

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).

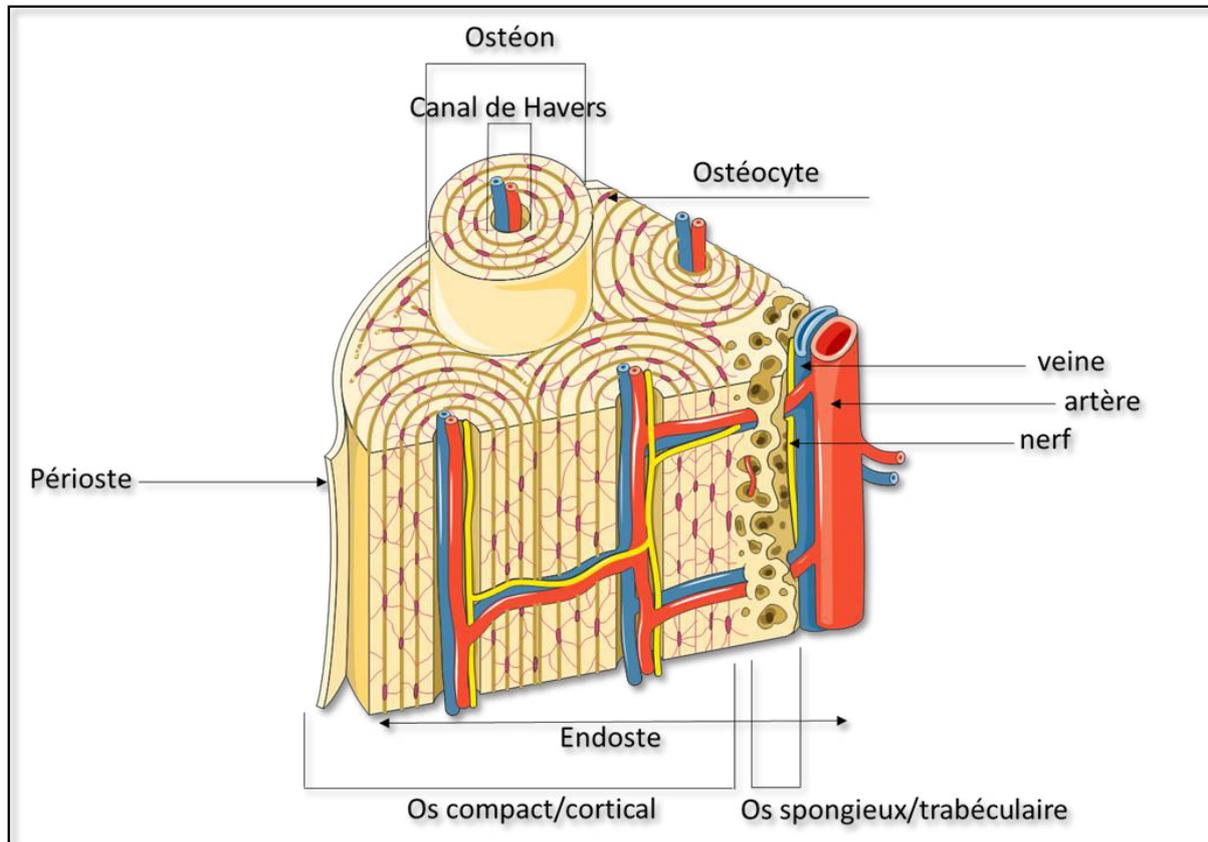


Figure 1 : image d'une coupe d'os (modifiée selon la banque d'image *Medical Art Servier*)

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).

