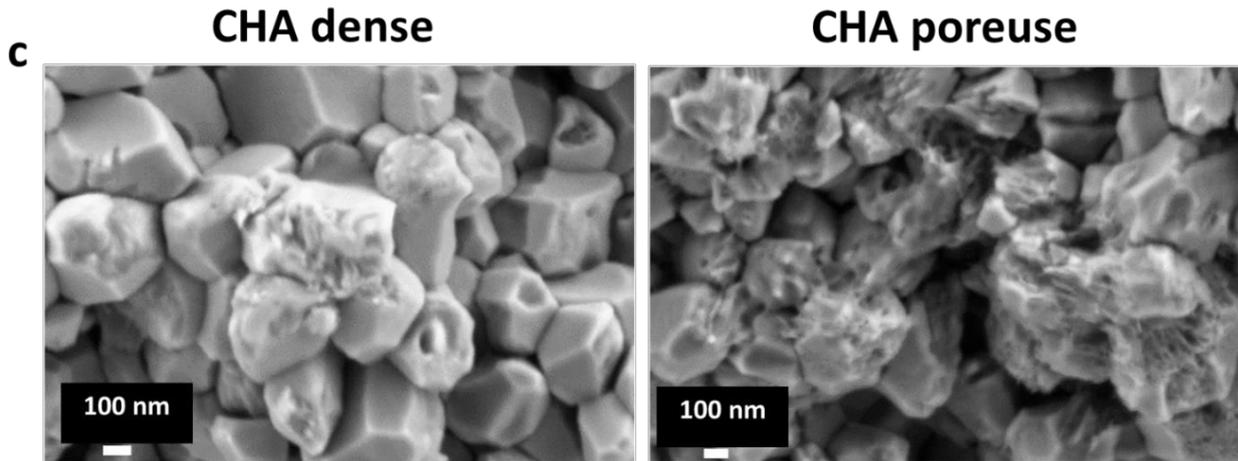


Figure 68 : images en MEB des lacunes de résorption sur la surface des pastilles après 14 jours de culture

IV.3.2.3.5. Mesure du calcium et du pH dans l'environnement

IV.3.2.3.5.1. Mesure du calcium

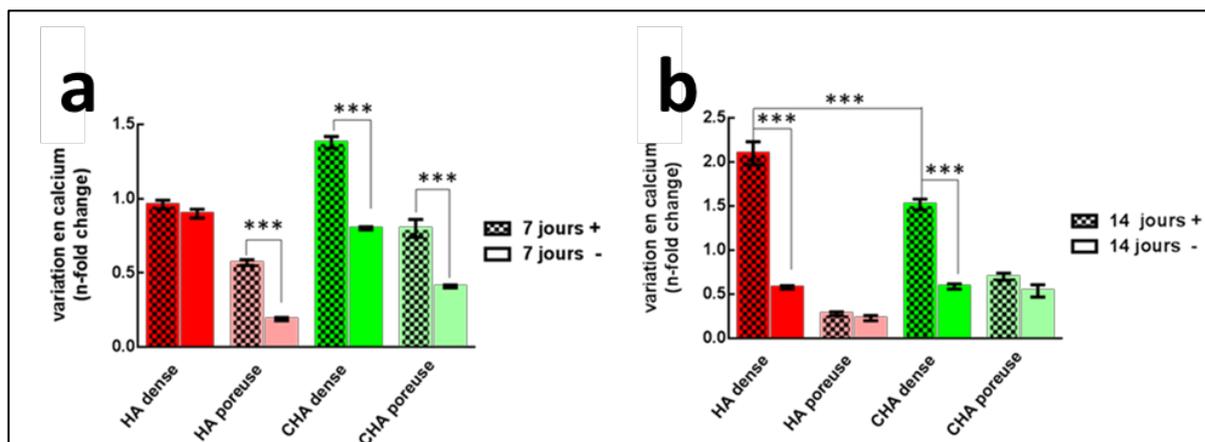


Figure 69 : variation de la concentration en calcium du milieu sur les biomatériaux, cultivés avec les cellules RAW 264.7, pendant 7 jours (7 jours +) et 14 jours (14 jours +), ou sur les biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours (7 jours -) et 14 jours (14 jours -).

La mesure a été normalisée par rapport à la valeur obtenue pour le contrôle, (la lame de verre). (Les valeurs n-fold change indiquées sur l'axe des ordonnées sont normalisées par rapport à la lame de verre). Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD.

A 7 jours, la concentration en calcium du milieu de culture sans cellule était significativement inférieure à celle contenant les cellules, pour CHA, quelle que soit la microstructure et pour HA poreuse. Par contre, les niveaux de calcium du milieu de culture avec et sans cellule étaient similaires pour HA dense (Figure 69 a). A 14 jours,

la concentration en calcium du milieu de culture pour HA dense avec cellules avait doublé, par rapport au contrôle, alors que celle du milieu de culture sans cellule, avait diminué. A 14 jours, en comparant les concentrations calciques des milieux de culture avec ou sans cellule, aucune différence significative de concentration calcique n'a été observée pour les matériaux HA et CHA, de microstructure poreuse. Par contre, pour les matériaux denses, quelle que soit la composition chimique, la concentration du milieu avec cellules était significativement supérieure, comparée à la concentration sans cellule, (Figure 69 b).

IV.3.2.3.5.2. Mesure du pH

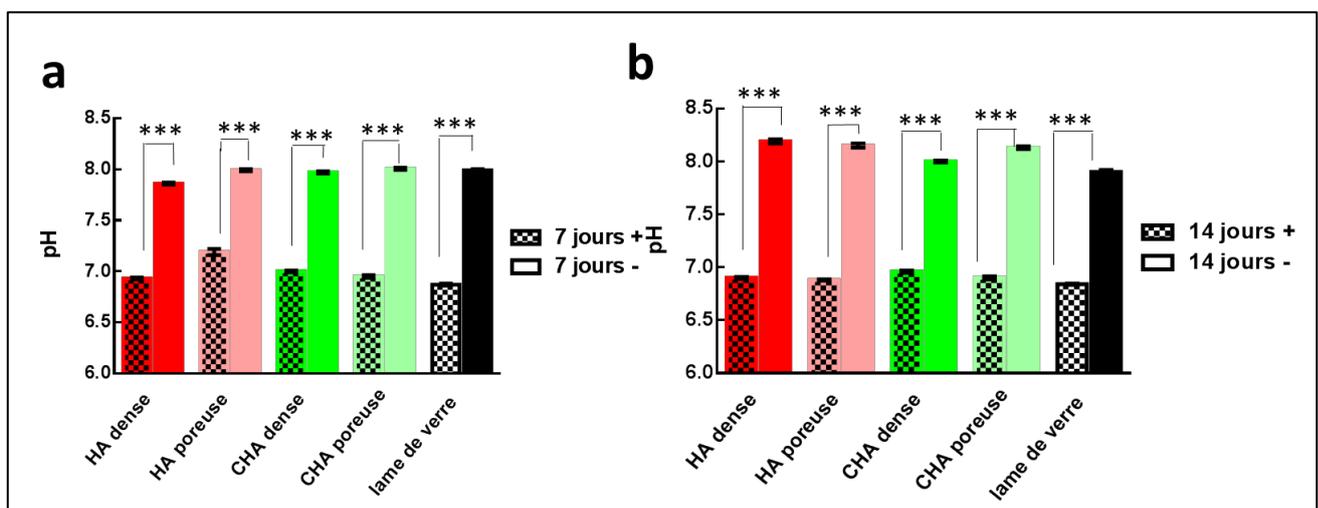


Figure 70 : mesure du pH du milieu de culture des biomatériaux cultivés avec les cellules, pendant 7 jours (7 jours +), ou pendant 14 jours (14 jours +), ou bien du milieu de culture des biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours (7 jours -), ou pendant 14 jours (14 jours -).

Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD.

A 14 jours, pour tous les biomatériaux, quelle que soit la composition chimique et la microstructure, une valeur de pH plus acide dans le milieu de culture contenant les cellules, comparée au milieu de culture n'en contenant pas, a été observée, (Figure 70 b). Le pH du milieu avec cellules, est allé en s'acidifiant au cours du temps, de 7 à 14 jours, pour les biomatériaux, quelle que soit la composition chimique. Il est passé de 8 à 7. En revanche, le pH s'est basifié au cours du temps, de 7 à 14 jours, pour les milieux de culture sans cellule.

IV.3.3. Discussions

IV.3.3.1 Réponse cellulaire ostéoblastique au contact des biomatériaux

La substitution en carbonate dans l'hydroxyapatite a favorisé l'augmentation de la densité cellulaire précocement, dès 1 h et 24 h de culture. A 48 h, la stabilisation de la densité cellulaire, sur tous les biomatériaux, pourrait être expliquée par le mécanisme d'inhibition de contact. La croissance cellulaire a été plus rapide sur CHA, quelle que soit la microstructure et s'est stabilisée par la suite, faute de surface libre. La densité cellulaire a augmenté plus tardivement sur HA, quelle que soit la microstructure et a rattrapé le taux de densité cellulaire observée sur les CHA. Lorsque les cellules commençaient à être confluentes, la croissance cellulaire a été stabilisée. A 48 h, la croissance cellulaire sur CHA poreuse, par rapport à CHA dense, a été ralentie. Les tests fonctionnels réalisés à 24 h, (prolifération et différenciation cellulaire), ont corroboré la tendance des résultats précédents sur la densité cellulaire. L'augmentation de la densité cellulaire sur CHA est indépendante de la microstructure des biomatériaux et reflète l'augmentation de la prolifération. Les résultats de l'activité enzymatique de l'ALP ont confirmé que des cellules qui prolifèrent ne se différencient pas, (Shi et al., 2015). Ces résultats permettent également d'expliquer qu'à 48 h, moins de cellules avaient été comptées sur CHA poreux contrairement à CHA dense. Les cellules se sont différenciées davantage sur CHA poreux, comparé à CHA dense, donc, il y a eu moins de prolifération cellulaire et donc diminution de la densité cellulaire.

Ces résultats suggèrent que les caractéristiques d'un biomatériau idéal pour favoriser l'activité fonctionnelle ostéoblastique pourraient combiner une substitution en carbonate à 4,4 % massique dans l'apatite et une microstructure poreuse. En effet, un taux de prolifération cellulaire significativement supérieur sur CHA, comparé aux biomatériaux HA, quelle que soit la microstructure, a été observé. Parallèlement, seul le biomatériau de microstructure poreuse CHA présentait une activité enzymatique de l'ALP avec des tendances supérieures comparées à tous les autres biomatériaux (Figure 60).

IV.3.3.2 Influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux sur la dissolution des biomatériaux

Dans la mesure où le calcium est un élément qui reprécipite sous forme d'apatite biologique à la surface des biomatériaux lors de la dissolution de ces derniers (Elliott, 1994), le calcium mesuré dans le milieu de culture ne reflète pas le niveau de calcium total libéré par la pastille. Comme mentionné précédemment, dans la partie sur l'étude des hydroxyapatites silicatées, (paragraphe 0), la concentration calcique en solution est égale à la concentration calcique libérée, soustraite de celle qui a précipité. En supposant que la dynamique de dissolution est identique pour tous les biomatériaux, les hypothèses suivantes pourraient être émises.

Les biomatériaux HA denses se seraient dissous les plus tardivement, puisque la variation en calcium dans le milieu de culture n'est apparue qu'à 24 h.

Les biomatériaux HA poreux ont commencé leur dissolution rapidement mais ont cessé de se dissoudre aussi rapidement, laissant suggérer une dissolution incomplète de ce biomatériau. Le calcium dans le milieu de culture a rapidement précipité en surface.

Les biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure, se seraient dissous aussi rapidement que HA poreux, mais contrairement à HA poreux, ils ont continué une dynamique de dissolution en continu. Cela s'est traduit par une augmentation du niveau de calcium dans le milieu de culture dès 1 h, puis une stabilisation de la concentration calcique à 24 h du fait d'un probable équilibre entre dissolution et précipitation. Cependant, l'influence bénéfique des cellules ostéoblastiques sur la dissolution de la pastille n'a été observée que pour le biomatériau CHA poreux.

La cinétique et le degré de dissolution des biomatériaux pourraient être classés de la sorte : CHA poreux \geq CHA dense > HA poreux > HA dense.

IV.3.3.3 Réponses cellulaires ostéoclastiques au contact des biomatériaux

IV.3.3.3.1. Adhésion et différenciation des précurseurs ostéoclastiques

Les marquages d'immunofluorescence ont montré que 14 jours dans du milieu différenciant, ne sont pas suffisants pour induire la différenciation de tous les

précurseurs ostéoclastiques. Toutes les cellules précurseuses des ostéoclastes n'avaient pas fusionné pour former des cellules ostéoclastiques multinucléées. La plus faible densité cellulaire retrouvée sur CHA poreuse ne peut pas être associée à une moins bonne capacité des cellules à adhérer à ce biomatériau. L'hypothèse d'un détachement des cellules sur ces biomatériaux après qu'elles aient fini leur activité de résorption pourrait être émise. C'est le cycle normal de vie des cellules ostéoclastiques (Boyle et al., 2003), (Lerner, 2000), (Cappariello et al., 2014). Ces cellules ont probablement résorbé le biomatériau plus rapidement et se sont donc détachées du biomatériau plus vite que sur les autres compositions. La surface résorbée de ce biomatériau pourrait en témoigner ([Figure 68](#)). Les ostéoclastes de 4 noyaux maximum pourraient être considérés comme de petits ostéoclastes, dans la mesure où il existe des ostéoclastes avec 10 noyaux, (Trebec et al., 2007). La substitution en carbonate et la microstructure dense semblent augmenter la différenciation des précurseurs, puisque le plus fort taux de cellules à 4 noyaux, a été retrouvé sur le biomatériau CHA dense. Toutefois, l'effet de la microstructure dense ou poreuse ne peut pas être déduit de ce résultat. En effet, le nombre total de cellules à 4 noyaux reste faible dans tous les cas (>5/1000) et comme indiqué précédemment, les cellules ostéoclastiques sur les biomatériaux CHA poreux se sont probablement détachées plus rapidement.

IV.3.3.3.2. Viabilité cellulaire et tests fonctionnels ([Figure 66](#), [Figure 67](#))

A 14 jours, le biomatériau poreux HA présentait des cellules moins actives métaboliquement, par rapport à tous les autres biomatériaux et en particulier, par rapport au biomatériau dense de même composition chimique, ([Figure 66](#)). Il peut en être déduit que la microstructure poreuse a été moins favorable à l'activation du métabolisme cellulaire. De ce fait, la substitution en ions carbonates aurait contrebalancé l'effet néfaste d'une microstructure poreuse, puisque le taux de viabilité sur les CHA poreuses était du même ordre que sur les autres biomatériaux : CHA dense et HA dense.

Une étude ancienne corrélée à des études plus récentes sur le fonctionnement de TRAP 5b, de la LDH et de l'activité de résorption a montré qu'il pourrait y avoir un lien entre l'activité enzymatique de la LDH et de TRAP 5b, (Coleman et al., 1976), (Halleen et al., 2000), (Halleen et al., 1996). L'étude histochimique de Coleman a montré par une réaction de capture de ferrocyanure de cuivre, la présence de l'activité

enzymatique de la LDH exprimée dans les vésicules et les vacuoles cytoplasmiques ainsi que dans la membrane cytoplasmique des ostéoclastes fixés. Par contre, cette activité de la LDH était principalement présente dans les mitochondries des ostéoclastes non fixés donc actifs. Les molécules de LDH étaient concentrées principalement au niveau de la zone de la bordure en brosse où des débris d'os ont également été retrouvés. Coleman a donc émis l'hypothèse que la LDH participe à l'activité de résorption des ostéoclastes et que les mitochondries des ostéoclastes utilisent la lactate, produite suite à l'activité enzymatique de la LDH, pour fabriquer l'énergie nécessaire.

En parallèle, l'étude de Halleen a montré que TRAP 5b est produite par les ostéoclastes qui endocytent les produits de dégradation de la matrice osseuse, après la sécrétion d'acides et de protéases lysosomales dans l'intervalle entre la membrane cellulaire et la matrice osseuse. Dans la cellule, les vésicules transcytotiques contenant les produits de la matrice osseuse dégénérée vont fusionner avec des vésicules contenant TRAP. Les produits de dégradation sont ensuite détruits par les dérivés réactifs de l'oxygène (*ROS : reactive oxygen species*, qui sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres par exemple), produits par TRAP, (Halleen et al., 1996). Les produits de dégradation et des molécules TRAP sont ensuite sécrétés à travers la membrane basolatérale. Ainsi, il existe une corrélation entre la quantité de TRAP en circulation et la quantité d'os résorbé, ce qui reflète le taux de résorption osseuse (Halleen et al., 2000).

En revanche, les travaux scientifiques de Moonga ont montré que l'activité de TRAP 5b est modulée par la concentration calcique – l'ajout de concentration croissante en calcium dans l'environnement a diminué l'activité de TRAP 5b des ostéoclastes cultivés sur des lamelles osseuses –, (Moonga et al., 1990). Moonga a appelé ce mécanisme : mécanisme d'auto-régulation. Cela permettrait l'équilibre entre dégradation et résorption pour le maintien de l'intégrité du mécanisme de résorption osseuse.

Des travaux réalisés avec des ostéoclastes cultivés sur du β -TCP, un matériaux très soluble (Signs et al., 1979) ont montré que l'activité des ostéoclastes est diminuée à cause du fort taux de calcium relargué par ces biomatériaux. De plus petites lacunes de résorption ont été observées sur les β TCP, comparées à l'HA, (Detsch et al., 2008).

De plus petites lacunes ont également été observées sur le matériaux β TCP pure, comparées au matériau BCP (HA25/TCP75), (Yamada et al., 1997).

3 grandes tendances ont pu être observées, en analysant l'ensemble de ces 3 paramètres :

- 1 le profil de résorption des biomatériaux,
- 2 l'activité enzymatique de la LDH,
- 3 l'activité enzymatique de TRAP 5b.

Les biomatériaux CHA, indépendamment de la microstructure, présentent une activité enzymatique de TRAP 5b qui aurait été rétro-régulée par l'importante quantité en calcium relarguée par ces biomatériaux du fait d'une action couplée de la biorésorption par les ostéoclastes mais également d'une dissolution accentuée par la présence de carbonate dans la structure de l'apatite, (Barralet et al., 2000). En effet, le profil de résorption des CHA denses ou poreuses, montre des lacunes de résorption près de 10 fois plus grosses, comparées aux lacunes sur HA, quelle que soit la microstructure, (Figure 68). De plus, l'activité de la LDH sur ces biomatériaux est similaire à celle du contrôle interne : la lame de verre, (activité supérieure à 1), (Figure 66). L'activité de TRAP 5b est donc régulée à posteriori par le mécanisme d'auto-régulation décrit par Moonga, mais, la production d'énergie par l'activité de la LDH, est bien fonctionnelle et disponible pour initier la résorption. HA poreuses et HA denses présentent un comportement différent. L'effet moins avantageux de la microstructure poreuse pourrait à ce stade être émis. La faible activité enzymatique de TRAP 5b retrouvée pour HA poreux pourrait être corrélée à moins de différenciation cellulaire donc moins d'activité ostéoclastique. En effet, significativement plus de prolifération a été observée sur HA poreux, comparée à HA dense. De plus, la faible activité enzymatique de la LDH, retrouvée sur HA poreuse, comparée à HA dense, prouve que moins d'énergie a été produite par les cellules cultivées sur HA poreuse, pour la biorésorption. Par contre, en analysant le profil de résorption des HA denses et poreuses, on remarque un profil de résorption similaire. Pourtant, l'activité de TRAP 5b et de la LDH sont significativement plus élevée sur HA dense, comparée à HA poreuse. Davantage de cellules sur HA dense se sont différenciées et ont produit de l'énergie pour la résorption, mais, n'arrivent pas à résorber le matériau HA, autant que le matériau CHA. La microstructure dense a certainement influencé la différenciation et l'activation des cellules grâce à une concentration en calcium moins élevée absorbée par les cellules

sur un matériau dense, comparé à un matériau poreux. Néanmoins, un autre élément semble plus important pour stimuler l'activité de résorption par les ostéoclastes. La présence d'ions carbonates agit comme des récepteurs sur les cellules pour accroître l'activité de résorption. Dans leur publication Moonga et Kirstein ont cultivé les ostéoclastes sur du plastique et sur de l'os. Kirstein est allée jusqu'à traiter le plastique avec de la vitronectine. Le plastique n'a pas été résorbé. Kirstein a émis la conclusion que l'induction de l'activité de résorption des ostéoclastes dépend de la stimulation par la matrice osseuse, des « récepteurs minéraux » exprimés par les ostéoclastes, (Kirstein et al., 2006).

Dans cette étude, il a été montré que le calcium régule de façon dose dépendante la différenciation et l'activité métabolique des ostéoclastes en favorisant la production d'énergie par la production de lactate via l'activation de l'enzyme LDH. Par contre, les carbonates, sont apparus comme des signaux activateurs de supposés « récepteurs minéraux » à la surface des ostéoclastes, nécessaires pour initier la résorption.

IV.3.3.3.3. Dissolution physico-chimique, biorésorption et mesure du calcium et du pH du milieu de culture (Figure 68, 69 et 70).

L'état de surface des pastilles et le profil des lacunes de résorption après retrait des cellules, laissent supposer qu'il y a eu une synergie du phénomène de dissolution physico-chimique et de biorésorption plus importante sur les pastilles de CHA, quelle que soit la microstructure. Comme déjà mentionné, le niveau de calcium mesuré dans le milieu de culture ne permet pas de connaître le taux de calcium libéré par la pastille car du calcium reprécipite en surface, (Elliott, 1994). Cela permet d'expliquer qu'il y a eu diminution du niveau de calcium dans le milieu de culture de 7 à 14 jours. Par contre, le fait qu'il y ait eu plus de calcium dans le milieu de culture avec les cellules, comparé au milieu sans cellule, est la preuve qu'il y a eu biorésorption par les ostéoclastes des biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure du biomatériau. Ce n'est qu'à 14 jours qu'il y a eu augmentation du calcium du milieu de culture avec les cellules, pour HA dense, comparé au milieu sans cellule. L'hypothèse d'une biorésorption plus tardive de HA dense par rapport à tous les autres biomatériaux peut donc être émise. L'acidification du pH du milieu de culture en présence des cellules est une autre preuve de l'activité de résorption des cellules sur tous les biomatériaux. En effet, les cellules ostéoclastiques résorbent la partie minérale

osseuse en fabriquant un environnement acide, (Rousselle and Heymann, 2002), (Väänänen et al., 1998), (Cappariello et al., 2014).

IV.3.4. Conclusions de l'étude

Les biomatériaux pour la médecine régénérative osseuse doivent dans un premier temps servir de support pour guider la formation et la croissance osseuse mais doivent également à terme complètement disparaître pour laisser place au nouveau tissu formé.

La figure 71, ([Figure 71](#)), résume les différentes réponses évaluées sur les quatre matériaux HA et CHA, denses et poreux. En considérant l'ensemble des réponses biologiques, des ostéoblastes et des ostéoclastes, le biomatériau poreux CHA, semble davantage répondre aux exigences de la médecine régénérative, suivi du biomatériau dense CHA. L'HA stéchiométrique conformément aux résultats connus, n'apparaît pas totalement biodégradable. Sa dissolution est limitée (produit de solubilité $K_s \approx 10^{-121}$), (Elliott, 1994), et, comme montré ici, sa résorption ostéoclastique est faible.

La combinaison entre la substitution en carbonate à 4,4 % massique et la microstructure à 25 % de porosité ouverte, pourrait promouvoir la régénération osseuse. Ce biomatériau possède une composition chimique proche de la phase minérale osseuse et n'est pas plus compliqué à obtenir que de l'HA, du β TCP, ou du BCP. Par un procédé de précipitation aqueuse, il est possible d'obtenir ce matériau. La consolidation se réalise à faible température, sous flux de CO_2 .

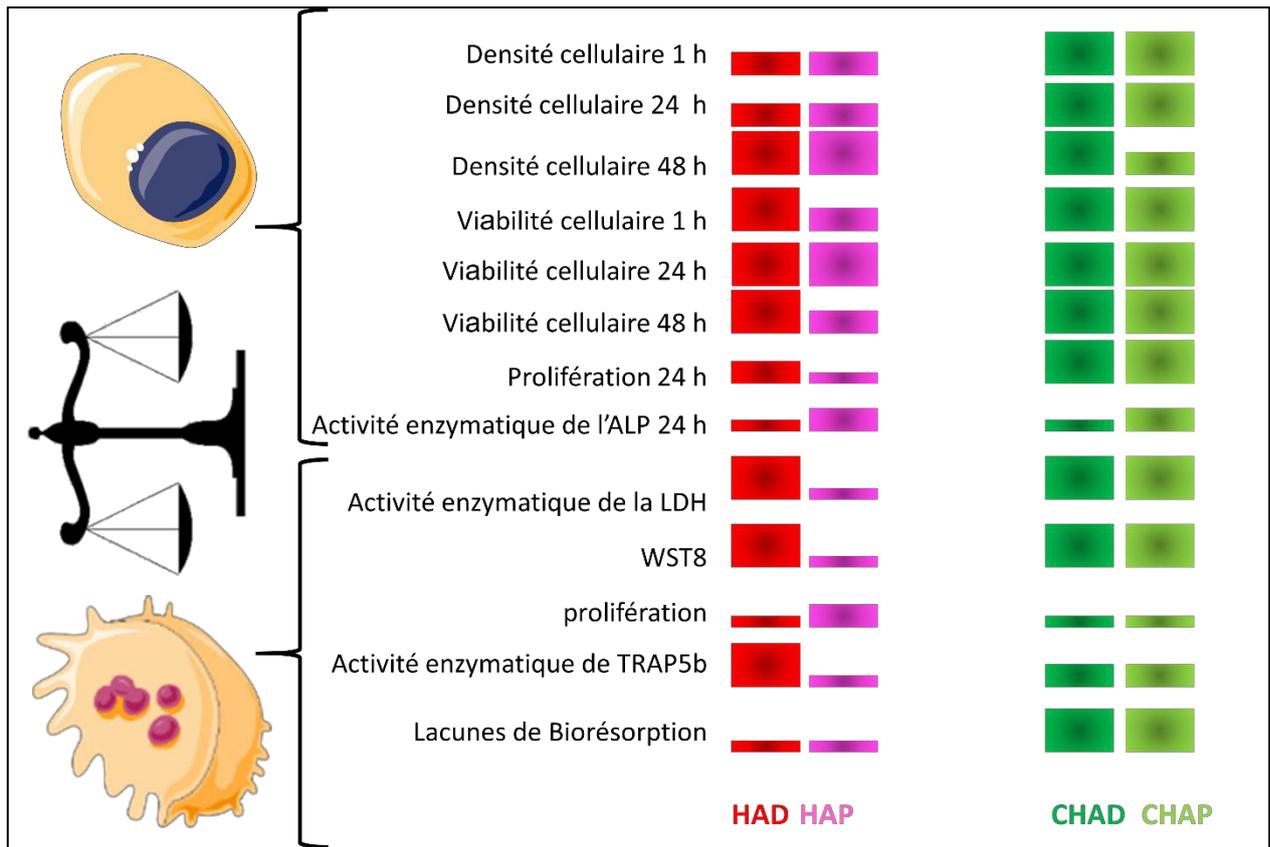


Figure 71 : schéma récapitulatif de la réponse ostéoblastique et ostéoclastique aux biomatériaux. La représentation est arbitraire : il n'y a pas d'échelle. Le code de représentation est le suivant : plus la hauteur de la barre est importante, plus la réponse biologique mesurée était importante et inversement.

IV.4. Influence des propriétés physico-chimiques des biocéramiques de phosphate de calcium sur l'activité de biorésorption des cellules RAW 264.7 : corrélation avec l'expression du VEGF-A

IV.4.1. Contexte de l'étude

En se servant comme substrat de six céramiques de phosphate de calcium, de différentes compositions chimiques et microstructures, cette partie des travaux a consisté à évaluer le comportement des cellules précurseurs des ostéoclastes, en réponse aux différentes compositions chimiques et microstructures des biomatériaux. En estimant la qualité de la biorésorption des biomatériaux, l'objectif était de savoir si l'activité cellulaire de résorption observée, se répercuterait sur un génotype cellulaire en particulier et plus spécifiquement sur l'expression de VEGF-A par les cellules.

En préambule, les fonctions des protéines VEGF-A et TRAP 5b, identifiées et décrites dans la littérature scientifique, sont résumées ci-dessous.

IV.4.2. Contexte bibliographique

IV.4.2.1 Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

IV.4.2.1.1. Fonction et mécanisme d'action du VEGF

Les facteurs de croissance de la famille VEGF, jouent un rôle majeur dans la prolifération, la migration et l'activation des cellules endothéliales. Leur fonction sur ces différents mécanismes contribue au contrôle de l'angiogenèse et du développement vasculaire. La famille des VEGFs comprend 6 membres : Le VEGF-A (VEGF), (Senger et al., 1983), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, VEGF-E et PIGF (*placental growth factor* ; facteur de croissance placentaire). Une désignation alternative pour VEGF- A est VPF (*vascular permeability factor* ; facteur vasculaire de perméabilité), (Koch et al., 2011). Cependant, le VEGF n'agit pas uniquement sur les mécanismes angiogéniques, mais, il jouerait également un rôle important dans la régulation du remodelage osseux, en attirant les cellules endothéliales et les

ostéoclastes et en stimulant la différenciation des ostéoblastes, (Detsch and Boccaccini, 2014), (Hu and Olsen, 2016), (Huang et al., 2016). Dans le métabolisme osseux, les principaux facteurs actifs sont VEGF-A et VEGF-C.

Rôle du VEGF-C dans le métabolisme osseux

Chez les ostéoclastes, le facteur de croissance VEGF-C est connu pour augmenter leur activité de résorption. Son expression dans les ostéoclastes dépend de RANK-L et de l'activation via NF- κ B. VEGF-C stimule l'activité de résorption des ostéoclastes en se fixant à des récepteurs VEGFR-3 présents à leur surface, (Zhang et al., 2008). Les cellules ostéoprogénitrices sécrètent aussi du VEGF-C lorsqu'elles sont traitées par la PTH, (Drake et al., 2011).

La fonction biologique du VEGF est dictée principalement par l'expression de ses récepteurs sur les cellules dans différents tissus. Il existe deux types de récepteurs connus du VEGF. Le récepteur à tyrosine kinase Flt-1 ou (VEGFR-1) et KDR ou (VEGFR-2). La neuropiline-1 contenant un domaine (NRP-1) est un co-récepteur, isoforme spécifique de VEGFR-2, qui améliore l'activité biologique des VEGF en augmentant l'affinité de liaison de la molécule au récepteur VEGFR-2 (Koch et al., 2011).

VEGF-A et métabolisme osseux

Le VEGF-A est impliqué dans différents mécanismes au cours de la réparation osseuse (inflammation, ossification de l'os endochondral, couplage entre angiogenèse et ostéogenèse) et de la régénération osseuse.

Il intervient dans le processus de remodelage osseux et de réparation osseuse à plusieurs niveaux :

- par le recrutement des macrophages et la formation d'angiogenèse durant la phase inflammatoire,
- par la stimulation et la maturation des ostéoblastes et la formation de la minéralisation, via son couplage au ligand VEGFR2, (Gerber et al., 1999).

VEGF-A joue un rôle dans le remodelage osseux en agissant principalement sur les cellules formatrices d'os : les ostéoblastes. L'étude de Duan a montré par des expériences *in vivo* chez la souris, qu'inhiber la sécrétion de VEGF-A par les cellules ostéoblastiques, revient à inhiber le recrutement des vaisseaux sanguins dans le péri-chondre et la différenciation des précurseurs des ostéoblastes, (Duan et al., 2015).

VEGF-A joue donc un rôle dans la régulation de la vascularisation périchondrale et la différenciation des ostéoblastes au premier stade de développement des os, (Duan et al., 2015). Son action sur les ostéoblastes dépend du récepteur VEGFR2. En effet, l'interaction VEGFA/VEGFR2 active l'expression et l'activité du facteur de transcription Indian hedgehog, augmente l'expression de β -caténine et inhibe Notch2.

- en stimulant la formation d'ostéoclastes dans la phase finale du remodelage du processus de réparation osseuse, (Hu and Olsen, 2016).

Le VEGF-A stimule la formation d'ostéoclastes dans la phase finale du remodelage du processus de réparation osseuse, (Hu and Olsen, 2016), comme le démontre une étude *in vitro*, réalisée sur les cellules MC3T3-E1 et RAW 264.7 transfectées avec du VEGF-A. L'étude de Kim a confirmé que l'ostéoclastogenèse est médiée par une voie d'activation incluant RANK-L, la PKC et Scr, (Kim et al., 2015). La sécrétion de RANK-L par les ostéoblastes et sa fixation sur son récepteur RANK exprimé par les pré-ostéoclastes est à l'origine de l'activation de leur différenciation. Au contraire, l'ostéoprotégérine (OPG), en tant qu'analogue de RANK-L joue le rôle d'antagoniste empêchant la liaison de RANK-L à RANK et inhibant la différenciation, (Lerner, 2000).

IV.4.2.2 TRAP 5b

L'enzyme TRAP exprimée par les ostéoclastes, jouerait un rôle dans l'activité de résorption. Le blocage de l'activité TRAP 5b par un anticorps anti-uterroferrine, inhibe l'activité de résorption par les ostéoclastes, (Moonga et al., 1990). Néanmoins, TRAP a également été retrouvée dans plusieurs autres tissus : la peau, le tissu épithélial de la langue, l'oropharynx, l'appareil gastro-intestinal y compris le côlon, ainsi que le thymus, le squelette et les papilles dentaires. La protéine TRAP a été identifiée aux mêmes endroits, mais le niveau d'expression dans les différents tissus, n'était pas toujours en corrélation avec l'activité enzymatique apparente. Ces résultats indiquent que l'expression de TRAP n'est pas cantonnée aux ostéoclastes dans l'os, mais se produit dans divers tissus hébergeant des cellules d'origine osseuse ou des cellules dendritiques et d'autres cellules appartenant à la lignée macrophagique, (Hayman et al., 2000), (Hayman and Cox, 2003), (Hayman et al., 2001).

Les raisons du manque de spécificité de cette protéine pour le tissu osseux ont été découvertes par Halleen et Janckila. En fait, il existe deux isoformes de l'enzyme : TRAP 5b et TRAP5a. De façon générale, les tests de détection prendraient en compte

les deux isoformes de TRAP5 : TRAP 5b, d'origine osseuse, mais également, TRAP 5a, d'origine non osseuse. Ces tests ont ainsi permis de mettre au point des protocoles pour améliorer de façon spécifique la détection de TRAP 5b. Ils ont prouvé que des mesures de l'activité de TRAP à pH 6,1 améliorent la spécificité du dosage immunologique pour l'isoforme 5b (Halleen et al., 1996), (Halleen et al., 2000), (Janckila et al., 2001).

TRAP 5b est produite par les ostéoclastes qui endocytent les produits de dégradation de la matrice osseuse après la sécrétion d'acides et de protéases lysosomales dans l'intervalle entre la membrane cellulaire et la matrice osseuse. Dans la cellule, les vésicules transcytotiques contenant les produits de la matrice osseuse dégenérée vont fusionner avec des vésicules contenant TRAP. Les produits de dégradation sont ensuite détruits par les ROS produites par TRAP, (Halleen et al., 1996). Ensuite, les produits de dégradation et des molécules TRAP sont sécrétés à travers la membrane basolatérale. Ainsi, il existe une corrélation entre la quantité de TRAP en circulation et la quantité d'os résorbé, ce qui reflète le taux de résorption osseuse (Halleen et al., 2000).

IV.4.3. Objectif de l'étude

Bien que les ostéoclastes matures puissent être isolés directement à partir d'os, (Osdoby et al., 1982),(Zallone et al.), le faible taux de pureté et le niveau de vie courte de ces cellules, font d'eux un modèle moins adapté à l'étude menée dans ce contexte. C'est pourquoi, la lignée RAW 264.7, a été utilisée. Ces cellules précurseurs des ostéoclastes ont été cultivées sur les 6 variantes de céramiques de phosphate de calcium dans un milieu inducteur de la différenciation : milieu de culture complet dans lequel sont ajoutés les facteurs de différenciation M-CSF et RANK-L, (Chapitre III page 133).

Plusieurs paramètres cellulaires ont été analysés après une période de 14 jours : morphologie, densité cellulaire, viabilité cellulaire, formation de cellules multinucléées. Parallèlement, le taux de résorption mesuré par l'activité enzymatique de TRAP 5b et de la LDH, ainsi que la sécrétion de VEGF-A par les cellules ont également été analysés. L'activité de résorption des cellules a été analysée en observant le profil des lacunes de résorption. La quantité de calcium dans le milieu ainsi que le pH du milieu de culture environnant ont également été mesurés.

IV.4.4. Résultats

La lignée de monocytes/macrophages, précurseurs ostéoclastiques, RAW 264.7, a été cultivée pendant 14 jours sur les 6 variantes de biomatériaux, (HA, dense et poreuse, SiHA, dense et poreuse et CHA, dense et poreuse), ainsi que sur la lame de verre, qui a servi de contrôle interne, pour visualiser l'état de différenciation des cellules dans le milieu de culture différenciant, (paragraphe III.2.1.2).

IV.4.4.1 Culture cellulaire dans le milieu différenciant : contrôle interne de la lame de verre

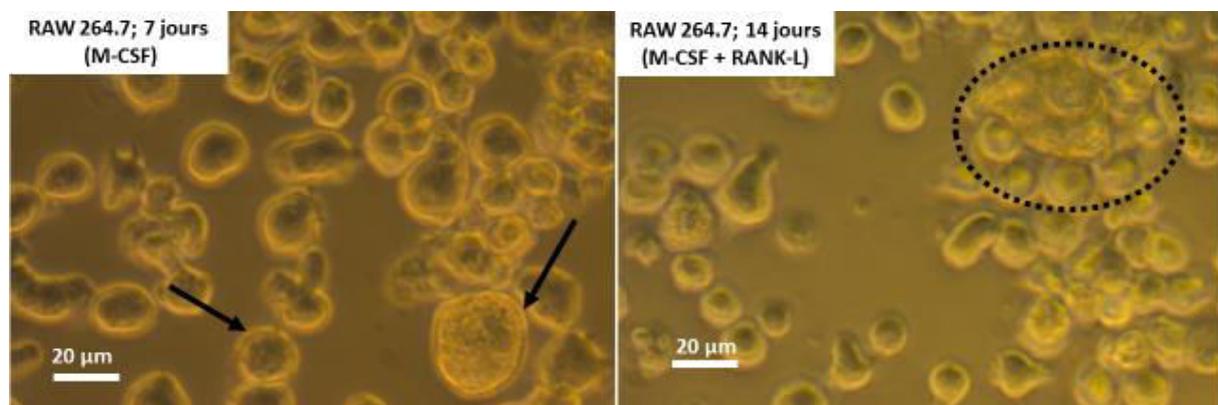


Figure 72 : images en contraste de phase des cellules RAW 264.7 cultivées sur lame de verre dans le milieu différenciant après 7 jours et 14 jours de culture

Les flèches noires représentent des cellules mononucléées, (monocytes pour la plus petite et macrophage pour la plus grosse). Après 14 jours, dans le milieu de culture, les pointillés montrent des fusions de cellules qui donneront une cellule ostéoclastique multinucléée

Après 7 jours de culture dans le milieu différenciant, un mélange de cellules de tailles hétérogènes a été observé sur la lame de verre, (le contrôle interne). Les cellules de grosses tailles sont des macrophages, des pré-ostéoclastes ou des cellules multinucléées : les ostéoclastes. Les cellules de plus petites tailles sont des monocytes. A 14 jours, un amas de cellules ayant fusionné pour former une cellule multinucléée a pu être visualisée (cercle en pointillé noir) (Figure 72). Ce contrôle a permis de valider l'efficacité du milieu de différenciation et le commencement de la différenciation des cellules à partir de 14 jours. Pour valider ces premières observations visuelles, plusieurs approches différentes ont été utilisées : immunofluorescence, coloration de TRAP et imagerie en MEB après dessiccation par contournement du point critique du CO₂.

IV.4.4.2 Marquage de TRAP

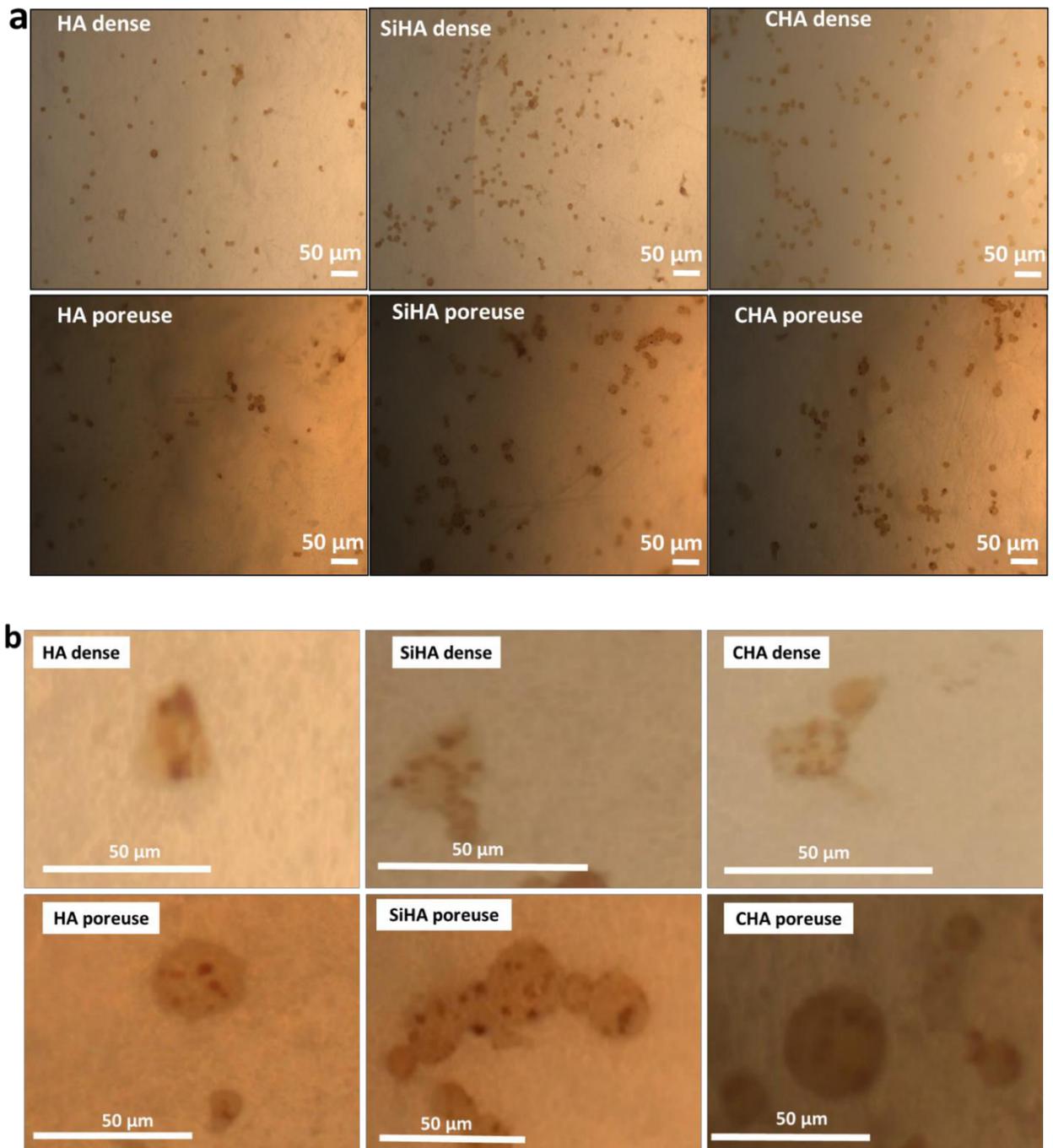


Figure 73 : images en microscopie optique des cellules RAW 264.7, cultivées sur les biomatériaux et préalablement marquées pour TRAP.

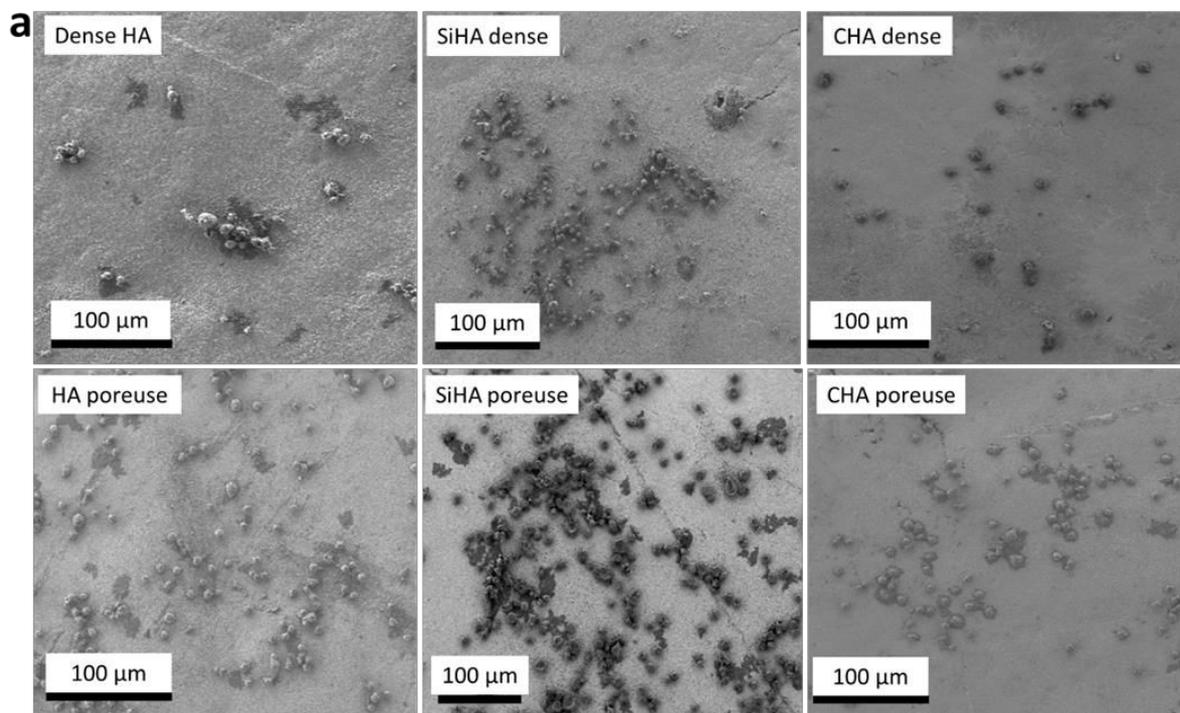
a) faible grossissement montrant la colonisation par les cellules de tous les biomatériaux.

b) fort grossissement révélant des cellules TRAP positives.

La coloration de TRAP a confirmé la présence de cellules ostéoclastiques sur tous les biomatériaux. La densité des cellules aux biomatériaux s'est faite de façon homogène sur toute la surface des pastilles (Figure 73).

IV.4.4.3 MEB

Les images en MEB permettent de visualiser certaines caractéristiques spécifiques des ostéoclastes pour confirmer l'induction de la différenciation après 14 jours de culture dans le milieu différenciant.



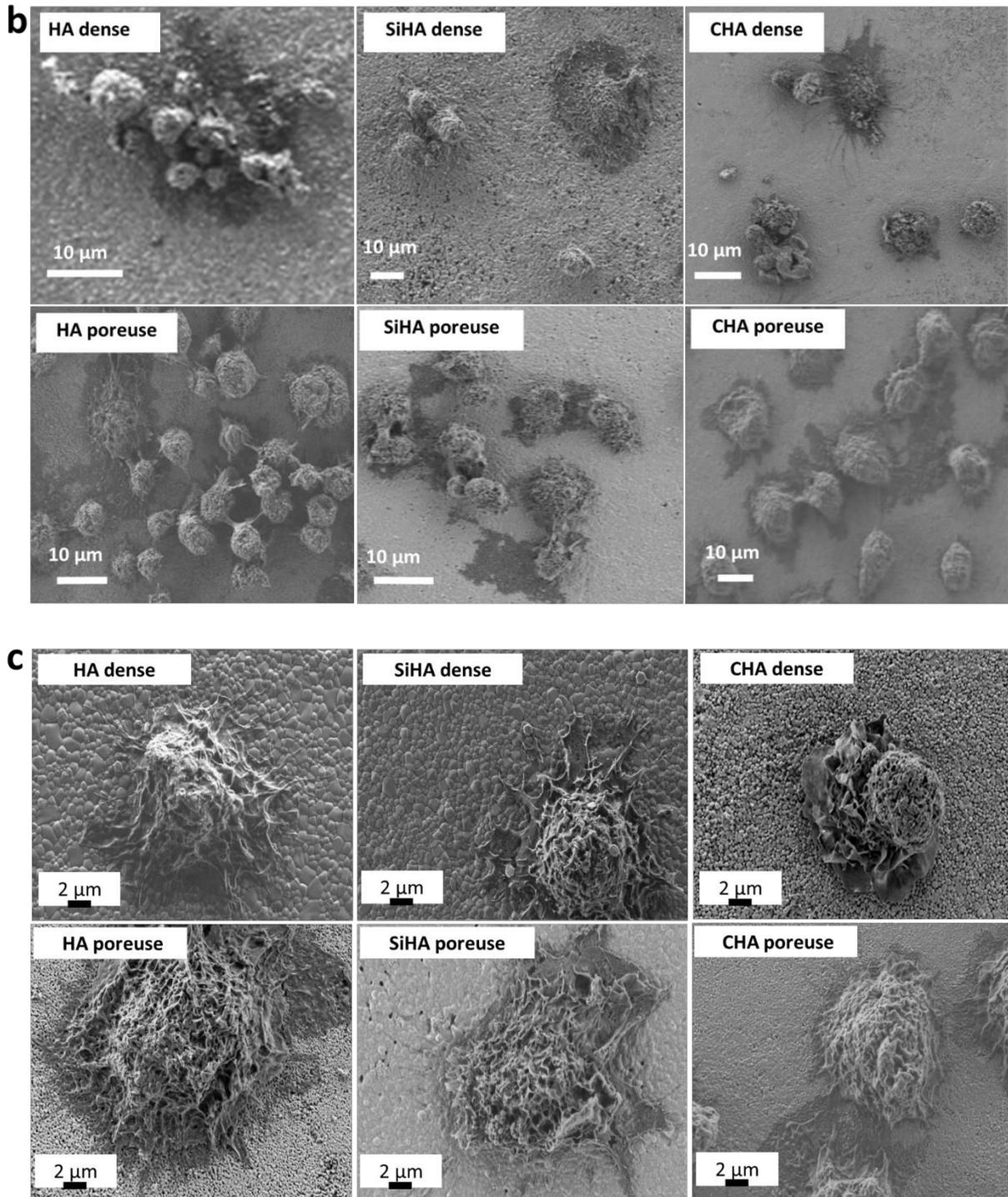


Figure 74 : images MEB des cellules RAW 264.7, cultivées sur les six biomatériaux, en présence milieu différenciant, (RANK-L et M-CSF).

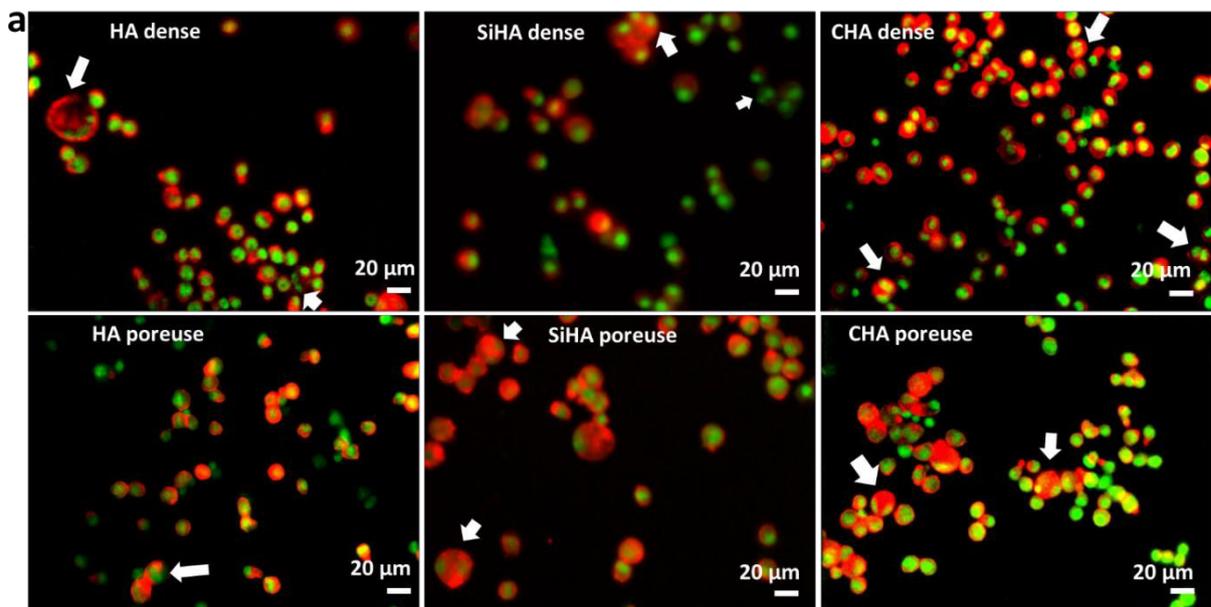
a) faible grossissement montrant la colonisation par les cellules RAW 264.7, de tous les biomatériaux. b) fort grossissement montrant un mélange de cellules ostéoclastiques, de monocytes et de macrophages sur tous les biomatériaux. A ce grossissement, cette technique ne permet pas de discriminer les cellules monocytes des macrophages. Les gros grossissements ont permis de visualiser certaines caractéristiques typiques des ostéoclastes c) grossissement sur une cellule ostéoclastique ciblée sur chaque biomatériau

Comme expliqué précédemment, un dôme polarisé (une sorte de rugosité apparaissant au pôle apical), une zone de scellement entre la cellule et le biomatériau et un contour cellulaire en forme de bordure en brosse ont pu être visualisés, témoignant de la différenciation des cellules en ostéoclaste) ([Figure 10](#)). A 14 jours, des ostéoclastes ont pu être observés sur tous les biomatériaux ([Figure 74 c](#)).

IV.4.4.4 Immunofluorescence

Les images d'immunofluorescence ont permis de compléter les informations obtenues à partir des images MEB, car elles ont donné des informations sur la formation d'anneaux d'actine, ainsi que sur le nombre de noyaux contenus dans les cellules.

Un mélange de cellules non différenciées et de cellules différenciées, a été observé. Des cellules multinucléées, (2 à 4 noyaux), présentant un anneau d'actine en périphérie, ont été observées. De plus, les images d'immunofluorescence ont montré qu'il n'existe pas de relation de proportionnalité entre le nombre de noyaux dans une cellule et la dimension de la cellule. En effet, des cellules à deux noyaux peuvent être aussi volumineuses, que des cellules à 4 noyaux, ([Figure 75 b](#)).



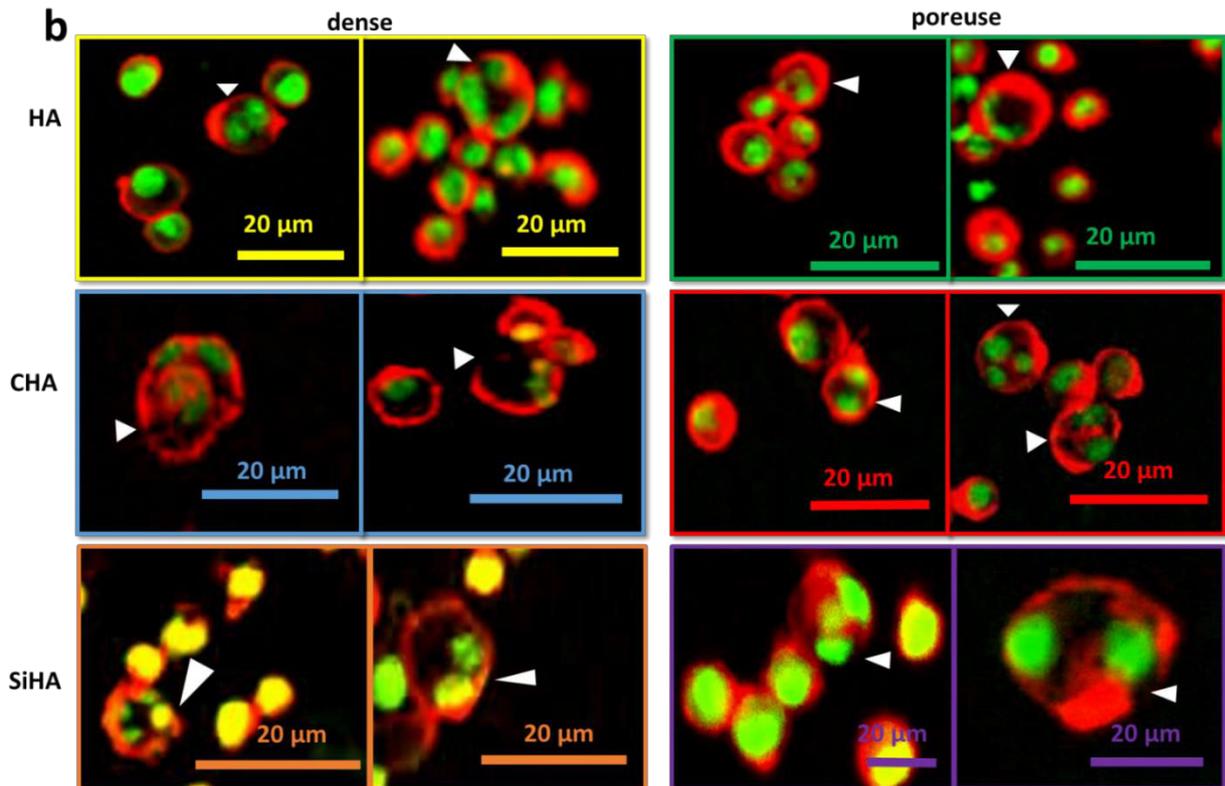


Figure 75 : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7, cultivées sur les pastilles, après 14 jours de culture, dans le milieu de culture différenciant, (RANK-L et M-CSF). En rouge : l'actine ; en vert : les noyaux. a) faible grossissement, montrant la colonisation par les cellules RAW 264.7 de tous les biomatériaux. b) fort grossissement, montrant des ostéoclastes ayant adhéré sur les différents biomatériaux, pointés par la flèche blanche.

IV.4.4.5 Mesure du calcium et du pH du milieu de culture

L'analyse comparative de la quantité de calcium dans le milieu de culture, avec ou sans cellule, montre que lorsque les pastilles étaient en présence de cellules, la concentration du calcium dans le milieu de culture augmentait significativement, (Figure 76). Cette concentration était supérieure à celle observée pour la lame de verre. Cette concentration avec ou sans cellule n'a pas varié pour la condition qui correspond aux cellules cultivées sur HA dense (la concentration en calcium avec ou sans cellule n'était pas significative). A 7 jours, la pastille CHA dense cultivée avec les cellules, a libéré plus de calcium que tous les autres biomatériaux.

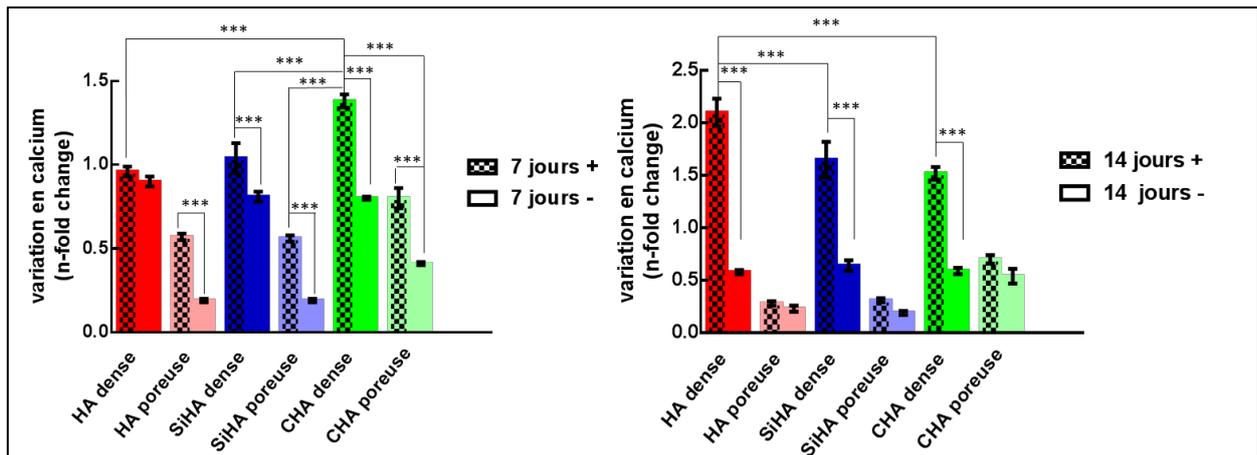


Figure 76 : mesure des concentrations en calcium dans le milieu de culture après 7 jours et 14 jours, avec les pastilles uniquement (7 jours -) et (14 jours -), ou avec les cellules cultivées sur les pastilles (7 jours +) et (14 jours +).

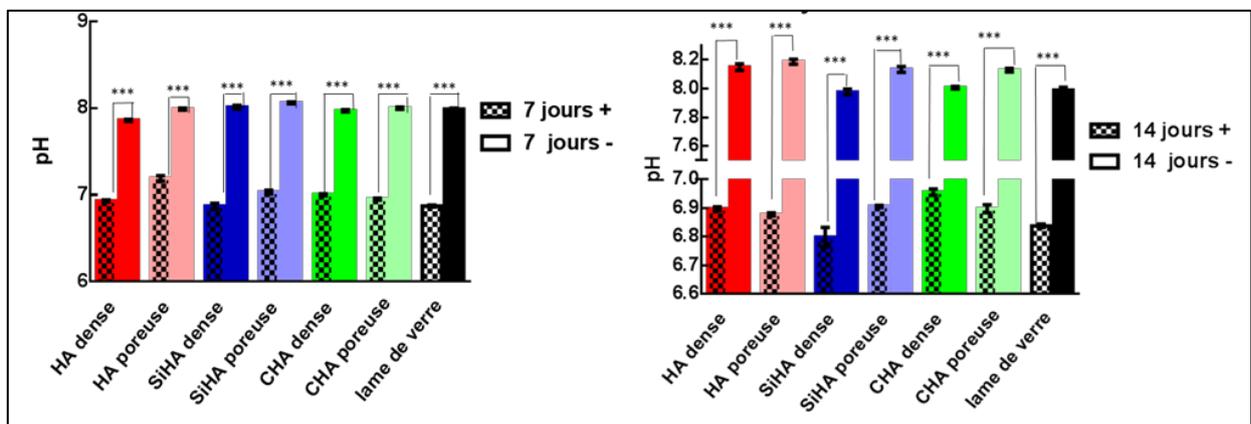


Figure 77 : mesure du pH de ces milieux de culture. Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD.

De manière générale, le calcium relargué a augmenté entre 7 et 14 jours lorsque les biomatériaux étaient cultivés en présence de cellules (Figure 76). A 14 jours, le niveau de calcium était significativement plus élevé pour HA dense avec cellules, en comparaison aux autres biomatériaux. Le phénomène inverse a été observé pour les pastilles poreuses, quelle que soit la composition chimique. La différence de concentration calcique du milieu pour une pastille poreuse, quelle que soit la composition chimique, avec et sans cellule, n'était pas significative (Figure 76).

Le pH a diminué en présence de cellules comme attendu. Il a en outre diminué au cours du temps, de 7 à 14 jours, en particulier pour les pastilles poreuses (Figure 77). A 14 jours, c'est le surnageant de culture des pastilles SiHA denses en présence de cellules qui était le plus acide, en comparaison des autres valeurs de pH, alors que

celui des pastilles CHA denses, en présence des cellules, était le plus basique. Dans les autres conditions, les variations du pH ne sont pas significatives.

IV.4.4.6 viabilité des cellules RAW 264.7

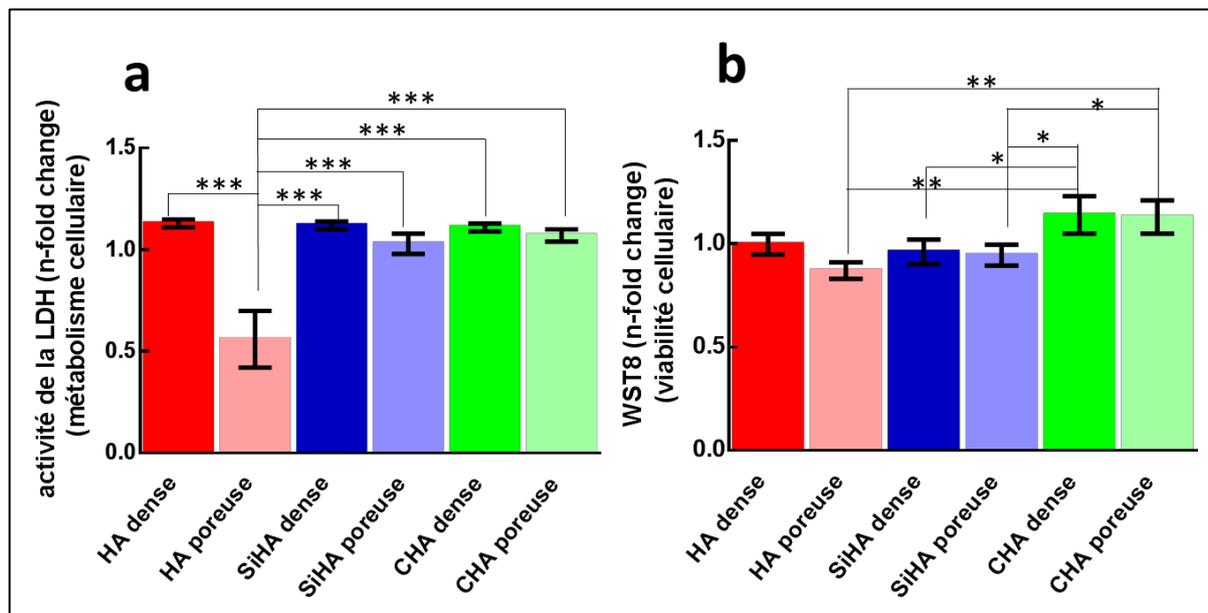


Figure 78 : viabilité cellulaire

a) activité de la lactate déshydrogénase (LDH). L'absorbance est mesurée à (490-690 nm). 6 mesures sont réalisées par condition. Les résultats obtenus sont normalisés par ceux de la lame de verre. (La légende sur l'axe des ordonnées exprimée en *n-fold change* correspond aux résultats normalisés par rapport à la lame de verre). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. b) viabilité cellulaire mesurée par la réaction colorimétrique de la réduction de la molécule WST-8 par les NADH. L'absorbance est mesurée à 450 nm. Les résultats sont normalisés par ceux obtenus pour la lame de verre (la légende sur l'axe des ordonnées exprimée en *n-fold change* correspond aux résultats normalisés par rapport à la lame de verre). Le résultat est la moyenne de 18 mesures \pm SD.

Deux tests de viabilité ont été réalisés : le test WST-8 et le test LDH. WST-8 est un test analogue plus sensible et plus pratique que le test MTT, très couramment utilisé et qui reflète la viabilité cellulaire, en estimant la cytotoxicité. Le test LDH, réalisé sur les cellules vivantes, mesure l'activité enzymatique de la LDH et évalue la viabilité cellulaire. Les résultats montrent une activité de la LDH deux fois plus faible pour les cellules cultivées sur la pastille HA poreuse par rapport à la lame de verre. Toutes les

autres conditions présentait un taux d'activité de la LDH similaire à celui de la lame de verre (de l'ordre de 1), sans différence significative.

Par contre, une plus grande viabilité cellulaire et moins de cytotoxicité ont été observées sur les biomatériaux CHA denses et poreux. Les cellules cultivées sur HA poreuse étaient viables, (la viabilité est similaire à celle de la lame de verre : d'environ 1), mais, métaboliquement moins actives, (taux deux fois moins important que celui de la lame de verre : d'environ 0.5 pour l'activité enzymatique de la LDH), comparées aux autres cellules. Seules les cellules cultivées sur le biomatériau CHA dense et poreux possédaient un taux de viabilité supérieur à celui de la lame de verre : à 1, donc, supérieur au contrôle interne (Figure 78).

IV.4.4.7 Etude de la prolifération et de la différenciation des cellules RAW 264.7, en fonction de la nature des biomatériaux

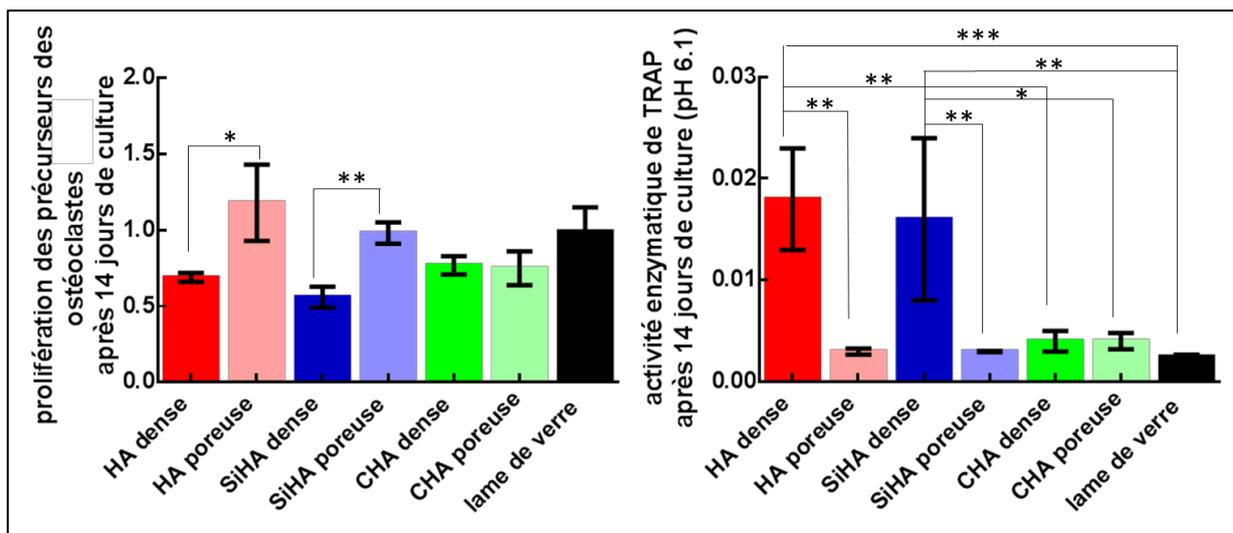


Figure 79 : activité proliférative et différenciation des cellules RAW 264.7, après 14 jours de culture.

Prolifération des précurseurs ostéoclastiques, mesurée par réplication de l'ADN (test BrdU) et différenciation des ostéoclastes, évaluée par l'activité enzymatique de TRAP. Les résultats des tests représentent la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD.

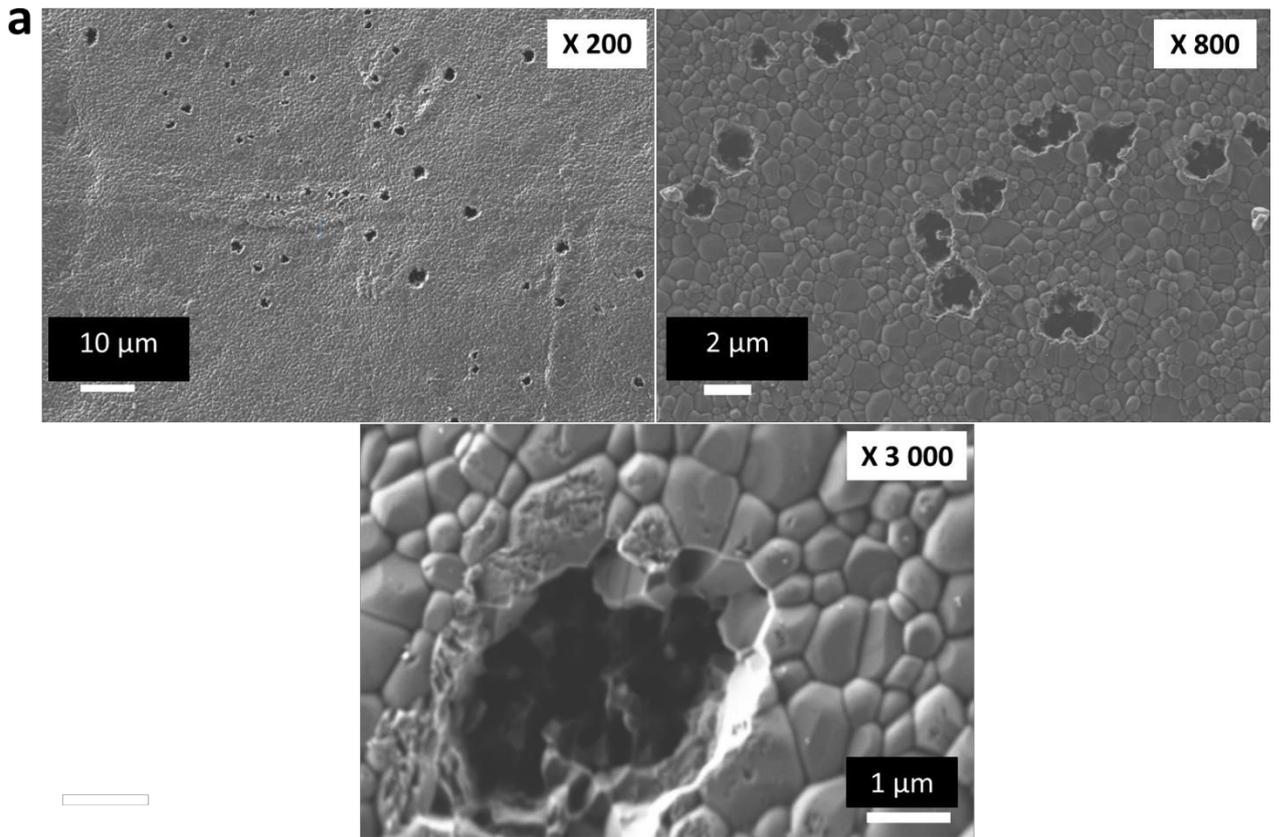
Le taux de prolifération sur SiHA dense et HA dense est significativement moins important, comparé au taux sur SiHA poreuse et HA poreuse respectivement. Concernant l'activité de TRAP 5b, c'est l'inverse qui est observé, avec plus d'activité mesurée sur SiHA et HA dense, comparée à SiHA poreuse et HA poreuse. Plus de prolifération est également observée sur la lame de verre. Un taux de prolifération

intermédiaire et identique est observé pour les biomatériaux CHA denses et poreux, par rapport au taux des autres conditions. L'activité enzymatique de TRAP 5b était également à un niveau intermédiaire et identique pour CHA, quelle que soit sa microstructure, comparée à l'activité des autres conditions (Figure 79).

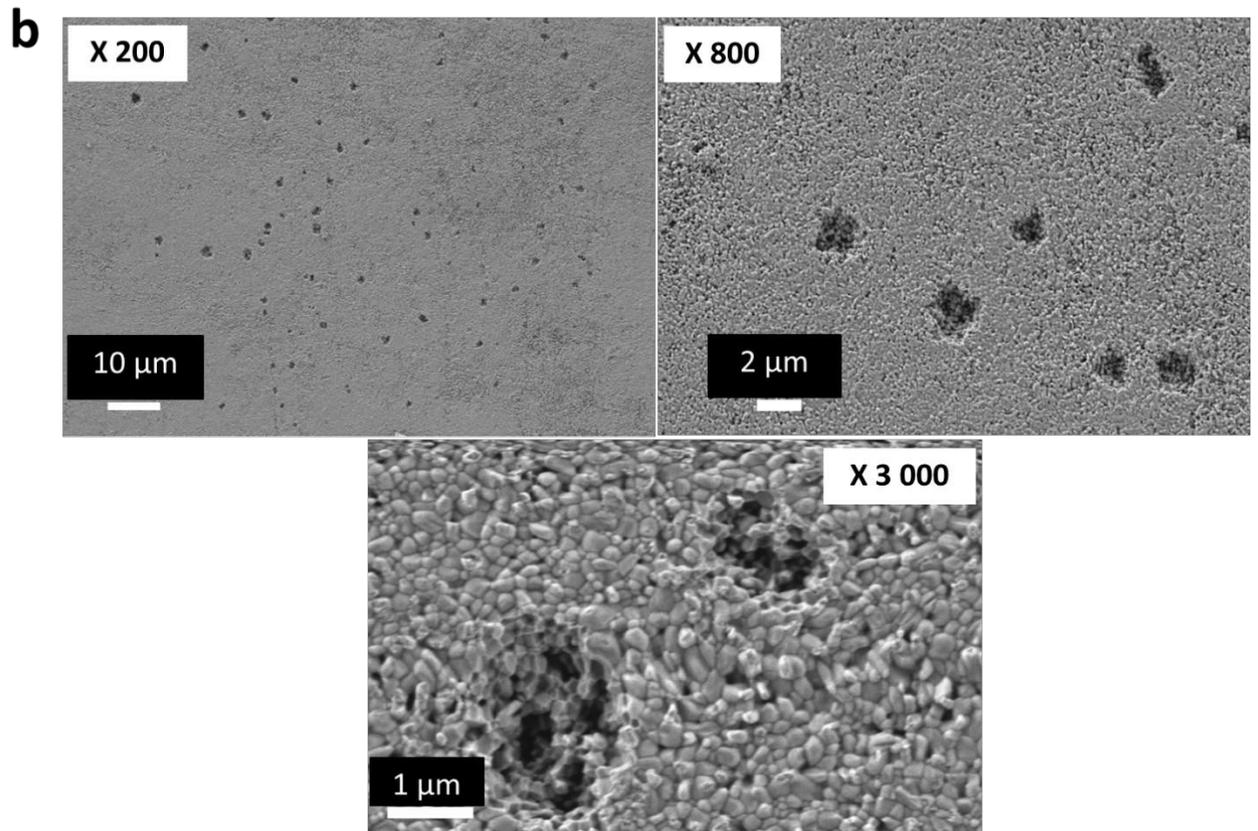
IV.4.4.8 Lacunes de résorption

Des lacunes de biorésorption ont été formées sur toutes les variantes de biomatériaux testées, après 14 jours de culture. Pour une même composition chimique, le profil de résorption des lacunes était similaire sur le biomatériau dense et poreux, mais, différait en fonction de la composition chimique. Des lacunes de résorption à la forme et aux contours bien définis et délimités ont pu être observées sur les biomatériaux HA et SiHA, qu'ils soient denses ou poreux. Par contre, en comparant HA avec SiHA, on constate une nette différence de la taille des lacunes de résorption. Les lacunes étaient beaucoup plus importantes sur SiHA dense et poreuse, comparées aux lacunes sur HA dense ou poreuse. Si les lacunes sont plus larges sur SiHA et correspondent à la taille d'une zone de scellement délimitée par une cellule (80-100 μm de périmètre environ (Figure 74 c), les lacunes sur HA ont une taille beaucoup plus petite que celle observée des cellules. En plus des lacunes de résorption à la surface des biomatériaux SiHA poreux, certaines zones présentent des signes d'érosion, susceptibles d'être la conséquence du processus de dissolution physico-chimique, courant sur ce type de matériau poreux (Figure 80 d : première ligne). Ce phénomène de dissolution est aussi observé sur la totalité de la surface des biomatériaux CHA denses et poreux. Il s'agit bien d'une dissolution et non de l'activité de biorésorption des cellules, puisque, avant d'enlever les cellules sur le biomatériau CHA dense, ce phénomène d'érosion de la surface a pu être observé (Figure 80 e : première image grossissement 200). Cette dissolution s'est produite en priorité au niveau des joints de grains. Une image de microscopie électronique en contraste a permis de voir une dislocation des grains (Figure 80 e : image en contraste grossissement 2000). Au niveau des lacunes de résorption, un grossissement sur la surface des grains a montré une altération de celle-ci, prouvant une biorésorption par acidité (Figure 80 e : dernière ligne, grossissement 10 000 et d) dernière ligne, grossissement 10 000 et 4 000).

HA dense

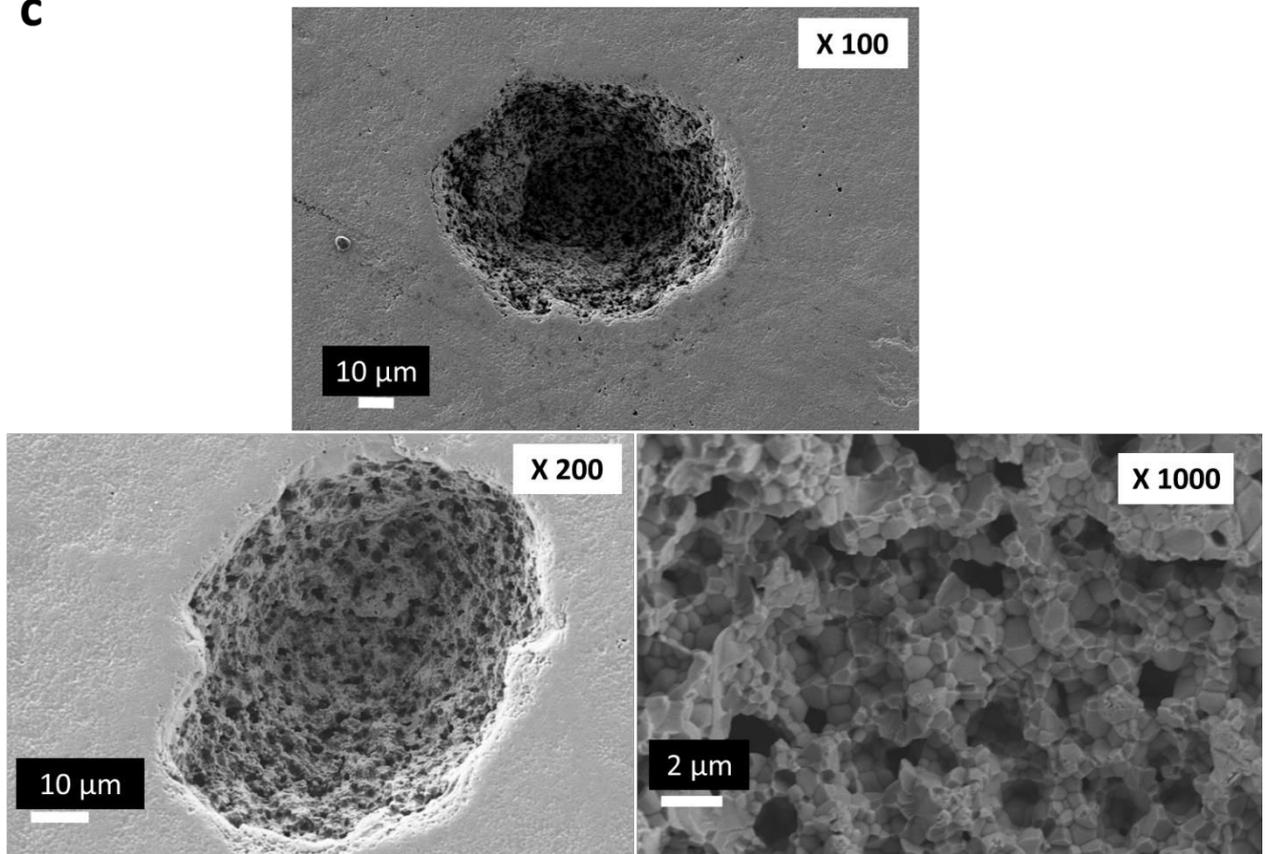


HA poreuse

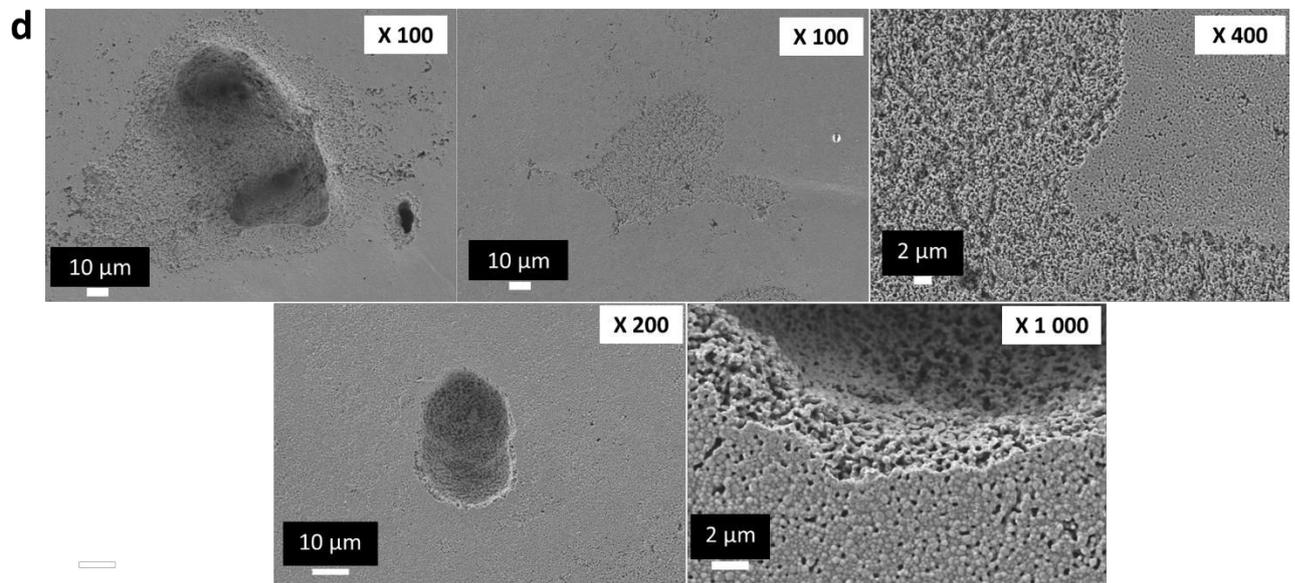


SiHA dense

C

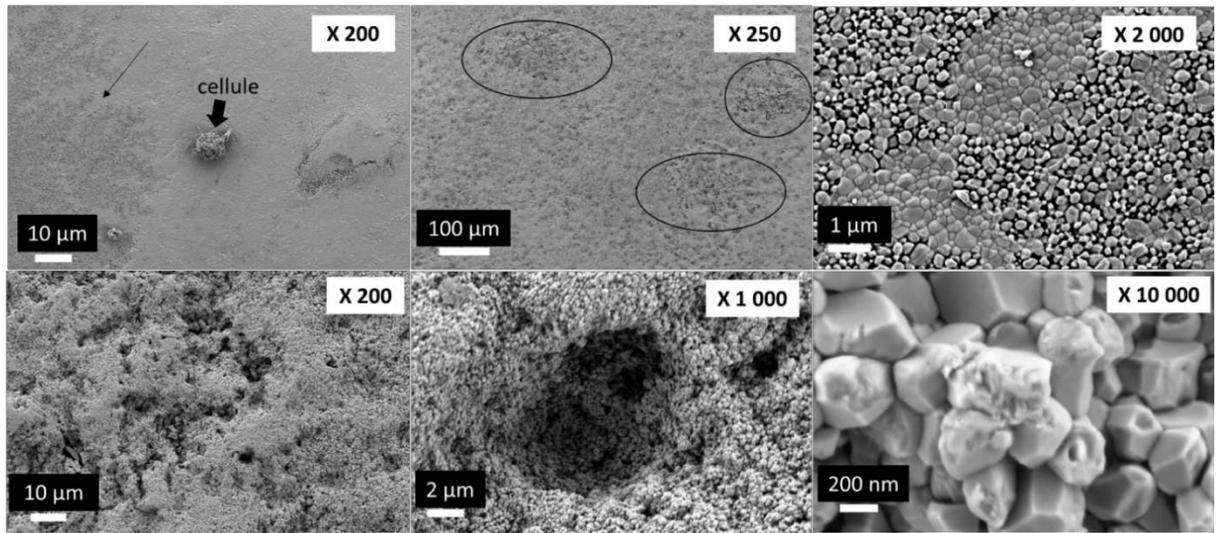


SiHA poreuse



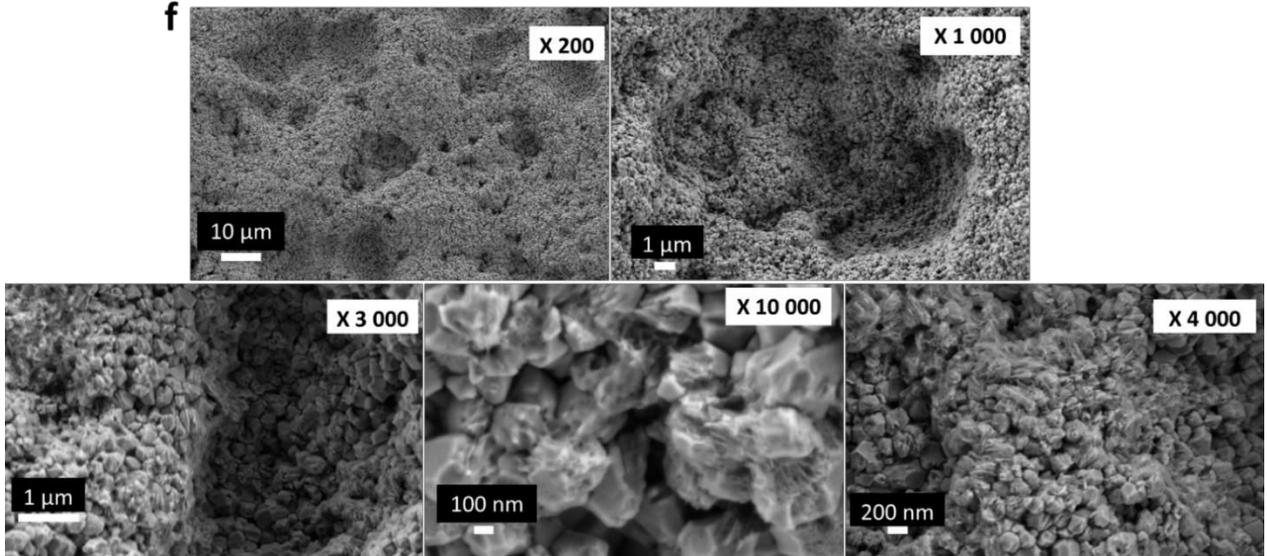
CHA dense

e



CHA poreuse

f



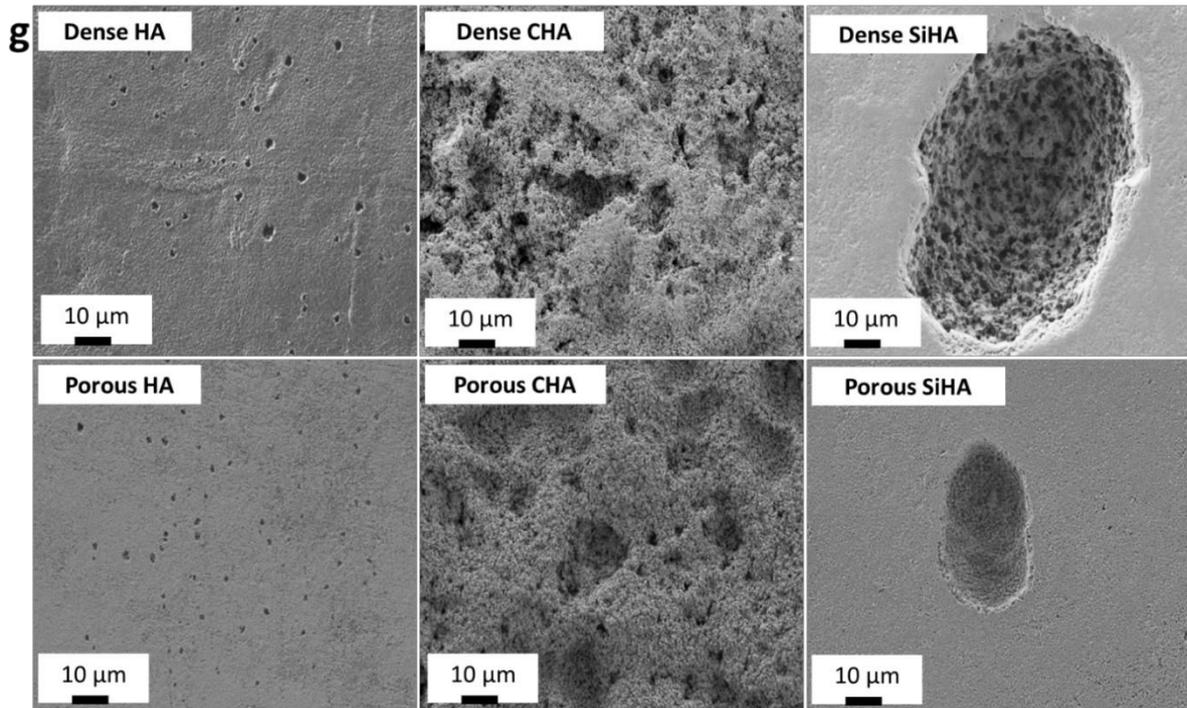


Figure 80 : images MEB des lacunes de résorption des six différents biomatériaux, après 14 jours de culture.

a) HA dense ; b) HA poreux ; c) SiHA dense ; d) SiHA poreux ; e) CHA dense ; La flèche et les cercles délimitent des zones d'érosion à la surface des biomatériaux ayant subit le phénomène de dissolution physico-chimique. f) CHA poreux ; g) images récapitulant la description des lacunes sur les biomatériaux à même grossissement

IV.4.4.9 Etude de la variation de la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes en fonction de la nature du biomatériau

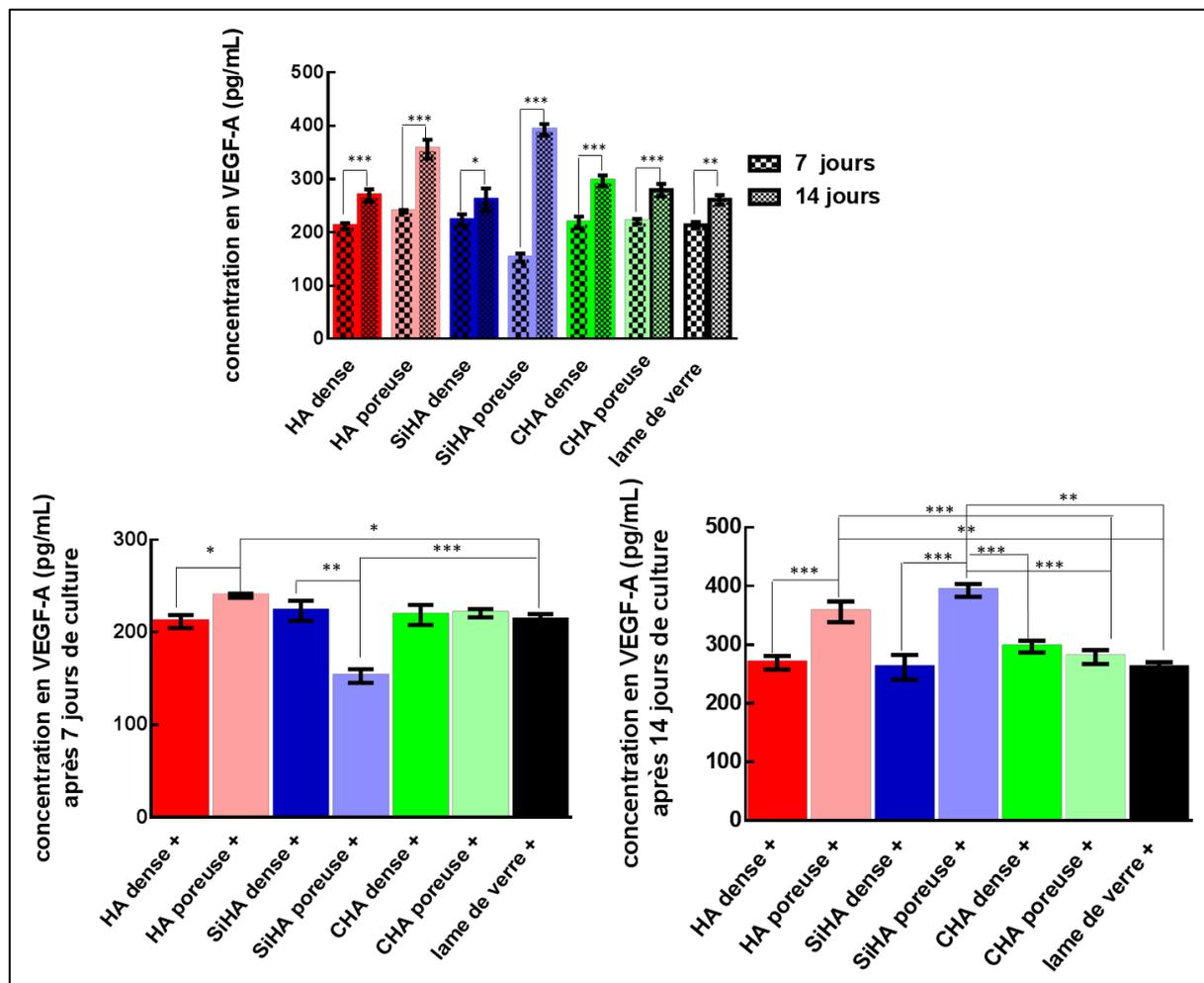


Figure 81 : concentration en VEGF-A, libéré dans le milieu de culture, par les cellules ostéoclastiques cultivées sur les six différents biomatériaux et la lame de verre, utilisée comme contrôle interne.

La concentration est mesurée par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de 6 mesures indépendantes \pm SD. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Les cellules RAW 264.7, cultivées en milieu différenciant, sécrètent du VEGF-A, à des concentrations variant entre 200-400 pg/mL. Quelles que soient la composition chimique et la microstructure des biomatériaux analysés, il a pu être constaté une augmentation significative de la sécrétion en VEGF-A, au cours du temps de culture de 7 à 14 jours. A 7 jours, les biomatériaux HA poreux ont sécrété significativement plus de VEGF-A que les biomatériaux HA dense. Le phénomène inverse est constaté pour les biomatériaux SiHA poreux, puisque ceux-ci ont sécrété significativement moins de VEGF-A que les denses. A 14 jours, la tendance s'est inversée pour SiHA

poreux qui a sécrété significativement plus de VEGF-A que SiHA dense. Concernant HA denses et poreux, la même tendance a été observée, la sécrétion de VEGF-A est significativement plus élevée sur HA poreuse, comparée à HA dense. Cette observation ne s'applique pas aux biomatériaux CHA denses et poreux à 7 et 14 jours puisque la sécrétion de VEGF-A est similaire quelque soit la microstructure du biomatériau. A 14 jours, la concentration sur les biomatériaux HA et SiHA poreux était significativement plus importante (Figure 81).

IV.4.5. Discussions

IV.4.5.1 La différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclaste pourrait dépendre de la nature dense du biomatériau

Les étapes précoces de la différenciation des macrophages en ostéoclastes sont régulées par des facteurs de croissance, comme M-CSF (*Macrophages Colony Stimulating Factor*). Par la suite, la différenciation des précurseurs des ostéoclastes issus de la moelle osseuse, (CFU-M : *Colony Forming Units – Macrophages*) en ostéoclastes, dépend de la signalisation activée par l'interaction de RANK-L sécrété par les ostéoblastes avec son récepteur RANK sur les ostéoclastes. L'équilibre physiologique entre résorption et accrétion osseuse dépend du contrôle précis de la différenciation ostéoclastique qui est étroitement liée à l'équilibre du rapport RANK-L/Ostéoprotégérine (OPG). Cette dernière protéine inhibe, en effet, la différenciation des ostéoclastes, en neutralisant RANK-L ce qui permet de réguler l'ostéoclastogenèse, (Lerner, 2000). L'addition de M-CSF et RANK-L dans le milieu de culture des RAW 267.4, permet de mimer l'action des ostéoblastes sur l'induction de la différenciation des macrophages. Cette différenciation semble active à 14 jours sur les 6 biocéramiques, même si certaines cellules présentent encore un noyau unique, suggérant ainsi que l'étape de fusion des cellules mononucléées n'est pas encore terminée, sur l'ensemble des cellules, malgré son induction par des facteurs de différenciation, (M-CSF et RANK-L), ajoutés dans le milieu de culture. Lorsque cette étape de fusion des macrophages indispensable à leur différenciation en ostéoclastes multinucléés a bien été effective, des cellules possédant un maximum de 4 noyaux ont été observées sur les différents biomatériaux, ce qui prouve que la nature chimique des biomatériaux n'influence pas la fusion des cellules. La taille des cellules

multinucléées est relativement normale et aucune cellule géante n'est observée, ce qui signifie que les biomatériaux utilisés n'induisent pas la formation de cellules multinucléées présentant plus de 10 noyaux. Ce type de cellules est généralement associé à des conditions pathologiques telles que l'ostéoporose et les maladies inflammatoires chroniques. Trebec *et al* ont ainsi constaté que ces gros ostéoclastes prédominent dans la polyarthrite rhumatoïde et la maladie parodontale. Leur activité de résorption est plus importante que celle des petits ostéoclastes, (2-5 noyaux), en raison de la forte production de protéases et de l'expression de récepteurs activateurs de la biorésorption, (Trebec et al., 2007). Ces différents ostéoblastes activent des voies de signalisation différentes et ne possèdent pas la même capacité à sécréter du VEGF-A, (Trebec et al., 2007), (Trebec-Reynolds et al., 2010). Afin de préciser le statut de différenciation des ostéoclastes et de déterminer si il existe des différences liées à la nature, ou la microstructure des différents matériaux, plusieurs paramètres ont été évalués.

IV.4.5.2 Dissolution physico-chimique et biorésorption par les ostéoclastes

Deux hypothèses peuvent être émises en ce qui concerne l'origine du calcium relargué dans le milieu : Le calcium provient soit de la dissolution physico-chimique du biomatériau, soit de la biorésorption de ce dernier par les ostéoclastes. Il a été cependant constaté que, quels que soient les biomatériaux considérés, la concentration de calcium dans le milieu de culture augmente toujours en présence des cellules, suggérant ainsi, que les ostéoclastes ont entamé leur processus de différenciation et exercent leur activité de biorésorption des pastilles. Ce phénomène a été confirmé par les observations en MEB qui montrent des lacunes de résorption plus ou moins importantes et nombreuses en fonction des différents matériaux. De plus, la diminution des valeurs du pH vient étayer l'hypothèse d'une activité de résorption, due aux cellules sur tous les biomatériaux, quelles que soient la composition et la microstructure. Les cellules en biorésorption créent en effet un compartiment acide étroitement délimité par la zone de scellement entre la cellule et le biomatériau. Dans cette zone, le pH atteint des valeurs de l'ordre de 3 - 4 (Detsch and Boccaccini, 2014). Bien que le pH mesuré dans le milieu de culture soit plus élevé que 3 ou 4, le milieu est toujours significativement plus acide en présence des cellules

que dans un milieu sans cellule, laissant suggérer l'activité de résorption des cellules. L'activité métabolique des cellules pourrait également expliquer la diminution du pH.

L'autre élément permettant de préciser l'effet des biomatériaux sur le comportement cellulaire et notamment sur la cinétique de différenciation des ostéoclastes, est le calcium libéré dans le milieu, entre 7 et 14 jours. A 7 j, les concentrations de calcium sont similaires, avec ou sans cellules sur le biomatériau HA dense démontrant que l'activité de résorption n'a pas commencé sur ce type de biomatériau dense ce qui pourrait refléter un retard dans la maturation des ostéoclastes. Retard rapidement comblé, puisqu'à 14 j, les concentrations de calcium sont significativement supérieures en présence des cellules RAW 267.4, sur ce même biomatériau. L'augmentation des concentrations en calcium, entre 7 et 14 jours, sur tous les biomatériaux denses, quelle que soit la composition chimique, confirme la progression de l'activité de résorption des ostéoclastes et une différenciation accrue des cellules RAW 267.4. Par contre, un phénomène de précipitation a probablement commencé à 14 jours pour les biomatériaux SiHA denses et CHA denses, car, l'augmentation du calcium était significativement plus faible comparée à celle de HA dense qui commençait à 14 jours son activité de résorption. On peut également se demander si la cinétique de dissolution varie en fonction de la microstructure de façon indépendante de la composition chimique. En effet, les pastilles poreuses présentent le plus faible taux de calcium dans le milieu de culture, quelle que soit la composition chimique considérée. L'hypothèse selon laquelle la précipitation de calcium sur les pastilles poreuses serait supérieure à celle des pastilles denses a été émise. Le calcium libéré par les pastilles poreuses atteindrait un niveau de saturation plus rapidement et provoquerait la précipitation d'apatite phospho-calcique en surface du biomatériau. Un fort taux de calcium libéré rapidement dans le milieu pourrait inhiber l'activité des ostéoclastes (Yamada et al., 1997), (Nielsen et al., 2007), (Zaidi et al., 1989), (Detsch et al., 2010). La précipitation du calcium responsable de l'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes pourraient expliquer en partie l'absence de différences observée pour la concentration calcique dans le milieu des biomatériaux poreux avec ou sans cellules, à 14 j.

Afin de déterminer si le processus de différenciation des RAW 264.7 en ostéoclastes et l'activité de résorption de ceux-ci étaient altérés, l'expression du

marqueur TRAP a été recherché et la configuration de surface des pastilles a été analysée.

IV.4.5.3 Viabilité cellulaire

L'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes sur les biomatériaux HA poreux pourrait comme nous l'avons démontré précédemment dépendre du relargage du calcium dans le milieu. Les résultats concernant le métabolisme cellulaire, mesuré par l'activité de la LDH, semble confirmer ce phénomène. Il a pu en effet être montré qu'il existe une relation entre l'expression de la LDH et l'activité de résorption des ostéoclastes. L'activité enzymatique de la LDH permet de produire la lactate, source d'énergie pour l'activité de résorption (Coleman et al., 1976). Par conséquent, le faible taux d'activité de la LDH dans ces biomatériaux pourrait être corrélé à une faible activité de résorption. La microstructure poreuse semblerait donc moins favorable. Cependant, cet effet n'a pas été observé sur les matériaux poreux de compositions chimiques différentes : SiHA et CHA. La substitution en ions silicates et carbonate compensant les effets induits sur l'activation du métabolisme cellulaire et la viabilité cellulaire, par une microstructure poreuse. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la libération de silicium et de carbonates dans le milieu permet d'atténuer les effets inhibiteurs du calcium sur l'activité ostéoclastique.

Il est cependant complexe d'affirmer que des cellules différenciées sont actives. Elles doivent être activées par des signaux émis par leur environnement (signaux paracrines libérés par les ostéoblastes : cytokines, hormones, signaux autocrines libérés par les ostéoclastes, calcium), (Cappariello et al., 2014). Il faut ainsi distinguer selon Lerner, des « ostéoclastes latents » et des « ostéoclastes actifs » (Lerner, 2000). C'est aussi la différence qu'à soulignée Kreja en parlant d'« ostéoclaste non résorbant », (Kreja et al., 2010).

C'est la raison pour laquelle après avoir vérifié l'expression de TRAP 5b dans les cellules par un marquage et analyser le nombre de cellules multinucléées, une étude de l'activité enzymatique de TRAP 5b et des signes physiques de biorésorption a été menée.

IV.4.5.4 L'activité enzymatique de TRAP 5b et VEGF-A confirme le processus de résorption osseuse

IV.4.5.4.1. L'activité enzymatique de TRAP 5b

TRAP 5b est considéré comme un marqueur de l'activité ostéoclastique. Son expression est proportionnelle au taux de résorption, (Kirstein et al., 2006). La quantité de TRAP circulant est corrélée à la quantité d'os résorbé et reflète ainsi le taux de résorption osseuse, (Halleen et al., 2000).

Par contre, en comparant des cellules non-résorbantes et des cellules résorbantes, il a été montré que TRAP est moins exprimé dans les cellules résorbantes que dans les non-résorbantes, (Moonga et al., 1990). Cette étude pourrait donc laisser supposer que les cellules dont l'activité était plus importante étaient en fait des cellules non-résorbantes. Yamada a montré que l'activité de résorption dépend du degré de solubilité des biomatériaux. Une solubilité élevée se traduisant par une libération importante de calcium extracellulaire, diminue la résorption des biomatériaux, (Yamada et al., 1997).

Moonga a également observé qu'une concentration de calcium à 20 mM, diminue de façon significative, la sécrétion d'enzymes par les ostéoclastes résorbants par rapport aux ostéoclastes non-résorbants, (Moonga et al., 1990). Zaidi a montré que des récepteurs isoformes de la ryanodine de type II sont responsables de la détection du niveau de calcium dans le milieu extracellulaire, et que leur augmentation inhibe l'activité de résorption des ostéoclastes, (Zaidi et al., 1999).

Le fait qu'il y ait un effet de microstructure observé sur l'activité enzymatique de TRAP, pour les matériaux de même composition chimique, SiHA et HA, laisse supposer que les cellules ont été influencées par la quantité de calcium libérée dans le milieu par les biomatériaux. En effet, la dissolution est aussi dépendante de la microstructure. On peut émettre l'hypothèse que des biomatériaux poreux se dissolvent plus rapidement.

Concernant le biomatériau SiHA poreux, on peut également émettre l'hypothèse que la quantité plus importante de silicium libéré dans le milieu, comparé à la pastille dense, a contribué à inhiber l'activité de biorésorption. Plusieurs études ont en effet démontré que le silicium avait des effets négatifs sur l'activité ostéoclastique (Schütze et al., 1995), (Mladenović et al., 2014), (Schröder et al., 2012). L'activité ostéoclastique

ne serait pas la seule ciblée par l'action directe du silicium sur les cellules. Ainsi, la prolifération a augmenté sur SiHA poreux alors que l'activité de TRAP 5b était réduite à son minimum suggérant que l'augmentation de la libération du silicium favorise la prolifération des précurseurs ostéoclastiques au détriment de la différenciation des cellules RAW 267.4. Au contraire, la substitution en carbonate de 4,4 % massique maintiendrait un équilibre entre prolifération et différenciation.

Concernant les biomatériaux CHA, comme démontré dans la littérature, la présence de carbonate augmente la dissolution, (Barralet et al., 2000). Ces biomatériaux libèrent une quantité de calcium importante dans le milieu, (Monchau et al., 2002), (Spence et al., 2009). En plus du phénomène de dissolution, certaines études ont montré que la substitution en carbonate augmente l'activité de biorésorption des ostéoclastes, (Doi et al., 1998), (Hasegawa et al., 2003), (Kanayama et al., 2011). L'hypothèse du fort taux de calcium libéré dans le milieu du fait de ces deux phénomènes aurait contribué à limiter l'activité enzymatique de TRAP 5b à posteriori. En effet, comme énoncé précédemment, une importante concentration calcique rétro-régule l'activité de TRAP 5b en la diminuant : c'est le mécanisme d'auto-régulation dont parle Moonga dans sa publication, (Moonga et al., 1990).

Ainsi, la plus faible activité enzymatique retrouvée sur CHA, quelle que soit sa microstructure, est le reflet d'une importante dégradation de ces matériaux en amont. En revanche, la faible activité enzymatique de TRAP 5b retrouvée pour les biomatériaux poreux HA et SiHA poreux, comparée aux biomatériaux denses de même composition chimique, est le signe d'une faible activité de résorption sur les biomatériaux poreux, comparée aux biomatériaux denses. En effet, la prolifération des précurseurs ostéoclastiques est privilégiée au détriment de la différenciation et donc de l'activation des ostéoclastes.

L'analyse de la surface des biomatériaux en MEB, après élimination des cellules, a prouvé que tous les biomatériaux ont été résorbés par les ostéoclastes. Cependant, le profil de biorésorption était différent selon les différents biomatériaux. L'érosion de surface observée avant le retrait des cellules a prouvé qu'un phénomène de dissolution des pastilles avait également commencé et particulièrement sur les pastilles poreuses. Cela conforte l'hypothèse émise précédemment selon laquelle plus la libération de calcium par les pastilles est importante, plus la différenciation et l'activité de résorption est diminuée voire inhibée.

Les plus grosses lacunes observées sur SiHA, quelle que soit la microstructure, laissent supposer que les cellules ont mieux adhéré sur SiHA pour réorganiser leur cytosquelette et la formation d'anneaux d'actine, pour délimiter la zone de scellement des cellules aux biomatériaux. Cela pourrait s'expliquer par la présence de groupement Si-OH en surface des biomatériaux qui ont plus d'affinité pour des protéines de la membrane cellulaire (Schwarz, 1973). Une étude quantitative du volume des lacunes et du nombre de lacunes par unité de surface pourrait être complémentaire à l'analyse qualitative pour renforcer l'hypothèse d'une plus grande résorption sur CHA quelle que soit la microstructure suivie des biomatériaux denses HA et SiHA comparés aux biomatériaux poreux HA et SiHA.

IV.4.5.4.2. **Sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes**

Dans la littérature, très peu d'études ont montré que le VEGF-A est sécrété directement par les ostéoclastes. Cette étude a prouvé que les ostéoclastes sécrètent du VEGF-A, au contact de biomatériaux HA, SiHA et CHA, quelle que soit leur microstructure.

A 14 jours, en comparant le profil d'expression de l'activité enzymatique de TRAP 5b et la sécrétion du VEGF-A ([Figure 79](#) et [Figure 81](#)), une corrélation a pu être établie. Concernant HA et SiHA, lorsque l'activité enzymatique de TRAP 5b était élevée, sur les biomatériaux denses, il y a eu peu de VEGF-A sécrété. Au contraire, lorsque l'activité enzymatique de TRAP 5b diminue, dans les biomatériaux poreux, la sécrétion de VEGF-A augmente. Le comportement cellulaire était différent sur CHA. Il n'y a pas eu d'influence de la microstructure. La concentration de VEGF-A sécrétée par les cellules sur CHA, quelle que soit la microstructure, est d'un niveau intermédiaire entre les concentrations élevées sécrétées par les cellules sur SiHA et HA poreuse et plus faibles sécrétées par les cellules sur HA dense et SiHA dense. L'influence sur l'activité cellulaire viendrait donc de la substitution en ions carbonates et non de la microstructure.

Les cellulesensemencées sur CHA ont un métabolisme et une activité de résorption importante du fait de la substitution en ions carbonates. La résorption des céramiques phosphocalciques carbonatées CHA s'est traduite par la libération d'une quantité importante de calcium dans le milieu qui a eu pour conséquence l'auto-régulation de l'activité de TRAP 5b, donc une diminution de l'activité de TRAP 5b.

L'expression du VEGF-A par les ostéoclastes est généralement plus importante dans les ostéoclastes larges retrouvés dans des conditions pathologiques en comparaison des petits ostéoclastes, (Trebec et al., 2007). Le VEGF-A apparait comme l'un des possibles facteurs sécrétés par les ostéoclastes, susceptible de promouvoir l'activité de résorption des ostéoblastes, (Gerber et al., 1999), (HaDuong et al., 2015), (Hu and Olsen, 2016), (Huang et al., 2016). Les cellules ostéoclastiques non résorbantes (qui ne résorbent pas l'os mais qui régulent l'activité des cellules osseuses), ont un effet anabolique sur la migration et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules sécrètent le facteur PDGF qui a été identifié comme responsable de la migration, (Kreja et al., 2010). Le VEGF-A stimulerait la différenciation de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse vers une différenciation ostéoblastique au détriment d'une différenciation adipocytaire (Liu and Olsen, 2014).

IV.4.1. Conclusion de l'étude

L'ensemble des évaluations biologiques et particulièrement l'activité enzymatique de la LDH, l'activité enzymatique de TRAP 5b, la sécrétion de VEGF-A et l'analyse de la surface des pastilles après élimination des cellules, a permis de corrélérer l'activité de biorésorption des ostéoclastes, avec la sécrétion de VEGF-A. Les caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux HA et SiHA, via la cinétique de dissolution des biomatériaux, donc, une libération de calcium et de silicium, a influencé l'activité de biorésorption des ostéoclastes. Les cellules sur les biomatériaux poreux présentaient une activité de TRAP 5b significativement plus faible, mais, une sécrétion de VEGF-A significativement plus élevée, par rapport aux cellules sur les biomatériaux denses, de même composition chimique, qui eux, présentaient une activité de résorption plus élevée. Les biomatériaux de microstructures poreuses favoriseraient par conséquent, une activité angiogénique et donc une formation osseuse prépondérante à l'activité de biorésorption. L'effet inverse serait observé pour les biomatériaux denses, qui favoriseraient la biorésorption, par rapport à la formation osseuse. Le biomatériau CHA indépendamment de la microstructure aurait une activité de résorption élevée mais favoriserait également une formation osseuse élevée. En effet, le niveau de sécrétion de VEGF-A par les cellules sur CHA, quelle que soit la microstructure, était du même

ordre que celui des cellules sur les biomatériaux denses HA et SiHA. La figure 82, (Figure 82), résume les tendances relevées pour les différents matériaux.

TRAP 5b est identifié comme étant un marqueur de la résorption osseuse. Une activité de sécrétion élevée de TRAP 5b est associée à une résorption importante. Cependant, récemment, des études *in vitro* ont montré que le niveau d'activité de TRAP 5b est auto-régulé par les concentrations élevées en calcium. Ainsi, une faible activité de TRAP 5b peut être soit la résultante d'une faible activité de résorption ou bien la conséquence d'une auto-régulation par des concentrations élevées en calcium libérée dans le milieu, du fait d'une activité de résorption importante. Cette étude a permis de comprendre la relation existant entre les deux molécules : VEGF-A et TRAP 5b, pouvant servir comme de possibles marqueurs de la résorption osseuse. L'analyse combinée des deux marqueurs simultanément permettrait un diagnostic plus fiable. Dans ce modèle d'étude, après 14 jours de culture, une gamme de $[279 \pm 12 - 297 \pm 10]$ pg / mL de VEGF-A sécrétée par des ostéoclastes et une faible activité enzymatique de TRAP 5b ont été identifiées comme une combinaison de marqueurs associés à une bonne activité de bioresorption. Néanmoins, lorsque la concentration de VEGF-A atteint plus de 300 pg / mL et est associée à une faible activité enzymatique de TRAP 5b, l'activité de résorption diminue.

L'expression inversement corrélée de ces deux protéines pourrait servir pour le diagnostic des maladies métaboliques osseuses. Le diagnostic non invasif de maladies osseuses telles que l'ostéoporose étant un challenge, des études plus poussées sur le fonctionnement de ces deux molécules mériteraient d'être entreprises.

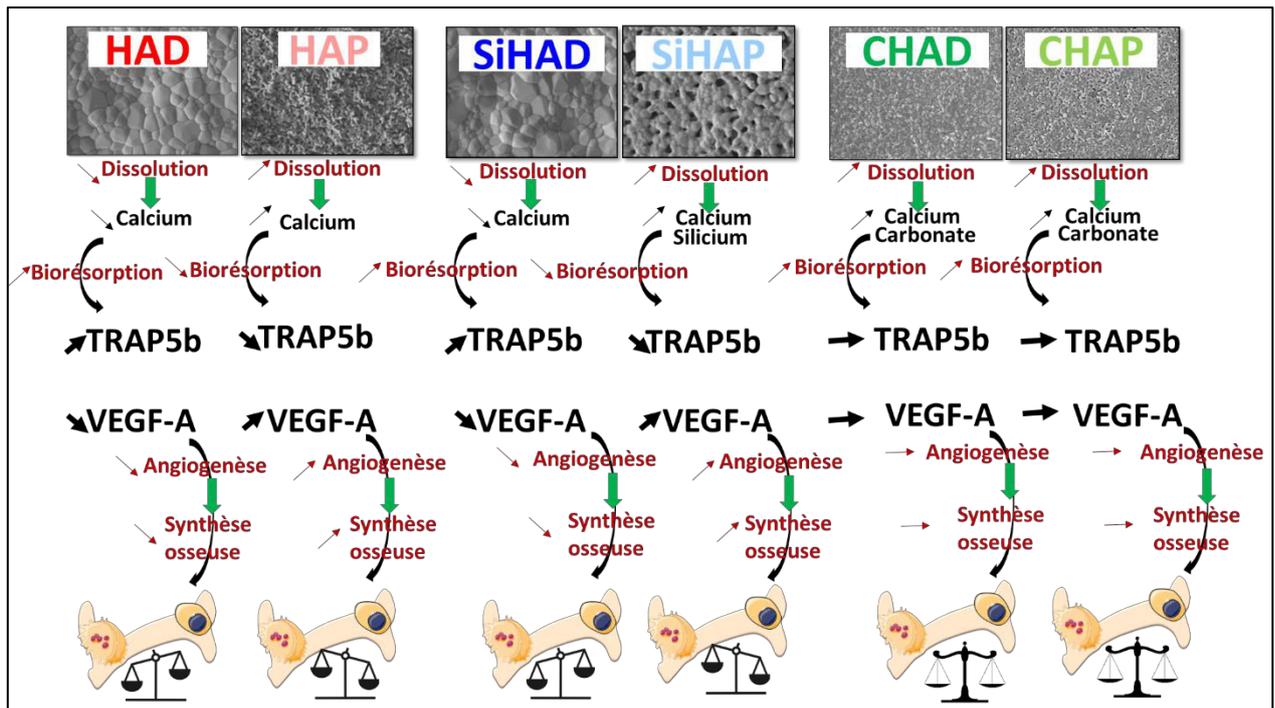


Figure 82 : schéma récapitulatif de l'influence de la composition chimique et de la microstructure des céramiques de phosphate de calcium, sur l'activité de résorption des ostéoclastes. VEGF-A et TRAP 5b : marqueur du taux de résorption.

Ce schéma est issu de l'ensemble des résultats des évaluations biologiques obtenues. Des expériences supplémentaires telles qu'une co-culture, voire une tri-culture (ostéoblastes, ostéoclastes, cellules endothéliales) permettraient de mieux apprécier le rôle de la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes et de confirmer les hypothèses émises

Conclusions générales

Les travaux effectués dans le cadre de ma thèse et menés à partir de thèses antérieures réalisées au laboratoire SPCTS de l'Université de Limoges, ont permis de synthétiser, de façon reproductible, par un procédé de précipitation aqueuse, trois compositions chimiques de phosphate de calcium exemptes de seconde phase :

- **l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$**
- **l'hydroxyapatite silicatée (SiHA) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,58}(\text{SiO}_4)_{0,42}(\text{OH})_{1,58}$**
- **l'hydroxyapatite carbonatée de type A/B à 4,4% massique (CHA) : $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,08}(\text{CO}_3)_{0,23}$.**

Au total, 6 variantes de céramiques de phosphate de calcium ont été élaborées : 3 compositions chimiques et 2 microstructures différentes.

A partir du procédé de frittage, en ayant adapté le temps et la température du cycle thermique pour chacune des trois compositions chimiques, deux microstructures ont été obtenues : une microstructure dense (0 - 6 % de porosité fermée) et une microstructure poreuse (25 - 32 % de porosité ouverte).

Un panel de tests de caractérisations a été réalisé sur les six variantes de pastilles de biocéramiques synthétisées et mises en forme.

Cette première étape incontournable comprenant, la synthèse, la mise en forme et la caractérisation des biomatériaux, a permis d'obtenir des substrats nécessaires à la réalisation de tests biologiques en conditions comparables – une même méthode, un même type cellulaire, des biocéramiques préalablement caractérisées – , indispensables pour discriminer l'influence de la composition chimique de celle de la microstructure des 6 variantes de biocéramiques.

La réponse biologique des deux types de cellules impliquées dans la régénération osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes, a été analysée. La stratégie développée ici a consisté à utiliser des lignées cellulaires caractérisées de façon courante en biologie :

- la lignée cellulaire pré-ostéoblastique, MC3T3-E1
- la lignée de monocytes/macrophages, RAW 264.7, (précurseurs des ostéoclastes).

Plusieurs critères tels que la viabilité, le métabolisme et l'adhésion cellulaire, ainsi que des tests fonctionnels de prolifération et de différenciation cellulaire ont été évalués. Les points de cinétique les plus pertinents pour observer les réponses biologiques, ont été choisis. Grâce à des analyses statistiques en composante principale (ACP), les propriétés chimiques et physiques des biomatériaux qui orientent l'activité biologique ont pu être déterminées. Des corrélations et des corrélations inverses entre les différentes activités biologiques ont également été mises en évidence. Au regard de la littérature, des comparaisons, des confrontations et des analogies ont pu être effectuées et ont permis de comprendre le rôle joué respectivement par la composition chimique et la microstructure des biomatériaux sur les réponses cellulaires ostéoblastiques et ostéoclastiques. Connaissant les exigences requises pour une réparation osseuse optimale par un biomatériau, l'effet bénéfique d'une composition chimique par rapport aux autres compositions ou d'une microstructure par rapport à l'autre microstructure a pu être évalué. Ainsi, l'influence spécifique des ions silicates, des ions carbonates, de la microporosité ou l'influence de la synergie entre une porosité et une composition chimique ont été attribuées à un comportement cellulaire spécifique.

- Tous les biomatériaux évalués dans cette étude sont biocompatibles. En effet, 90-100% de viabilité ostéoblastique a été observée. La viabilité ostéoclastique était quant à elle, deux fois plus importante que sur le contrôle, pour les cellules cultivées sur les céramiques carbonatées. La composition chimique CHA substituée à 4,4 % massique, quelle que soit la microstructure, présente des avantages sur la viabilité des précurseurs ostéoclastiques.

- Dans cette thèse, l'influence de la microstructure a été identifiée comme principalement due à la microporosité, les autres propriétés physico-chimiques de la surface étant similaires pour les différents matériaux élaborés. L'effet de la porosité a été observé sur l'activité fonctionnelle ostéoblastique et ostéoclastique uniquement pour les matériaux de composition chimique HA et SiHA.

- A 24 h, *in vitro*, une augmentation de la prolifération a été constatée sur les biomatériaux denses SiHA et HA tandis que sur les biomatériaux poreux HA et SiHA, la différenciation avait augmentée (ostéopontine). L'inverse a été constaté concernant l'activité ostéoclastique : plus de prolifération a été observée sur les biomatériaux poreux alors que plus de différenciation l'était sur les biomatériaux denses. Aucune

différence entre un biomatériau HA et SiHA d'une même microstructure n'a été observée. Dans cette thèse, l'influence de la microporosité aurait agi sur les ostéoblastes par des tensions internes. En effet, une corrélation entre le nombre d'adhésions focales et le taux de prolifération a été constatée. L'absence ou la présence de pores modifierait les tensions internes dans le cytoplasme cellulaire qui se répercuteraient au niveau du noyau. Ainsi, en fonction de la densification du matériau (absence de porosité), les tensions internes plus fortes, liées à une adhésion cellulaire plus grande, favoriseraient la prolifération cellulaire ostéoblastique. Les faisceaux de microtubules du noyau pourraient se réorganiser afin de faciliter la division cellulaire. En ce qui concerne l'activité ostéoclastique, la porosité aurait agi de façon indirecte via une libération plus importante de calcium qui aurait diminué la différenciation ostéoclastique et donc l'activité de biorésorption.

En jouant sur la microporosité des biomatériaux, la cinétique de relargage du calcium pourrait être modulée pour activer soit une synthèse osseuse, soit une biorésorption. Un taux de porosité ajusté permettrait une libération optimale de calcium pour l'équilibre entre synthèse et biorésorption, afin d'optimiser la performance des biomatériaux HA et SiHA.

- La présence de silicium sur le biomatériau pourrait permettre d'expliquer les changements de comportements biologiques des cellules. La comparaison de l'ensemble des biomatériaux a permis de mettre en évidence, l'effet de la substitution en silicium sur l'étalement des cellules sur le substrat. Le silicium favoriserait l'étalement des cellules au substrat. Cette thèse a étayé une hypothèse de la littérature en montrant que les groupements silicates en surface du biomatériau, interagissent avec des groupements des protéines membranaires, pour favoriser l'étalement cellulaire.

- Les travaux de cette thèse ont montré que la synergie entre la porosité à 30% et la substitution en ions silicates à 1,13% massique agit sur la différenciation ostéoblastique. L'effet du silicium sur la différenciation ostéoblastique observée sur les matériaux poreux SiHA contrairement au matériau dense SiHA, viendrait de la disponibilité plus importante en silicium par le biomatériau poreux. Les pré-ostéoblastes ont consommé le silicium libéré en plus importante quantité par le biomatériau poreux et ont exprimé l'ostéopontine plus précocement. Le silicium a de surcroît maintenu l'expression protéique d'ostéopontine dans le temps. L'effet du

silicium sur le collagène de type I est bien connu dans la littérature. Cette thèse a démontré un effet du silicium sur l'ostéopontine. L'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle du collagène de type I par l'ostéopontine pourrait être émise.

En revanche, aucun effet significatif de la microstructure concernant les biomatériaux de composition chimique CHA (4,4% massique) n'a été observé dans les résultats de cette thèse.

- Quelle que soit la microstructure, la composition chimique CHA (4,4% massique) a favorisé la biorésorption par les ostéoclastes. Cette thèse a étayé une hypothèse de la littérature en montrant que l'action des ions carbonates pourrait être dû à l'interaction entre ces ions et de supposés récepteurs minéraux exprimés à la surface des ostéoclastes.

- Quelle que soit la microstructure, la composition chimique CHA (4,4% massique) présentait une meilleure dissolution. Cela pourrait s'expliquer par des cristaux de tailles plus petites du fait de l'incorporation d'ions carbonates à la place des groupements phosphates, ainsi que par des grains de tailles plus petites.

- Dans cette thèse, les résultats de la littérature sur le mécanisme d'auto-régulation de l'activité ostéoclastique ont été étayés. Le calcium plus important libéré par les biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure, du fait d'une dissolution et d'une biorésorption par les ostéoclastes, a diminué l'activité enzymatique de TRAP 5b.

- Une corrélation inverse entre l'activité de TRAP 5b et la sécrétion du VEGF-A par les ostéoclastes, a été constatée dans les travaux de cette thèse. Plus de VEGF-A a été sécrété par les ostéoclastes dont l'activité de résorption était moindre. Cette thèse a donc montré que les biomatériaux poreux HA et SiHA favoriseraient la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes, pour stimuler une activité angiogénique favorable à la stimulation d'une synthèse osseuse. Les ostéoclastes sur les CHA, quelle que soit la microstructure, ont exprimé le VEGF-A de façon intermédiaire, entre l'expression des ostéoclastes sur les biomatériaux denses et poreux de HA et SiHA. Ces biomatériaux CHA orienteraient le génotype des ostéoclastes, pour équilibrer les deux mécanismes de synthèse et de résorption osseuse, pour le maintien de l'intégrité du remodelage osseux.

- Cette thèse a montré que le biomatériau HA dense est celui qui est résorbé le plus tardivement par les ostéoclastes comparé aux autres compositions chimiques et microstructures des biomatériaux.

- Ces travaux de thèse ont également montré que le biomatériau HA de microstructure poreuse, comparé aux autres compositions chimiques et microstructures de biomatériaux, est celui sur lequel les ostéoclastes sont les moins métaboliquement actifs et présentent moins d'activité enzymatique de la LDH.

Au final, les propriétés du biomatériau CHA (4,4% massique), indépendamment de sa microstructure, se sont révélées aptes à induire une réparation et une régénération osseuse supérieures à celles des autres biomatériaux SiHA et HA.

Les travaux de cette thèse ont prouvé que la substitution à 4,4% massique est favorable à l'équilibre entre synthèse et résorption osseuse. Pour un même taux de prolifération ostéoblastique, la tendance à la différenciation ostéoblastique est supérieure sur le biomatériau poreux CHA (activité enzymatique de l'ALP). Les matériaux CHA poreux sembleraient quelque peu supérieurs à la microstructure dense.

Par ailleurs, du point de vue procédé de fabrication, une microstructure poreuse est plus facile à obtenir qu'une microstructure dense pour les céramiques d'hydroxyapatite carbonatée. L'utilisation d'une température plus basse élimine le risque de décarbonatation lors du frittage sous flux de CO₂ et donc de création de phase secondaire.

Le biomatériau poreux CHA semble donc le plus prometteur des six variantes de biomatériaux testés.

En perspectives :

- l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses pour étudier la différenciation des cellules précurseurs en cellules osseuses sur ces matériaux, pourrait être envisagée. Plusieurs points de cinétique allant jusqu'à 3 semaines et un panel plus large de gènes codant pour des marqueurs de différenciation seraient pertinents pour étudier les propriétés de différenciation cellulaire des différents biomatériaux.

- L'un des principaux challenge en médecine régénérative osseuse repose sur l'équilibre entre synthèse et résorption du tissu osseux. Cette étape est une des clés

de la réussite. A ce titre, les propriétés de biorésorption du biomatériau sont primordiales, tout comme sa capacité à induire la formation osseuse. Les résultats de ces travaux de thèse, ont démontré que les biomatériaux agissent de façon inversement corrélée sur l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Etant donné que la régénération osseuse est basée sur l'action orchestrée de ces deux types cellulaires : ostéoblastes et ostéoclastes, des expérimentations en co-culture de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques pourraient s'avérer pertinentes pour une meilleure compréhension de l'influence des biomatériaux sur le comportement cellulaire.

- De même, des analyses au niveau moléculaire pour étudier l'expression de molécules impliquées dans des voies de signalisation de prolifération et de différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes, seraient aussi intéressantes à envisager, comme par exemple, l'étude de l'expression par les ostéoblastes des BMPs, qui présentent un intérêt clinique.

- L'étude préliminaire de l'expression du VEGF-A par les ostéoclastes, pouvant servir de marqueur du taux de résorption, telle que mentionnée dans cette thèse, mériterait également d'être approfondie pour une éventuelle application en diagnostic clinique.

- Des essais *in vivo* pourraient être réalisés avec ces différents biomatériaux.

Les biomatériaux pourraient être implantés dans de défauts osseux de tailles critiques réalisés chez des rats.

Concernant les biomatériaux, une substitution en ions silicates et carbonates avec des concentrations variées pourraient être intéressantes à évaluer pour une comparaison et une étude plus approfondie de l'effet de ces ions sur la réponse biologique. Des matériaux silico-carbonatés à différents teneurs en silicates et carbonates pourraient alors être synthétisés.

Références bibliographiques

A

Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21, 667–681.

B

Baino, F., and Vitale-Brovarone, C. (2011). Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: current trends and forecasts for the future. *J. Biomed. Mater. Res. A* 97, 514–535.

Balamurugan, A., Balossier, G., Kannan, S., Michel, J., Rebelo, A.H.S., and Ferreira, J.M.F. (2007). Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P2O5-SiO2-ZnO bioglass. *Acta Biomater.* 3, 255–262.

Barralet, J., Akao, M., Aoki, H., and Aoki, H. (2000). Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 176–182.

Barré, R. (2012). Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse : étude du rôle des récepteurs couplés aux protéines G lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes: intérêt de la voie Gi.

Barrère, F., van Blitterswijk, C.A., and de Groot, K. (2006). Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int. J. Nanomedicine* 1, 317–332.

Beck, G.R., Zerler, B., and Moran, E. (2001). Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation. *Cell Growth Differ.* 12, 61.

Bellia, J.P., Birchall, J.D., and Roberts, N.B. (1994). Beer: a dietary source of silicon. *Lancet Lond. Engl.* 343, 235.

Bernhardt, A., Lode, A., Peters, F., and Gelinsky, M. (2013). Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules - an in vitro study with osteoblast-like cells. *Clin. Oral Implants Res.* 24, 441–449.

Bidan, C.M., Kommareddy, K.P., Rumpler, M., Kollmannsberger, P., Bréchet, Y.J.M., Fratzl, P., and Dunlop, J.W.C. (2012). How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *PLoS One* 7, e36336.

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Ripamonti, A., Roveri, N., Romanello, M., Noris Suarez, K., and Moro, L. (1997). Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *J. Inorg. Biochem.* 68, 45–51.

Blair, H.C., Kahn, A.J., Crouch, E.C., Jeffrey, J.J., and Teitelbaum, S.L. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J. Cell Biol.* 102, 1164–1172.

Bohner, M. (2009). Silicon-substituted calcium phosphates - a critical view. *Biomaterials* 30, 6403–6406.

Bonel, G. (1972). Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites -1-synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées du type A. In *Annales de Chimie*, p.

Bose, S., Roy, M., and Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 30, 546–554.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.

Buckley, M.J., Banes, A.J., Levin, L.G., Sumpio, B.E., Sato, M., Jordan, R., Gilbert, J., Link, G.W., and Tran Son Tay, R. (1988). Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone Miner.* 4, 225–236.

C

Canalis, E., Centrella, M., Burch, W., and McCarthy, T.L. (1989). Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.* 83, 60–65.

Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., and Teti, A. (2014). The Great Beauty of the osteoclast. *Arch. Biochem. Biophys.* 558, 70–78.

Carlisle, E.M. (1970). Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 167, 279–280.

Carlisle, E.M. (1972). Silicon: an essential element for the chick. *Science* 178, 619–621.

Carlisle, E.M. (1980). Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J. Nutr.* 110, 1046–1056.

Carlisle, E.M. (1981). Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcif. Tissue Int.* 33, 27–34.

Chai, F., Raoul, G., Wiss, A., Ferri, J., and Hildebrand, H.F. (2011). Les biomatériaux de substitution osseuse : classification et intérêt. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* 112, 212–221.

Champion, E. (2013). Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* 9, 5855–5875.

Cheung, H.-Y., Lau, K.-T., Lu, T.-P., and Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos. Part B Eng.* 38, 291–300.

Coleman, R.A., Ramp, W.K., Toverud, S.U., and Hanker, J.S. (1976). Electron microscopic localization of lactate dehydrogenase in osteoclasts of chick embryo tibia. *Histochem. J.* 8, 543–558.

Couret, I. (2004). Biology of bone remodeling. *Med. Nucleaire* 28, 57–65.

Cowles, E.A., Brailey, L.L., and Gronowicz, G.A. (2000). Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* *52*, 725–737.

D

Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., and Missirlis, Y.F. (2000). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* *22*, 87–96.

Detsch, R., and Boccaccini, A.R. (2014). The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *9*, 1133–1149.

Detsch, R., Mayr, H., and Ziegler, G. (2008). Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater.* *4*, 139–148.

Detsch, R., Hagemeyer, D., Neumann, M., Schaefer, S., Vortkamp, A., Wuelling, M., Ziegler, G., and Epple, M. (2010). The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta Biomater.* *6*, 3223–3233.

Díaz-Rodríguez, P., Gómez-Amoza, J.L., and Landin, M. (2015). The synergistic effect of VEGF and biomorphic silicon carbides topography on in vivo angiogenesis and human bone marrow derived mesenchymal stem cell differentiation. *Biomed. Mater.* *10*, 045017.

Doi, Y., Shibutani, T., Moriwaki, Y., Kajimoto, T., and Iwayama, Y. (1998). Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* *39*, 603–610.

Dorozhkin, S.V. (2010a). Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. *J. Funct. Biomater.* *1*, 22–107.

Dorozhkin, S.V. (2010b). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* *31*, 1465–1485.

Drake, M.T., Srinivasan, B., Mödder, U.I., Ng, A.C., Undale, A.H., Roforth, M.M., Peterson, J.M., McCready, L.K., Riggs, B.L., and Khosla, S. (2011). Effects of Intermittent Parathyroid Hormone Treatment on Osteoprogenitor Cells in Postmenopausal Women. *Bone* *49*, 349–355.

E

Eisinger, J., and Clairet, D. (1993). Effects of silicon, fluoride, etidronate and magnesium on bone mineral density: a retrospective study. *Magnés. Res.* *6*, 247–249.

Elliott, J.C. (1994). Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates (Amsterdam [The Netherlands]: New York: Elsevier).

F

Fantozzi, G., Le Gallet, S., and Niepce, J.-C. (2009). Science et technologies céramiques (Les Ulis: EDP Sciences).

Friederichs, R.J., Brooks, R.A., Ueda, M., and Best, S.M. (2015). In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. A* *103*, 3312–3322.

G

Gerber, H.-P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* *5*, 623–628.

Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., and Marsh, D. (2007). Fracture healing: the diamond concept. *Injury* *38 Suppl 4*, S3-6.

Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., Schmidmaier, G., and Marsh, D. (2008). The diamond concept--open questions. *Injury* *39 Suppl 2*, S5-8.

Giannoudis, P.V., Chris Arts, J.J., Schmidmaier, G., and Larsson, S. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? *Injury* *42, Supplement 2*, S1–S2.

Gibson, I.R., Best, S.M., and Bonfield, W. (1999). Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* *44*, 422–428.

Giljean, S., Bigerelle, M., and Anselme, K. (2014). Roughness statistical influence on cell adhesion using profilometry and multiscale analysis. *Scanning* *36*, 2–10.

Goriainov, V., Cook, R., M. Latham, J., G. Dunlop, D., and Oreffo, R.O.C. (2014). Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals. *Acta Biomater.*

Grzesik, W.J., and Robey, P.G. (1994). Bone matrix RGD glycoproteins: Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* *9*, 487–496.

Gupta, G., Kirakodu, S., and El-Ghannam, A. (2010). Effects of exogenous phosphorus and silicon on osteoblast differentiation at the interface with bioactive ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. A* *95*, 882–890.

H

HaDuong, J.H., Blavier, L., Baniwal, S.K., Frenkel, B., Malvar, J., Punj, V., Sposto, R., and DeClerck, Y.A. (2015). Interaction between bone marrow stromal cells and neuroblastoma cells leads to a VEGFA-mediated osteoblastogenesis. *Int. J. Cancer* *137*, 797–809.

Halleen, J., Hentunen, T.A., Hellman, J., and Väänänen, H.K. (1996). Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: Purification and development of an immunoassay. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 1444–1452.

Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J., and Väänänen, H.K. (2000). Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: A Novel Serum Marker of Bone Resorption. *J. Bone Miner. Res.* *15*, 1337–1345.

Hasegawa, M., Doi, Y., and Uchida, A. (2003). Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J. Bone Joint Surg. Br.* *85-B*, 142–147.

Hayman, A.R., and Cox, T.M. (2003). Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Knockout Mice. *J. Bone Miner. Res.* *18*, 1905–1907.

Hayman, A.R., Bune, A.J., and Cox, T.M. (2000). Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo. *J. Anat.* *196*, 433–441.

Hayman, A.R., Macary, P., Lehner, P.J., and Cox, T.M. (2001). Tartrate-resistant Acid Phosphatase (Acp 5): Identification in Diverse Human Tissues and Dendritic Cells. *J. Histochem. Cytochem.* *49*, 675–683.

Hench, L.L. (1998). Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* *81*, 1705–1728.

Hench, L.L., and Polak, J.M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science* *295*, 1014–1017.

Henstock, J.R., Canham, L.T., and Anderson, S.I. (2015). Silicon: The evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomater.* *11*, 17–26.

Hing, K.A., Revell, P.A., Smith, N., and Buckland, T. (2006). Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* *27*, 5014–5026.

Hoppe, A., Güldal, N.S., and Boccaccini, A.R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* *32*, 2757–2774.

Hu, K., and Olsen, B.R. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J. Clin. Invest.* *126*, 509–526.

Huang, H., Ma, L., and Kyrkanides, S. (2016). Effects of vascular endothelial growth factor on osteoblasts and osteoclasts. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* *149*, 366–373.

J

Janckila, A.J., Takahashi, K., Sun, S.Z., and Yam, L.T. (2001). Tartrate-resistant Acid Phosphatase Isoform 5b as Serum Marker for Osteoclastic Activity. *Clin. Chem.* *47*, 74–80.

Janicki, P., and Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* *42*, Supplement 2, S77–S81.

Jell, G., and Stevens, M.M. (2006). Gene activation by bioactive glasses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *17*, 997–1002.

Jugdaohsingh, R. (2007). silicon and bone health. *J. Nutr. Health Aging* *11*, 99–110.

Jugdaohsingh, R., Anderson, S.H., Tucker, K.L., Elliott, H., Kiel, D.P., Thompson, R.P., and Powell, J.J. (2002). Dietary silicon intake and absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* *75*, 887–893.

Jugdaohsingh, R., Tucker, K.L., Qiao, N., Cupples, L.A., Kiel, D.P., and Powell, J.J. (2004). Dietary Silicon Intake Is Positively Associated With Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. *J. Bone Miner. Res.* *19*, 297–307.

K

Kalia, P., Brooks, R.A., Kinrade, S.D., Morgan, D.J., Brown, A.P., Rushton, N., and Jugdaohsingh, R. (2016). Adsorption of Amorphous Silica Nanoparticles onto Hydroxyapatite Surfaces Differentially Alters Surface Properties and Adhesion of Human Osteoblast Cells. *PLoS ONE* *11*.

Kanayama, K., Sriarj, W., Shimokawa, H., Ohya, K., Doi, Y., and Shibutani, T. (2011). Osteoclast and Osteoblast Activities on Carbonate Apatite Plates in Cell Cultures. *J. Biomater. Appl.* *26*, 435–449.

Kang, Q., Sun, M.H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A.G., Deyrup, A.T., Jiang, W., Luu, H.H., Luo, J., Szatkowski, J.P., et al. (2004). Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* *11*, 1312–1320.

Karageorgiou, V., and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* *26*, 5474–5491.

Kim, H.-R., Kim, K.-W., Kim, B.-M., Cho, M.-L., and Lee, S.-H. (2015). The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* *10*.

Kirstein, B., Chambers, T.J., and Fuller, K. (2006). Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J. Cell. Biochem.* *98*, 1085–1094.

Kobayashi, T., Itoh, S., Nakamura, S., Nakamura, M., Shinomiya, K., and Yamashita, K. (2007). Enhanced bone bonding of hydroxyapatite-coated titanium implants by electrical polarization. *J. Biomed. Mater. Res. A* *82*, 145–151.

Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* *437*, 169–183.

Koike, M., Shimokawa, H., Kanno, Z., Ohya, K., and Soma, K. (2005). Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J. Bone Miner. Metab.* *23*, 219–225.

Kreja, L., Brenner, R.E., Tautzenberger, A., Liedert, A., Friemert, B., Ehrnthaller, C., Huber-Lang, M., and Ignatius, A. (2010). Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* *109*, 347–355.

Kuboki, Y., and Takita, H. (2003). [Bone morphogenetic protein (s) (BMP): structure and new functions]. *Clin. Calcium* 13, 467–471.

L

Łaczka-Osyczka, A., Łaczka, M., Kasugai, S., and Ohya, K. (1998). Behavior of bone marrow cells cultured on three different coatings of gel-derived bioactive glass–ceramics at early stages of cell differentiation. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 433–442.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lafon, J.-P. (2004). Thèse de doctorat de l'Université de Limoges : synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatite carbonatées.

Lafon, J.P., Champion, E., and Bernache-Assollant, D. (2008). Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition. *J. Eur. Ceram. Soc.* 28, 139–147.

Langstaff, S., Sayer, M., Smith, T.J.N., Pugh, S.M., Hesp, S.A.M., and Thompson, W.T. (1999). Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials* 20, 1727–1741.

LeGeros, R.Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin. Orthop.* 81–98.

LeGeros, R.Z. (2008). Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.* 108, 4742–4753.

Lemée, J.-M., Petit, D., Spingard, M., and Menei, P. (2013). Autologous bone flap versus hydroxyapatite prosthesis in first intention in secondary cranioplasty after decompressive craniectomy: A French medico-economical study. *Neurochirurgie* 59, 60–63.

Lerner, U.H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 19, 107–120.

Li, F., Sun, X., Zhao, B., Ma, J., Zhang, Y., Li, S., Li, Y., and Ma, X. (2015). Effects of cyclic tension stress on the apoptosis of osteoclasts in *in vitro*. *Exp. Ther. Med.*

Lichte, P., Pape, H.C., Pufe, T., Kobbe, P., and Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury* 42, 569–573.

Liu, Y., and Olsen, B.R. (2014). Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 62, 363–368.

M

Manolagas, S.C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis ¹. *Endocr. Rev.* 21, 115–137.

Marchat, D., Zymelka, M., Coelho, C., Gremillard, L., Joly-Pottuz, L., Babonneau, F., Esnouf, C., Chevalier, J., and Bernache-Assollant, D. (2013). Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomater.* 9, 6992–7004.

Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Sciences* 17, 1252–1259.

Marie, P.J. (2010). The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 46, 571–576.

Matsuo, K., and Irie, N. (2008). Osteoclast–osteoblast communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 201–209.

Merry, J.C., Gibson, I.R., Best, S.M., and Bonfield, W. (1998). Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9, 779–783.

Miyajima, K. (1990). [Effects of periodic tension on osteoblast-like cells for cell differentiation and alkaline phosphatase activity]. *Nihon Kyōsei Shika Gakkai Zasshi J. Jpn. Orthod. Soc.* 49, 226–236.

Mladenović, Ž., Johansson, A., Willman, B., Shahabi, K., Björn, E., and Ransjö, M. (2014). Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta Biomater.* 10, 406–418.

Monchau, F., Lefèvre, A., Descamps, M., Belquin-myrdycz, A., Laffargue, P., and Hildebrand, H.F. (2002). In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomol. Eng.* 19, 143–152.

Moonga, B.S., Moss, D.W., Patchell, A., and Zaidi, M. (1990). Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J. Physiol.* 429, 29–45.

Morse, S.M.J., Shaw, G., and Lerner, S.F. (2006). Concurrent mRNA and protein extraction from the same experimental sample using a commercially available column-based RNA preparation kit. *BioTechniques* 40, 54, 56, 58.

N

Nielsen, R.H., Karsdal, M.A., Sørensen, M.G., Dziegiel, M.H., and Henriksen, K. (2007). Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 834–839.

O

Oki, A., Parveen, B., Hossain, S., Adeniji, S., and Donahue, H. (2004). Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* 69, 216–221.

Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W. (2000). Bone development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 191–220.

Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., and Gower, L.B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 58, 77–116.

Orly, I., Gregoire, M., Menanteau, J., Heughebaert, M., and Kerebel, B. (1989). Chemical changes in hydroxyapatite biomaterial underin vivo andin vitro biological conditions. *Calcif. Tissue Int.* 45, 20–26.

Osdoby, P., Martini, M.C., and Caplan, A.I. (1982). Isolated osteoclasts and their presumed progenitor cells, the monocyte, in culture. *J. Exp. Zool.* 224, 331–344.

Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 143, 420–430.

Ozdemir, T., Higgins, A.M., and Brown, J.L. (2013). Osteoinductive biomaterial geometries for bone regenerative engineering. *Curr. Pharm. Des.* 19, 3446–3455.

P

Palard, M., Champion, E., and Foucaud, S. (2008). Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$. *J. Solid State Chem.* 181, 1950–1960.

Palard, M., Combes, J., Champion, E., Foucaud, S., Rattner, A., and Bernache-Assollant, D. (2009). Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ceramics. *Acta Biomater.* 5, 1223–1232.

Pandis, C., Trujillo, S., Matos, J., Madeira, S., Ródenas-Rochina, J., Kriptomou, S., Kyritsis, A., Mano, J.F., and Gómez Ribelles, J.L. (2015). Porous polylactic acid-silica hybrids: preparation, characterization, and study of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Macromol. Biosci.* 15, 262–274.

Pellenc, D., Giraudier, S., Champion, E., Anselme, K., Larreta-Garde, V., and Gallet, O. (2006). Removal of surface by-products from sintered hydroxyapatite: Effect of a chelation treatment on fibronectin adsorption and cell adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 76B, 136–142.

Pfeilschifter, J., Laukhuf, F., Müller-Beckmann, B., Blum, W.F., Pfister, T., and Ziegler, R. (1995). Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J. Clin. Invest.* 96, 767–774.

Porter, A.E., Patel, N., Skepper, J.N., Best, S.M., and Bonfield, W. (2003). Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials* 24, 4609–4620.

Porter, J.R., Ruckh, T.T., and Popat, K.C. (2009). Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* 25, 1539–1560.

R

Rahman, M.S., Akhtar, N., Jamil, H.M., Banik, R.S., and Asaduzzaman, S.M. (2015). TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* *3*, 15005.

Raisz, L.G. (1999). Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clin. Chem.* *45*, 1353–1358.

Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., and Thomas, P. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* *23*, 1065–1072.

Redey, S.A., Razzouk, S., Rey, C., Bernache-Assollant, D., Leroy, G., Nardin, M., and Cournot, G. (1999). Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J. Biomed. Mater. Res.* *45*, 140–147.

Reffitt, D.M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H.F.J., Evans, B.A.J., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., and Hampson, G.N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* *32*, 127–135.

Rey, C., Combes, C., Drouet, C., and Grossin, D. (2011). 1.111 - Bioactive Ceramics: Physical Chemistry A2 - Ducheyne, Paul. In *Comprehensive Biomaterials*, (Oxford: Elsevier), pp. 187–221.

Rodan, G.A., and Martin, T.J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* *33*, 349–351.

Rosset, P., Deschaseaux, F., and Layrolle, P. (2014). Cell therapy for bone repair. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* *100*, S107–S112.

Rouahi, M., Champion, E., Hardouin, P., and Anselme, K. (2006a). Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* *27*, 2829–2844.

Rouahi, M., Gallet, O., Champion, E., Dentzer, J., Hardouin, P., and Anselme, K. (2006b). Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J. Biomed. Mater. Res. A* *78A*, 222–235.

Rousselle, A.-V., and Heymann, D. (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* *30*, 533–540.

S

Saboori, A., Sheikhi, M., Moztafzadeh, F., Rabiee, M., Hesaraki, S., Tahriri, M., and Nezafati, N. (2009). RETRACTED: Sol–gel preparation, characterisation and in vitro bioactivity of Mg containing bioactive glass. *Adv. Appl. Ceram.* *108*, 155–161.

Schröder, H.C., Wang, X.H., Wiens, M., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schloßmacher, U., and Müller, W.E.G. (2012). Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): inhibition of osteoclast growth and differentiation. *J. Cell. Biochem.* *113*, 3197–3206.

Schütze, N., Oursler, M.J., Nolan, J., Riggs, B.L., and Spelsberg, T.C. (1995). Zeolite a inhibits osteoclast-mediated bone resorption in vitro. *J. Cell. Biochem.* *58*, 39–46.

Schwarz, K. (1973). A Bound Form of Silicon in Glycosaminoglycans and Polyuronides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 1608–1612.

Schwarz, K., and Milne, D.B. (1972). Growth-promoting Effects of Silicon in Rats. *Nature* *239*, 333–334.

Seeman, E., and Delmas, P.D. (2006). Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2250–2261.

Shah Mohammadi, M., Chicatun, F., Stähli, C., Muja, N., Bureau, M.N., and Nazhat, S.N. (2014). Osteoblastic differentiation under controlled bioactive ion release by silica and titania doped sodium-free calcium phosphate-based glass. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *121*, 82–91.

Shi, C., Huang, P., Kang, H., Hu, B., Qi, J., Jiang, M., Zhou, H., Guo, L., and Deng, L. (2015). Glucocorticoid inhibits cell proliferation in differentiating osteoblasts by microRNA-199a targeting of WNT signaling. *J. Mol. Endocrinol.* *54*, 325–337.

Signs, S.A., Bajpai, P.K., and Pantano, C.G. (1979). In Vitro Dissolution of Synthos Ceramics in an Acellular Physiological Environment. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* *7*, 183–190.

Spence, G., Patel, N., Brooks, R., and Rushton, N. (2009). Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response. *J. Biomed. Mater. Res. A* *90*, 217–224.

Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Elliott, H., Walker, C., Mehta, P., Shoukru, S., Thompson, R.P.H., and Powell, J.J. (2004). The silicon content of beer and its bioavailability in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* *91*, 403–409.

Stefini, R., Esposito, G., Zanotti, B., Iaccarino, C., Fontanella, M.M., and Servadei, F. (2013). Use of “custom made” porous hydroxyapatite implants for cranioplasty: postoperative analysis of complications in 1549 patients. *Surg. Neurol. Int.* *4*, 12.

Stevens, M.M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Today* *11*, 18–25.

Strain, A.J., and Neuberger, J.M. (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science* *295*, 1005–1009.

T

Tadic, D., Peters, F., and Epple, M. (2002). Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials* *23*, 2553–2559.

Takahashi, Y., and Tabata, Y. (2004). Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* *15*, 41–57.

Tarride, J.-E., Hopkins, R.B., Leslie, W.D., Morin, S., Adachi, J.D., Papaioannou, A., Bessette, L., Brown, J.P., and Goeree, R. (2012). The burden of illness of osteoporosis in Canada. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 23, 2591–2600.

Trebec, D.P., Chandra, D., Gramoun, A., Li, K., Heersche, J.N.M., and Manolson, M.F. (2007). Increased expression of activating factors in large osteoclasts could explain their excessive activity in osteolytic diseases. *J. Cell. Biochem.* 101, 205–220.

Trebec-Reynolds, D.P., Voronov, I., Heersche, J.N.M., and Manolson, M.F. (2010). VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF- κ B induction of HIF-1 α . *J. Cell. Biochem.* 110, 343–351.

V

Väänänen, H.K., and Laitala-Leinonen, T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 132–138.

Väänänen, H.K., Liu, Y., Lehenkari, P., and Uemara, T. (1998). How do osteoclasts resorb bone? *Mater. Sci. Eng. C* 6, 205–209.

Viale-Bouroncle, S., Gosau, M., and Morsczech, C. (2014). Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via independent activations of FAK and ERK signalling pathways. *Arch. Oral Biol.* 59, 1249–1255.

W

Wan, M., and Cao, X. (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 651–657.

Weiner, S., and Price, P.A. (1986). Disaggregation of bone into crystals. *Calcif. Tissue Int.* 39, 365–375.

Witte, F., Ulrich, H., Palm, C., and Willbold, E. (2007). Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 81, 757–765.

Y

Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.M., and Daculsi, G. (1997). Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 18, 1037–1041.

Z

Zaidi, M., Datta, H.K., Patchell, A., Moonga, B., and MacIntyre, I. (1989). “Calcium-activated” intracellular calcium elevation: A novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1461–1465.

Zaidi, M., Adebajo, O.A., Moonga, B.S., Sun, L., and Huang, C.L.-H. (1999). Emerging Insights into the Role of Calcium Ions in Osteoclast Regulation. *J. Bone Miner. Res.* 14, 669–674.

Zallone, A.Z., Teti, A., and Primavera, M.V. Isolated osteoclasts in primary culture: first observations on structure and survival in culture media. *Anat. Embryol. (Berl.)* 165, 405–413.

Zhang, Q., Guo, R., Lu, Y., Zhao, L., Zhou, Q., Schwarz, E.M., Huang, J., Chen, D., Jin, Z.-G., Boyce, B.F., et al. (2008). VEGF-C, a Lymphatic Growth Factor, Is a RANKL Target Gene in Osteoclasts That Enhances Osteoclastic Bone Resorption through an Autocrine Mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 13491–13499.

Zhang, Y., Cai, Y., Wang, Q., Zhao, Y., Monchau, F., Lefevre, A., and Hildebrand, H.F. (2005). [Biodegradation of synthetic bioglasses with different crystallinity in vitro]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi J. Biomed. Eng. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 22, 990–994.

Zocca, A., Elsayed, H., Bernardo, E., Gomes, C.M., Lopez-Heredia, M.A., Knabe, C., Colombo, P., and Günster, J. (2015). 3D-printed silicate porous bioceramics using a non-sacrificial preceramic polymer binder. *Biofabrication* 7, 025008.

Zreiqat, H., Evans, P., and Howlett, C.R. (1999). Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 389–396.

Référence du site internet :

ISO 13779-3:2008 - Implants for surgery -- Hydroxyapatite -- Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity.

Annexes

Annexe 1. Les caractéristiques requises d'un implant	266
Annexe 2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de transplantations.....	267
Annexe 3. Exemples de biomatériaux commercialisés, selon LeGeros, 2008 ; Dorozhkin, 2010a ; Baino and Vitale-Brovarone, 2011	268
Annexe 4. Classification, définition et caractéristiques des matériaux selon Gilbert Fantozzi <i>et al.</i>.....	269
Annexe 5. Classification des matériaux utilisés en ingénierie tissulaire	270
Annexe 6. Les différentes catégories de substituts osseux selon Chai et al (Chai et al., 2011)	271
Annexe 7. Table des corrélations obtenues pour les caractérisations des biomatériaux	272
Annexe 8. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse des caractérisations des biomatériaux	273
Annexe 9. Table des corrélations obtenues pour l'analyse biologique des MC3T3-E1	274
Annexe 10. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse biologique des MC3T3-E1	275
Annexe 11. Table des corrélations obtenues pour l'analyse biologique des RAW 264.7.....	276
Annexe 12. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse biologique des RAW 264.7.....	277

Annexe 13. Table des corrélations obtenues pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des MC3T3-E1 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques	278
Annexe 14. Courbe de décroissance obtenue pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des MC3T3-E1 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques	279
Annexe 15. Table des corrélations obtenues pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des RAW 264.7 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques	280
Annexe 16. Courbe de décroissance obtenue pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des RAW 264.7 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques	281

Annexe 1. Les caractéristiques requises d'un implant

Caractéristiques	Définitions
Ostéoinduction	<ul style="list-style-type: none"> -capacité à promouvoir la différenciation de cellules progénitrices venant d'une lignée ostéoblastique (Stevens, 2008) -capacité du matériau à stimuler la différenciation des cellules locales ou ajoutées dans l'environnement en ostéoblastes et donc à augmenter la réparation osseuse (Lichte et al., 2011) -induction de la formation de nouveau tissu osseux grâce à l'action de voies de signalisation moléculaire et au recrutement de cellules progénitrices (Bose et al., 2012). -Capacité du matériaux à induire une formation osseuse sans la présence de facteurs ostéogéniques (LeGeros,2008) -Cette propriété est habituellement démontrée par la formation de tissu osseux induit par le matériau dans des sites non osseux (en sous- cutané ou en intramusculaire) (LeGeros,2008) -les agents ostéo-inducteurs sont en général des protéines stimulant la prolifération et/ou la différenciation de cellules souches en cellules ostéogénitrices (Chai et al., 2011)
Ostéoconduction	<ul style="list-style-type: none"> -supporte la croissance osseuse, et encourage la croissance du tissu osseux environnant (Stevens, 2008) -sert de support pour la nouvelle formation osseuse (Dorozhkin, 2010b) -permet aux cellules d'adhérer, de proliférer et de former une matrice extracellulaire à la surface et dans les pores de l'implant (Bose et al., 2012). -agit comme un support pour permettre la synthèse d'os à leur surface de l'implant (Lichte et al., 2011) - processus utilisant un treillis microscopique et macroscopique afin de générer la migration de cellules impliquées dans la formation osseuse (cellules mésenchymateuses, ostéoblastes, ostéoclastes...)(Chai et al., 2011)
Ostéointégration	<ul style="list-style-type: none"> -intégration dans l'os environnant (Stevens, 2008) -interaction avec le tissu osseux sans produire de tissu fibreux (Stefini et al., 2013) -liaison physicochimique intime entre l'os et l'implant (Dorozhkin, 2010b)
Biorésorbabilité et Biodégradabilité	<p>La résorption est un processus cellulaire actif par les ostéoclastes avec néoformation consécutive de l'os, tandis que la dégradation est un procédé chimique qui se produit dans un environnement humide (Lichte et al., 2011). La dégradation des produits chimiques s'effectue selon deux modes différents :</p> <p>(1) dégradation hydrolytique ou hydrolyse qui est médiée tout simplement par de l'eau (2) la dégradation enzymatique, qui est principalement médiée par des agents biologiques tels que des enzymes.</p> <p>Selon (Cheung et al., 2007) il existe une différence entre matériaux polymères biodégradables et biorésorbables, -les matériaux biodégradables, peuvent se décomposer naturellement, mais les produits dégradés restent à l'intérieur du corps humain.</p> <ul style="list-style-type: none"> -les matériaux biorésorbables, se dégradent après une certaine période de temps et les produits non-toxiques sont éliminés au cours du temps par le métabolisme. -<i>In-vitro</i>, la biodégradabilité d'un matériau à base de calcium peut se réaliser en mesurant au cours du temps, la libération de calcium par le matériau plongé dans une solution acide. La solution acide mime les conditions environnementales durant l'activité ostéoclastique (LeGeros, 2008). D'autres solutions peuvent également être utilisées (Tris, Simulated body fluid, milieu de culture...). Le terme dissolution est aussi employé.
Biocompatibilité	<ul style="list-style-type: none"> -absence de réponse immunitaire chez l'hôte ou de toxicité locale ou systémique (Stefini et al., 2013) -capacité du matériau à réaliser, lors d'une application spécifique, une réponse appropriée de l'hôte (Dorozhkin, 2010b) -capacité de l'implant à favoriser l'activité cellulaire normale incluant des voies de signalisation moléculaire sans effet toxique local ou systémique pour l'hôte (Bose et al., 2012). -assure la sécurité du matériau pour des utilisations chez l'humain. Ce dernier ne doit pas induire de réponses inflammatoires ni de toxicité. Les sous-produits libérés lors de la dégradation du matériau doivent être inoffensifs pour l'organisme (Cheung et al., 2007)
Bioactivité	<ul style="list-style-type: none"> -propriété du matériau à développer une liaison directe, solide et adhérente avec l'os (Dorozhkin, 2010b) -un matériau bioactif provoque une réponse biologique spécifique à son interface avec le tissu environnant résultant de la formation d'une liaison entre le matériau et le tissu (Hench, 1998) -<i>In-vitro</i>, la bioactivité se mesure en immergeant les matériaux dans une solution SBF (<i>Simulated body fluid</i>) qui possède une composition en électrolyte similaire à celle du sérum (LeGeros, 2008) pour produire à sa surface une couche d'apatite carbonatée .
Favoriser l'angiogenèse	<ul style="list-style-type: none"> -formation de vaisseaux sanguins autour de l'implant dans les quelques semaines suivant l'implantation pour assurer le transport des nutriments, de l'oxygène et l'évacuation des déchets au sein du site implanté (Olszta et al., 2007).

Annexe 2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de transplantations

Type de transplantation	Avantages	Inconvénients
<p>Autogreffe</p> <p><i>prélevée sur un site non sujet à des contraintes mécaniques et facile d'accès (en général la crête iliaque) pour être transplanté dans un autre site endommagé (stevens 2008, baino 2010)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -considéré comme le traitement de référence (Baino and Vitale-Brovarone, 2011 ; Lichte et al., 2011 ; Stefini et al., 2013) -elle engendre les meilleurs résultats cliniques -son intégration est efficace et fiable dans le tissu hôte environnant - elle est bien tolérée, car il n'y a pas de complication due aux réponses immunitaires de l'hôte (Stevens, 2008). -elles sont ostéogéniques : ces greffons contiennent en leur sein des cellules vivantes qui peuvent se différencier en ostéoblastes (Lichte et al., 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> - éventuelle perte de matière en raison de contamination bactérienne au cours de la culture (Lemée et al., 2013) -réserve et stock peu abondant car le prélèvement et la disponibilité sont limités -nécessite un second site opératoire qui peut être suivi de la résorption du tissu osseux environnant (Baino and Vitale-Brovarone, 2011) -morbidity au niveau du site opératoire de prélèvement (25%) (Ozdemir et al., 2013) - un taux de complication de plus de 30% est observé avec cette méthode (Lichte et al., 2011) - risque d'infection, d'hématome, d'hospitalisation prolongée - propriétés mécaniques différentes entre la greffe autologue et le tissu osseux environnant l'implant (Baino and Vitale-Brovarone, 2011).
<p>Allogreffe</p> <p><i>Os provenant d'un cadavre humain ou d'un donneur autre que le receveur (baino et al 2010)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -plus abondant car plus facilement procurable 	<ul style="list-style-type: none"> -ne sont plus utilisés en cranioplastie en raison du haut risque d'infection (Lemée et al., 2013) -risque de transmissions de maladies virales -HIV : 1/1 500 000 des cas, - hépatite B : 1/100 000 des cas - hépatite C : 1/60 000 des cas (Ozdemir et al., 2013) -induction d'une réponse inflammatoire nécessitant l'administration d'anti-inflammatoires (Baino and Vitale-Brovarone, 2011) - risque de pénurie des stocks -utilisation limitée pour des raisons éthiques ou religieuses (Baino and Vitale-Brovarone, 2011)
<p>Xéno greffe</p> <p><i>Os provenant d'un animal (en général du bœuf)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -meilleure gestion des stocks -plus facilement disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> -ne sont plus utilisés en raison du haut risque infectieux (Lemée et al., 2013)

Annexe 3. Exemples de biomatériaux commercialisés, selon LeGeros, 2008 ; Dorozhkin, 2010a ; Baino and Vitale-Brovarone, 2011

<u>BIOMATERIAUX</u>	<u>NOM COMMERCIAL ET NOM DU PRODUCTEUR</u>
CDHA Calcium-déficient hydroxyapatite	Cementek (Teknimed, France) Osteogen (Impladent, New-York, USA)
HA Hydroxyapatite	Apaceram (Pentax Corp, Japon), Calcitite (Zimmer, USA) Bonofil (Mitsubishi Material Corp, Japon), Bonetite (Mitsubishi Material Corp, Japon), Boneceram (Sumitomo Osaka Cement Co, Japon), Ostegraf (Ceramed, USA), Cerapatite (Seraver, France) Synatite ((SBM, France), Ostim (Heraeus Kulzer, Allemagne), Bioroc (Depuy-Bioland, France)
HA/Polyéthylène	HAPEX (Gyrus, USA)
HA/ CaSO₄	Hapset (LifeCore, USA)
Corail HA	Interpore, ProOsteon (Interpore, USA)
Algue HA	Algipore (Dentsply Friadent, Allemagne)
Apatite d'os de bœuf (non frittée)	Tutoplast (IOP, USA), Lubbock (Ost-Development, France) Laddec (Ost-Development, France), Oxbone (Bioland biomateriaux, France), BioOss (Geitslich, Suisse)
Apatite d'os de bœuf (frittée)	Endobon (Merck, Allemagne), PepGen P-15(Dentsply Friadent, Allemagne), Cerabon (aap Implantate (Allemagne), Osteograft (Ceramed, USA)
β TCP	Bioresorb (Sybron Implant Solutions, Allemagne), Biosorb (SBM SA, France), Calciresorb (Ceraver, France), ChronOS (Synthes, USA), Ceros (Thommen Medical, Suisse), Cerasorb (Curasan, Allemagne), Conduit (DePuy-Spine, USA), JAX (Smith and Nephew Orthopaedics, USA), Graftys BCP (Graftys, France), Osferion (Olympus Terumo Biomaterials, Japon)
BCP (HA+ β TCP)	MBCP (Biomatlante, France), Triosite (Zimmer, USA) Ceraform (Teknimed, France), Biosel (Depuy Bioland, France) TCH (Kasios, France), Calciresorb (Ceraver, France), Osteosynt (Einco, Brésil), 4Bone (MIS, Israël), Kainos (Signus, Allemagne), SBS (Expanscience, France), Eurocer (FH Orthopaedics, France), OptiMX (Exactech, USA), BCP (Medtronic, USA), Hatric (Arthrex, Naples, USA), Tribone (Stryker, Europe)
BCP (HA+ α TCP)	Skelite (Millennium Biologix, Canada)
BCP/Collagène	Allograft (Zimmer, USA)
BCP/Fibrine	TricOS (Baxter Biosciences, France)
BCP/Silicium	FlexHA (Xomed, USA)
Apatite carbonatée (CHA) / collagène	Healos (Orquest, USA)
bioverres	Perioglass, NovaBone (USA)

Annexe 4. Classification, définition et caractéristiques des matériaux selon Gilbert Fantozzi *et al*

Matériaux	Définition	Exemples	Propriétés physiques et chimiques
métaux	Corps simple	Fer, aluminium, cuivre	-éclat particulier (éclat métallique)
alliages métalliques	Mélange de deux ou plusieurs éléments métalliques ou d'un élément métallique avec un élément non métallique	acier (alliage fer-carbone)	-masse volumique élevée -grande résistance mécanique -aptitude à la déformation plastique (ténacité élevée) -grande rigidité -bon conducteur de la chaleur et de l'électricité -état d'oxydation positive
polymères	Matériaux constitués d'unités fondamentales : les monomères (radicaux organiques qui forment par polymérisation ou condensation des structures macromoléculaires linéaires, ramifiées ou pontées.	-polymères naturels : (cheveux, laine, soie, coton, cellulose) -polymères artificiels : polymère naturel ayant subi des modifications chimiques -polymères de synthèse : polystyrène, polyéthylène ...	-léger -facile à mettre en forme -faible rigidité -comportement viscoélastique -incapacité à supporter des températures supérieures à 200°C -isolants thermiques et électriques
céramiques	Solides inorganiques non métalliques		-les liaisons interatomiques sont fortes de type ionocovalente -pour certains matériaux, ce sont des liaisons faibles de type van der Waals -température de fusion très élevée -grande inertie -peu sujet à la dégradation par corrosion. -comportement fragile (absence de plasticité) -dureté et rigidité élevées -faible résistance à la traction -bonne résistance à la compression. -isolants thermiques -isolants électriques
	Les céramiques traditionnelles (essentiellement à base de silicium)	argile, terres cuites (briques, tuiles) carrelage, sanitaire vaisselle (grès, faïence, porcelaine) réfractaires, prothèses dentaire...	
	Les céramiques techniques (essentiellement à base de produits céramiques nouveaux et à usage industriel, ils ont été développés après la seconde guerre mondiale)	Céramiques structurales (céramiques pour applications mécaniques ou thermomécaniques, biocéramiques) Céramiques fonctionnelles (céramiques utilisées en électronique ou électrotechnique, céramiques nucléaires)	

Annexe 5. Classification des matériaux utilisés en ingénierie tissulaire

Matériaux/exemples		intérêts	désavantages
Matériaux inorganiques			
Biocéramiques	Bioverres		structure non cristalline : plus fragile que la céramique de calcium phosphate
	Phosphate de calcium		résistance mécanique inférieure à celle de l'os naturel. Incapacité à substituer un large déficit osseux.
	HA Hydroxyapatite	TCP Phosphate tricalcique	
	BCP Phosphate biphasique (HA+TCP)		
	Zircone (Zr), Aluminium (Al)		résistance mécanique et à l'usure d'où une longue durée de vie pour les prothèses articulaires
Métaux	Acier inoxydable Titane (Ti), Tantale (Ta) alliage de Cobalt/Chrome (Co /Cr)		Résistance et stabilité mécanique Le métal ne s'intègre pas dans le tissu osseux déjà existant : pas de stabilité mécanique entre l'implant et l'os (Kobayashi et al., 2007)
Matériaux organiques			
Polymères	Polymères biologiques : collagène, acide hyaluronique, chitosane, soie, fibrine, alginate, agarose		information biologique innée (Stevens, 2008) risque immunologique, peu abondant : produit rare se manipule difficilement faible propriétés mécaniques (Stevens, 2008)
	Polymères synthétiques : acide polylactique (PLA), acide polyglycolique (PGA), copolymères de PLA+PGA hydrogel polycaprolactone (PCL), poly propylène fumarate (PPF) polyméthylméthacrylate (PMMA) polyéthylène glycol (PEG). (Stevens, 2008)		Plus abondant car peut être synthétisé par de multiples procédés. L'hydrogel administration non invasive Prend forme in situ une fois administré dans l'organisme Viscoélastique Facile à fonctionnaliser, encapsulation cellulaire et de médicament
Matériaux composites			
Céramique et polymère Bioverre et céramique	HA/ collagène Polyéthylène/HA Bioverre/HA	Les composés inorganiques basiques neutralisent l'acidité des polymères. La dureté des composés organiques est associée à l'élasticité des composants organiques polymères.	résistance mécanique inférieure à celle de l'os.

Annexe 6. Les différentes catégories de substituts osseux selon Chai et al (Chai et al., 2011)

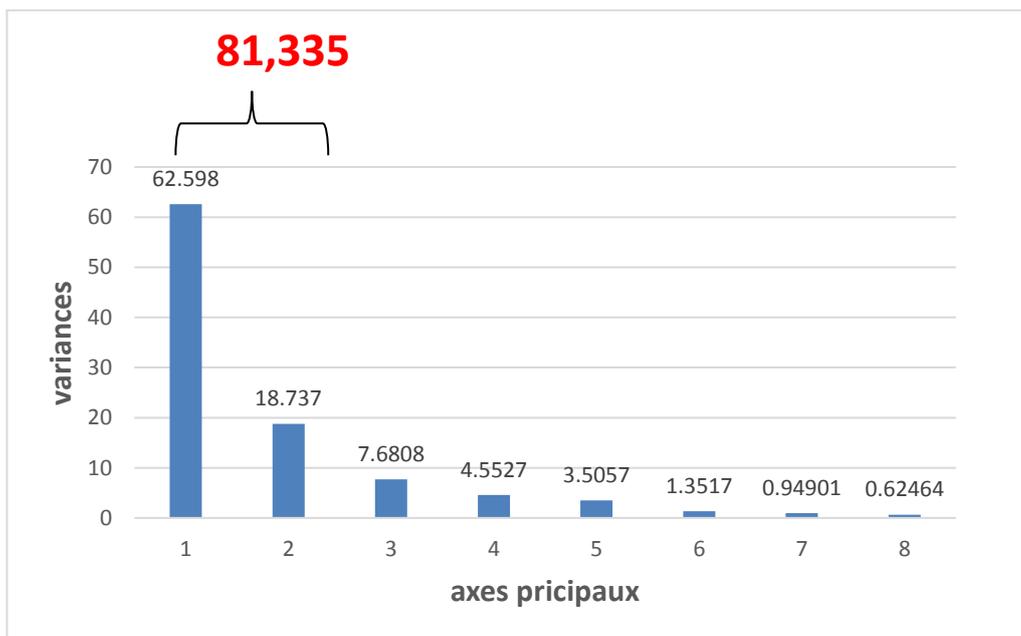
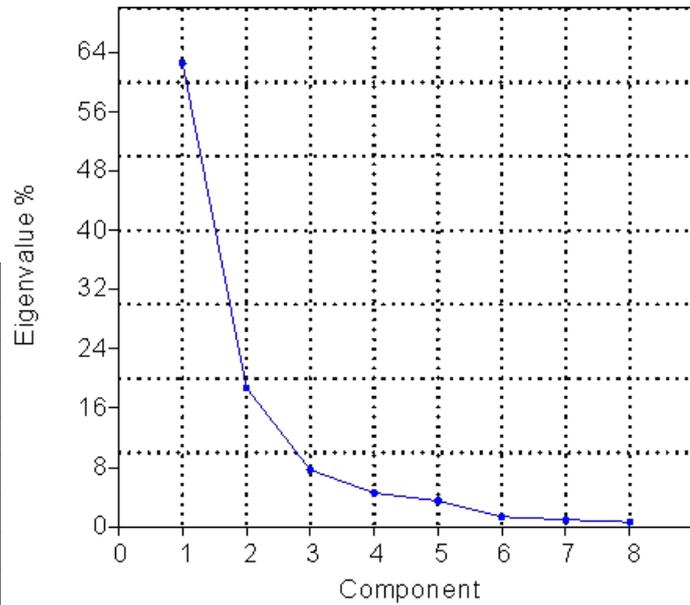
Substituts osseux	exemples
Les allogreffes osseuses	Allogro [®] (Allosource, Centennial, Colorado) ; Opteform [®] (EcaxTech Inc, Gainesville, Florida); Graphon [®] (Biohorizons, Birmingham, Alabama); Orthoblast [®] (Isotis, OrthoBiologics, Irvine, Californie)
Les substituts osseux à base de céramique (phosphates de calcium, sulfates de calcium, bioverres)	Osteograg [®] (Dentsply Friadent Ceramed, Lakewood, Colorado); Norian SRS [®] (Synthes Inc, West Chester, Pennsylvanie); ProOsteon [®] , (Interpore Cross International, Irvine, Californie), Osteoset [®] (Wright Medical Technologies Inc, Arlington, Tennessee)
Les substituts osseux à base de polymères dégradables et non dégradables	Cortoss [®] (Orthovita Inc, Malvern, Pennesylvanie); OPLA [®] (open porosity polylactic acid polymer) Immix [®] (OsteoBiologics Inc, San Antonio, Texas)
Les substituts osseux à base de facteurs de croissance naturelle ou recombinée	<i>Transforming Growth Factor Beta (TGF β), Platelet-Derived growth Factor (PDGF); Fibroblast Growth Factor (FGF), Bone morphogenetic Proteins (BMP)</i>
Les substituts osseux à base de produits cellulaires avec ou sans matrice support	Cellules souches mésenchymateuses
Autres biomatériaux non conventionnels d'origine marine	Corail, Chitosan, Squellette d'éponge

Annexe 7. Table des corrélations obtenues pour les caractérisations des biomatériaux

	0	surface spécifique	porosité	rugosité RA	rugosité RZ	rugosité RV	angle de contact D0	angle de contact D14	taille des grains
SURFACE_SPECIFIQUE	0	0	3.01E-05	0.00027413	0.00034502	0.0012034	0.0021661	0.167	0.0080283
POROSITE	0	0.79327	0	0.00024133	2.34E-07	2.78E-06	4.74E-15	0.0019008	1.12E-05
RUGOSITE_RA	0	0.72797	0.43728	0	3.75E-31	1.11E-15	5.47E-07	0.38424	0.023172
RUGOSITE_RZ	0	0.71991	0.58606	0.85111	0	1.19E-25	1.69E-08	0.17665	7.63E-07
RUGOSITE_RV	0	0.67091	0.54068	0.67756	0.80595	0	0.00024305	0.22034	0.001083
ANGLE_DE_CONTACT_D0	0	-0.64433	-0.78695	-0.53168	-0.58638	-0.40414	0	0.39222	0.016179
ANGLE_DE_CONTACT_D14	0	0.32143	0.3781	-0.095005	0.14705	0.13352	-0.099549	0	0.0018688
TAILLE_DES_GRAINS	0	-0.57476	-0.54179	-0.27924	-0.56524	-0.39343	0.29503	-0.37589	0

Annexe 8. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse des caractérisations des biomatériaux

PC	Eigenvalue	% variance
1	5.00787	62.598
2	1.49896	18.737
3	0.614467	7.6808
4	0.364218	4.5527
5	0.28046	3.5057
6	0.108138	1.3517
7	0.0759206	0.94901
8	0.0499709	0.62464

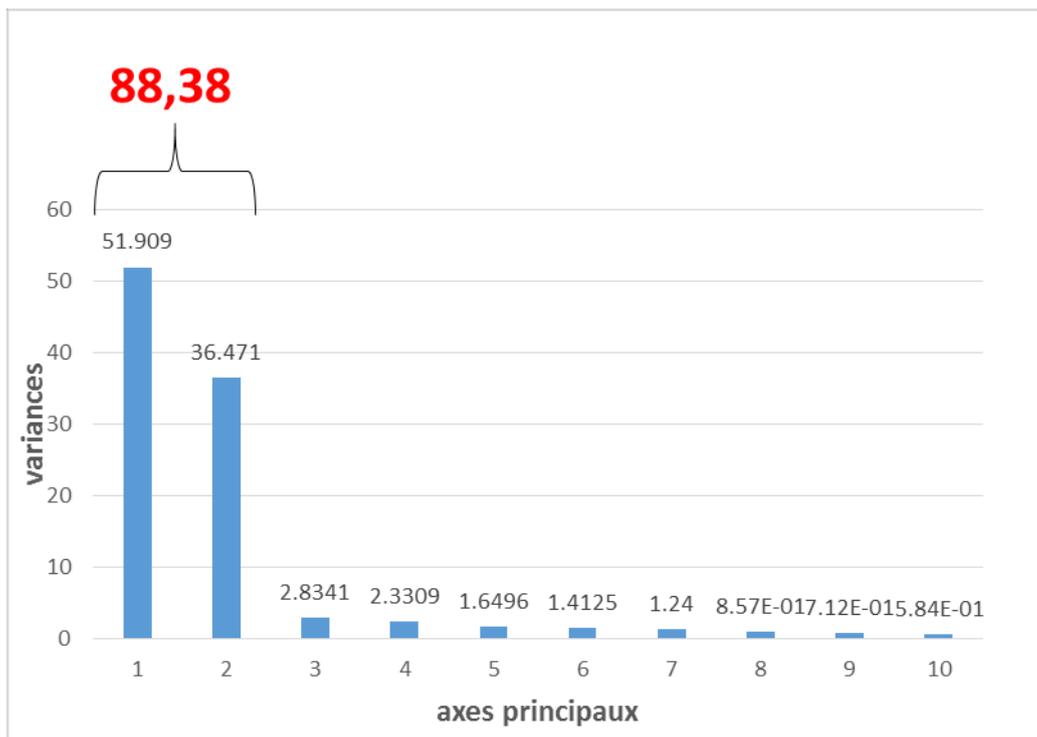
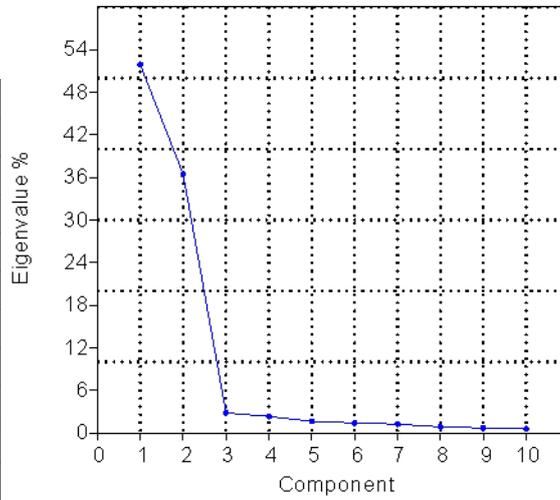


Annexe 9. Table des corrélations obtenues pour l'analyse biologique des MC3T3-E1

0	SURFACE_CELLULAIRE_1h	CONTACT_FOCAUX_24h	PROLIFERATION_24h	ALP_24H	VIABILITE_1h	VIABILITE_24h	VIABILITE_48h	DENSITE_CELLULAIRE_1h	DENSITE_CELLULAIRE_24h	DENSITE_CELLULAIRE_48h
0	0	0.0011094	0.43336	0.96703	0.082706	0.30831	0.70668	0.09115	0.12451	0.69341
CONTACT_FOCAUX_24h	0.32956	0	0.0048995	0.37068	0.043371	0.26583	0.010668	0.35822	0.54061	0.63133
PROLIFERATION_24h	-0.057946	0.28638	0	0.10512	0.002245	0.74407	1.18E-06	3.41E-12	8.34E-07	0.0038862
ALP_24H	-0.0072493	-0.15605	-0.27858	0	0.57048	0.944	0.12477	0.75042	0.40189	0.17585
VIABILITE_1h	0.13192	0.20774	0.2302	-0.099266	0	0.34009	0.00019453	0.12755	0.14307	0.61081
VIABILITE_24h	0.074898	0.11531	-0.02457	0.012321	-0.07275	0	0.72723	0.99976	0.66493	0.80217
VIABILITE_48h	0.028161	0.26087	0.35196	-0.26443	0.27885	-0.0264	0	0.013058	0.068677	0.45174
DENSITE_CELLULAIRE_1h	-0.12038	0.09531	0.48281	0.055749	0.11597	-2.26E-05	0.18419	0	1.20E-06	0.031454
DENSITE_CELLULAIRE_24h	-0.087431	0.063557	0.35292	0.14624	0.11148	0.031879	0.13563	0.33706	0	0.58498
DENSITE_CELLULAIRE_48h	-0.029668	0.049861	0.21659	-0.23412	-0.038961	0.019185	0.057249	0.16178	0.04109	0

Annexe 10. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse biologique des MC3T3-E1

PC	Eigenvalue	% variance
1	5.19091	51.909
2	3.64711	36.471
3	0.283408	2.8341
4	0.23309	2.3309
5	0.164958	1.6496
6	0.14125	1.4125
7	0.123998	1.24
8	0.085685	8.57E-01
9	0.0711629	7.12E-01
10	0.0584298	5.84E-01



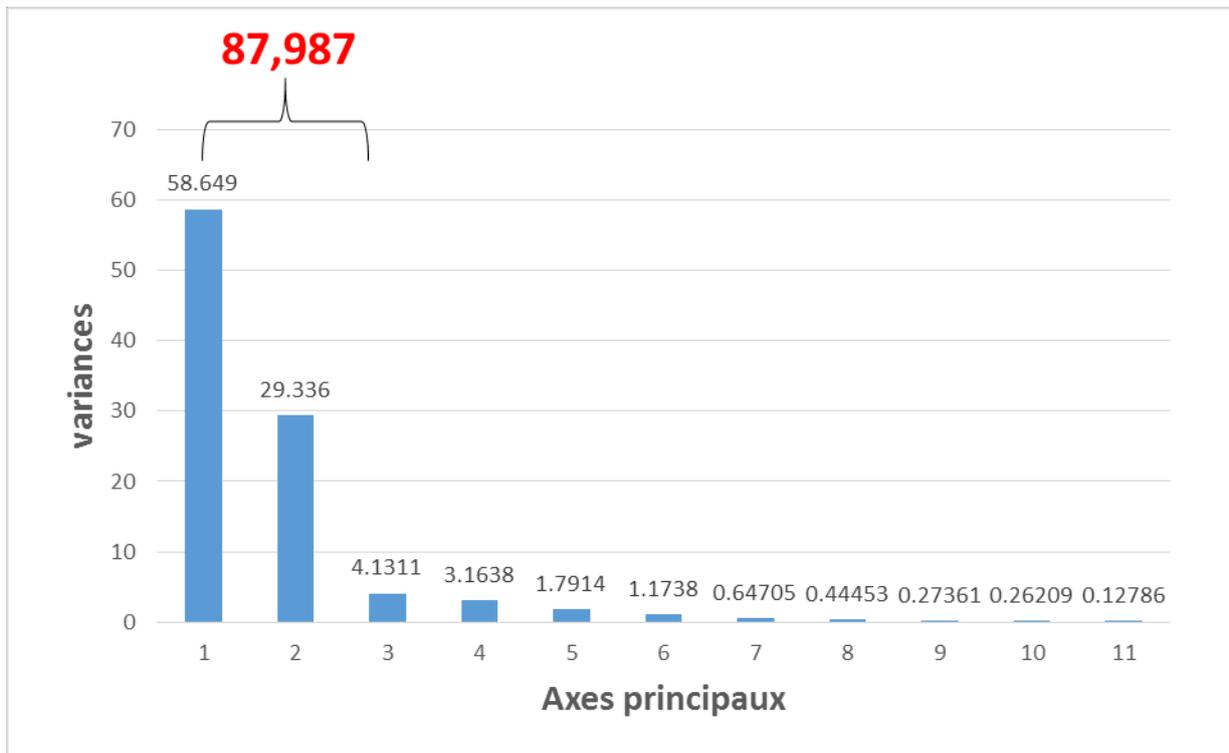
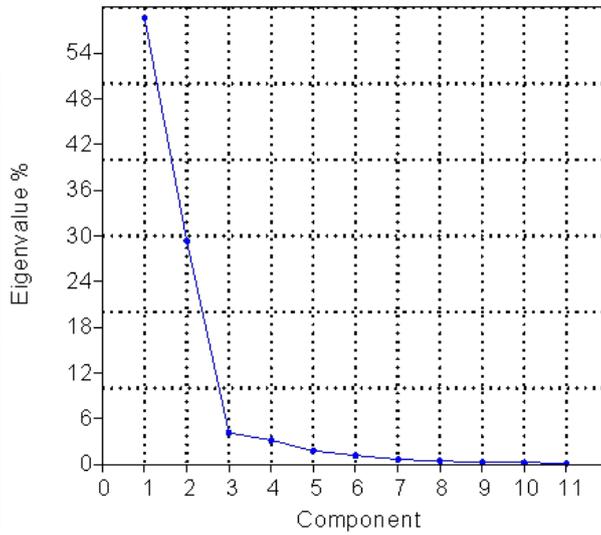
Annexe 11. Table des corrélations obtenues pour l'analyse biologique des RAW

264.7

0	VEGF-A 7 1	VEGF-A 14 1	TRAP5b	Prolifération	LDH	WST 8	cellules à 4 noyaux	Densité cellulaire	cellules à 2 noyaux	cellules à 3 noyaux	rings d'actines
VEGF-A_7_jours	0	0.0015152	0.29374	0.24578	0.17033	0.25421	0.3217	0.80617	0.31573	0.87294	0.8378
VEGF-A_14_jours	-0.50921	0	0.077941	0.0084106	0.016741	0.036534	0.13743	0.62013	0.091396	0.0055479	0.36926
TRAP5b	0.1915	-0.31615	0	0.034941	0.31707	0.43408	0.15958	0.87763	0.33303	0.20578	0.33474
PROLIFERATION	-0.21862	0.47227	-0.40737	0	0.046449	0.015149	0.50078	0.23152	0.7205	0.0026329	0.605
LDH	-0.26166	-0.44063	0.19251	-0.40186	0	0.10661	0.61121	0.096406	0.4274	0.084594	0.46532
WST8	0.19508	-0.34974	0.14327	-0.43929	0.30586	0	0.025253	0.33662	0.34144	0.40939	0.92902
Nombre_de_cellules_à_4_noyaux	0.16995	-0.25245	0.25465	-0.12785	0.0985	0.21046	0	0.91798	0.0056562	0.75123	0.27492
Densité_cellulaire	-0.042372	0.085477	-0.028342	-0.22519	-0.31467	-0.091216	0.0077734	0	0.2979	0.37599	0.9559
cellules_à_2_noyaux	0.17203	0.28553	-0.17681	-0.068143	-0.15324	0.090314	0.21138	-0.080541	0	2.71E-09	0.24211
cellules_à_3_noyaux	0.027623	0.45285	-0.2298	0.5293	-0.32578	-0.078358	-0.024714	-0.06958	0.44729	0	0.9701
perimètre_des_rings_d'actines	0.035355	0.15419	-0.17619	0.098382	-0.1411	0.0084742	0.081131	-0.0041738	0.090197	-0.0029226	0

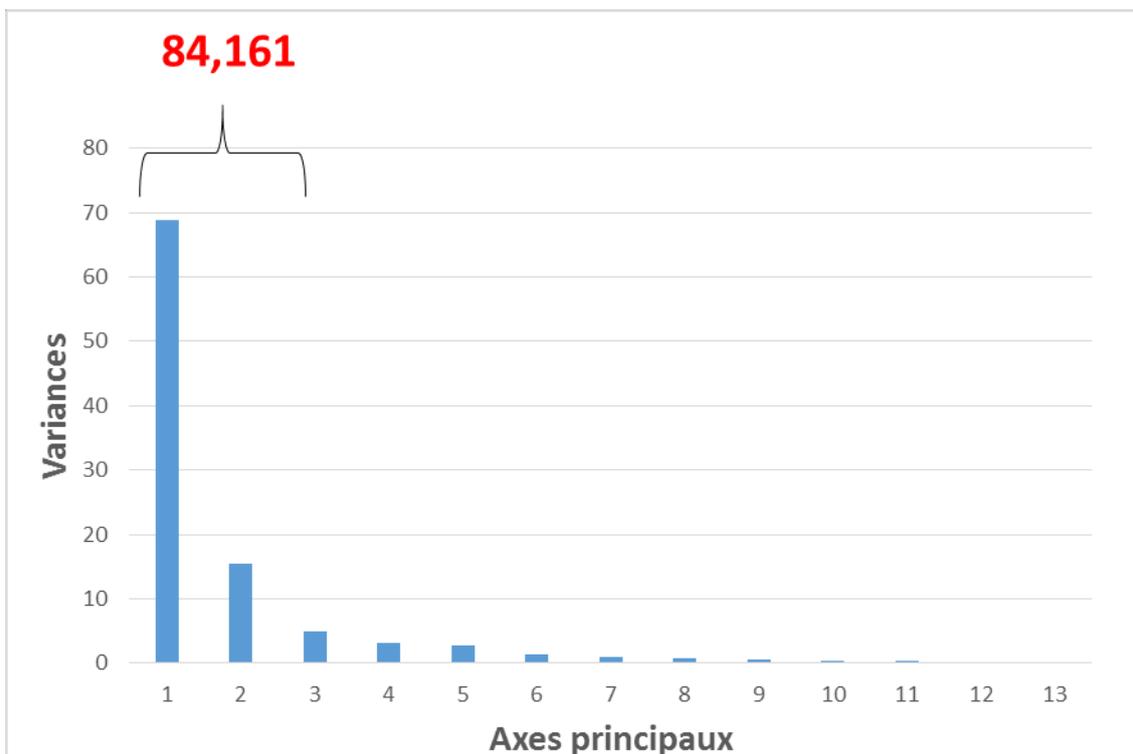
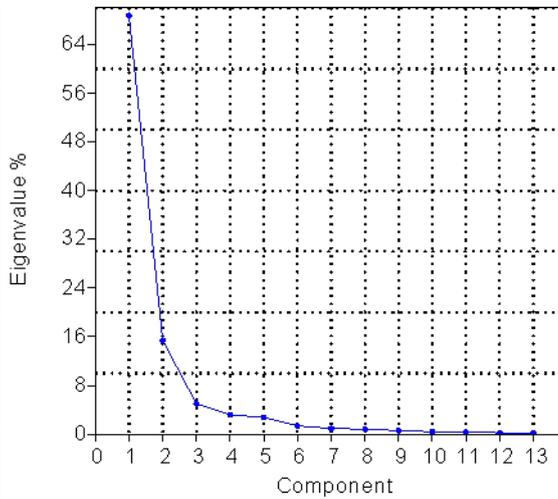
Annexe 12. Courbe de décroissance obtenue pour l'analyse biologique des RAW 264.7

PC	Eigenvalue	% variance
1	6.45135	58.649
2	3.22698	29.336
3	0.454419	4.1311
4	0.348018	3.1638
5	0.197052	1.7914
6	0.129115	1.1738
7	0.0711753	0.64705
8	0.0488983	0.44453
9	0.0300975	0.27361
10	0.0288304	0.26209
11	0.0140649	0.12786



Annexe 14. Courbe de décroissance obtenue pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des MC3T3-E1 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques

PC	Eigenvalue	% variance
1	8.93998	68.769
2	2.001	15.392
3	0.648293	4.9869
4	0.414078	3.1852
5	0.359531	2.7656
6	0.177843	1.368
7	0.125214	0.96318
8	0.106323	0.81787
9	0.0772324	0.5941
10	0.0511103	0.39316
11	0.0425276	0.32714
12	0.0302079	0.23237
13	0.0266654	0.20512

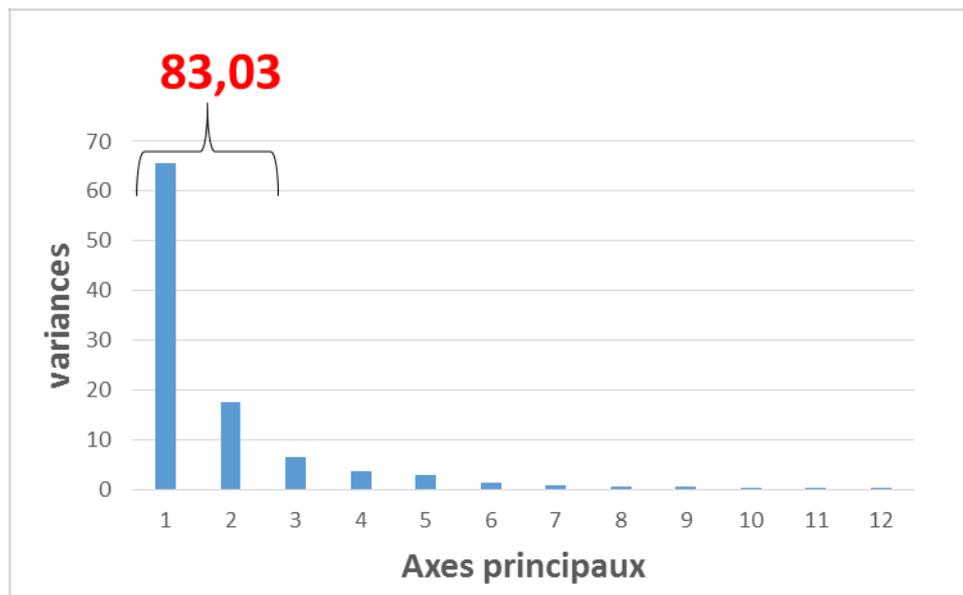
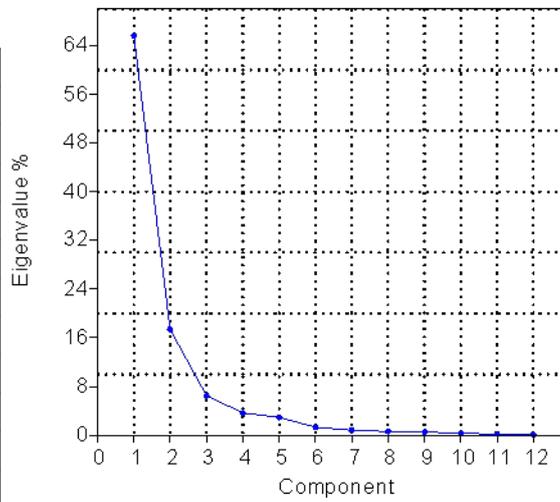


Annexe 15. Table des corrélations obtenues pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des RAW 264.7 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques

	0	surface spécifique	porosité	rugosité RA	rugosité RZ	rugosité RV	angle de contact D0	angle de contact D14	taille des grains	calcium 7 J (-) RAW 264.7	calcium 14J (-) RAW 264.7	calcium 7J (+ CELL) RAW 264.7	calcium 14J (+ CELL) RAW 264.7
SURFACE SPECIFIQUE	0	0	3.01E-05	0.00027413	0.00034502	0.0012034	0.0021661	0.167	0.0080283	1.91E-06	7.67E-07	0.0011122	2.70E-06
POROSITE	0.79327	0	0	0.00024133	2.34E-07	2.78E-06	4.74E-15	0.0019008	1.12E-05	4.25E-18	2.29E-07	2.06E-07	2.46E-09
RUGOSITE RA	0.72797	0.43728	0	0	3.75E-31	1.11E-15	5.47E-07	0.38424	0.023172	5.00E-05	0.0014141	0.027079	7.42E-05
RUGOSITE RZ	0.71991	0.58606	0.85111	0	0	1.19E-25	1.69E-08	0.17665	7.63E-07	1.44E-05	0.0012261	0.12537	0.0010084
RUGOSITE RV	0.67091	0.54068	0.67756	0.80595	0	0	0.00024305	0.22034	0.001083	5.01E-05	2.12E-05	0.027236	0.0007942
ANGLE DE CONTACT D0	-0.64433	-0.78695	-0.53168	-0.58638	-0.40414	0	0	0.39222	0.016179	2.98E-10	3.11E-08	1.75E-06	2.94E-11
ANGLE DE CONTACT D14	0.32143	0.3781	-0.095005	0.14705	0.13352	-0.099549	0	0	0.0018688	0.017082	0.43034	0.76323	0.34413
TAILLE DES GRAINS	-0.57476	-0.54179	-0.62271	-0.56524	-0.39343	-0.62264	0.29503	-0.37589	0	0.0026418	0.13361	0.63465	0.24643
CALCIUM 7 JOURS (-) RAW 264.7	-0.85159	-0.94519	-0.62271	-0.65531	-0.51757	-0.64566	0.83282	-0.39511	0.48622	0	9.52E-09	1.90E-08	8.93E-14
CALCIUM 14- JOURS (-) RAW 264.7	-0.86676	-0.74157	-0.51196	-0.51757	-0.64566	0.77384	-0.13561	0.25485	0.79082	0	3.68E-07	0	1.17E-10
CALCIUM 7 JOURS (+ CELL) RAW 264.7	-0.67429	-0.74337	-0.36834	-0.26019	-0.36799	0.7029	-0.052008	0.081957	0.78114	0.73309	0	0	4.98E-12
CALCIUM 14 JOURS (+ CELL) RAW 264.7	-0.84538	-0.8085	-0.61153	-0.5251	-0.53406	0.85569	-0.16235	0.19825	0.89949	0.8425	0.87095	0	0

Annexe 16. Courbe de décroissance obtenue pour les concentrations en calcium dans l'environnement cellulaire des RAW 264.7 avec les propriétés physico-chimiques des 6 biocéramiques

PC	Eigenvalue	% variance
1	7.87675	65.64
2	2.08675	17.39
3	0.777727	6.4811
4	0.441185	3.6765
5	0.352947	2.9412
6	0.156255	1.3021
7	0.100165	0.83471
8	0.0738353	0.61529
9	0.0651307	0.54276
10	0.0368413	0.30701
11	0.0233904	0.19492
12	0.00902348	0.075196



Résumé :

Cette thèse transdisciplinaire réalisée en collaboration avec le laboratoire SPCTS (Sciences des Procédés Céramiques et Traitement de Surface) et l'EA 3842 (Homéostasie cellulaire et pathologies) de l'université de Limoges est un projet de recherche à l'interface entre la biologie et la chimie et a été consacrée à l'étude de l'influence des propriétés physico-chimiques de biocéramiques de phosphate de calcium sur le comportement biologique *in vitro*.

L'exploration des processus d'interaction entre matériaux et cellules reste une problématique scientifique de premier plan tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué pour la mise au point de biomatériaux performants. L'objectif final est d'optimiser l'efficacité thérapeutique des céramiques phosphocalciques comme matériaux de substitution pour la régénération osseuse. Une revue bibliographique générale présentant la problématique actuelle abordée en lien avec les besoins cliniques et les limitations des études actuelles a été réalisée. Pour répondre à l'objectif de la thèse, des céramiques de trois compositions chimiques : HA hydroxyapatite : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, SiHA hydroxyapatite silicatée : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,42}(\text{OH})_{1,6}$ et CHA hydroxyapatite carbonatée : $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,08}(\text{CO}_3)_{0,23}$, chacune avec deux microstructures différentes : dense ou poreuse, ont été élaborées et rigoureusement caractérisées (porosité, topographie de surface, mouillabilité, potentiel zêta, taille des grains, distribution et taille des pores, surface spécifique). Une approche statistique multivariée : l'analyse en composantes principales (ACP) a été pour la première fois utilisée en " science des biomatériaux " pour discriminer l'effet de la composition chimique de celle de la microstructure des biocéramiques sur la réponse biologique et corrélérer les réponses biologiques obtenues avec les caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux. Les analyses biologiques ont été réalisées avec deux lignées cellulaires différentes. La lignée cellulaire pré-ostéoblastique MC3T3-E1 et la lignée cellulaire de monocytes/macrophages, précurseurs des ostéoclastes RAW 264.7, (très importante pour les aspects osseux, mais moins souvent explorée que les lignées ostéoblastiques dans la littérature). Tous les biomatériaux évalués dans cette étude sont biocompatibles et présentent des capacités à être résorbé par les ostéoclastes, néanmoins, la composition chimique CHA poreuse substituée à 4.4% massique de carbonates s'est avérée la plus prometteuse des six variantes de biomatériaux testés.

Mots clés : substituts osseux, biocéramiques phosphocalciques, hydroxyapatite, substitutions ioniques, microporosité, culture cellulaire, cellules MC3T3-E1, cellules RAW 264.7, biorésorption, analyse en composantes principales (ACP).

Abstract :

This transdisciplinary thesis, carried out in collaboration with the SPCTS laboratory (sciences of ceramic processes and surface treatment) and EA 3842 (Cellular homeostasis and pathologies) of the University of Limoges, is a research project at the interface between biology and chemistry. It was devoted to the study of the influence of the physico-chemical properties of calcium phosphate bioceramics on the biological behavior *in vitro*.

The exploration of the interaction processes between materials and cells remains a major scientific issue, both from a fundamental and applied point of view for the development of high-performance biomaterials. The final objective is to optimize the therapeutic efficiency of phosphocalcic ceramics as substitute materials for bone regeneration.

A bibliographic review was presented, detailing the current issues tackled with the clinical needs and the limitations of the current studies. To meet the objective of the thesis, ceramics of three chemical compositions : HA hydroxyapatite : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, SiHA silicated hydroxyapatite : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.42}(\text{OH})_{1.6}$ and CHA carbonated hydroxyapatite : $\text{Ca}_{9.5}(\text{PO}_4)_{5.5}(\text{CO}_3)_{0.48}(\text{OH})_{1.08}(\text{CO}_3)_{0.23}$, each with two different microstructures : dense or porous, have been elaborated and thoroughly characterized (porosity, surface topography, wettability, zeta potential, grain size, pore size and distribution, specific surface area). A multivariate statistical approach : the principal component analysis (PCA) was used for the first time in “Biomaterials science” to discriminate the effect of the chemical composition from that of the microstructure of bioceramics on the biological response and correlate the biological responses obtained with the physico-chemical characteristics of the biomaterials. Biological analyzes were carried out with two different cell lines. The pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell line and the RAW 264.7 cell line of monocytes / macrophages, precursors of the osteoclasts, (very important for the bone aspects, but less often explored than the osteoblastic lines in the literature). All the biomaterials evaluated in this study are biocompatible and have the ability to be resorbed by osteoclasts, nevertheless, the chemical composition of porous CHA substituted with 4.4 wt% of carbonates proved to be the most promising of the six variants of the tested biomaterials.

Key words : bone substitutes, phosphocalcic bioceramics, hydroxyapatite, ionic substitutions, microporosity, cell culture, MC3T3-E1 cells, RAW 264.7 cells, bioresorption, principal component analysis (PCA)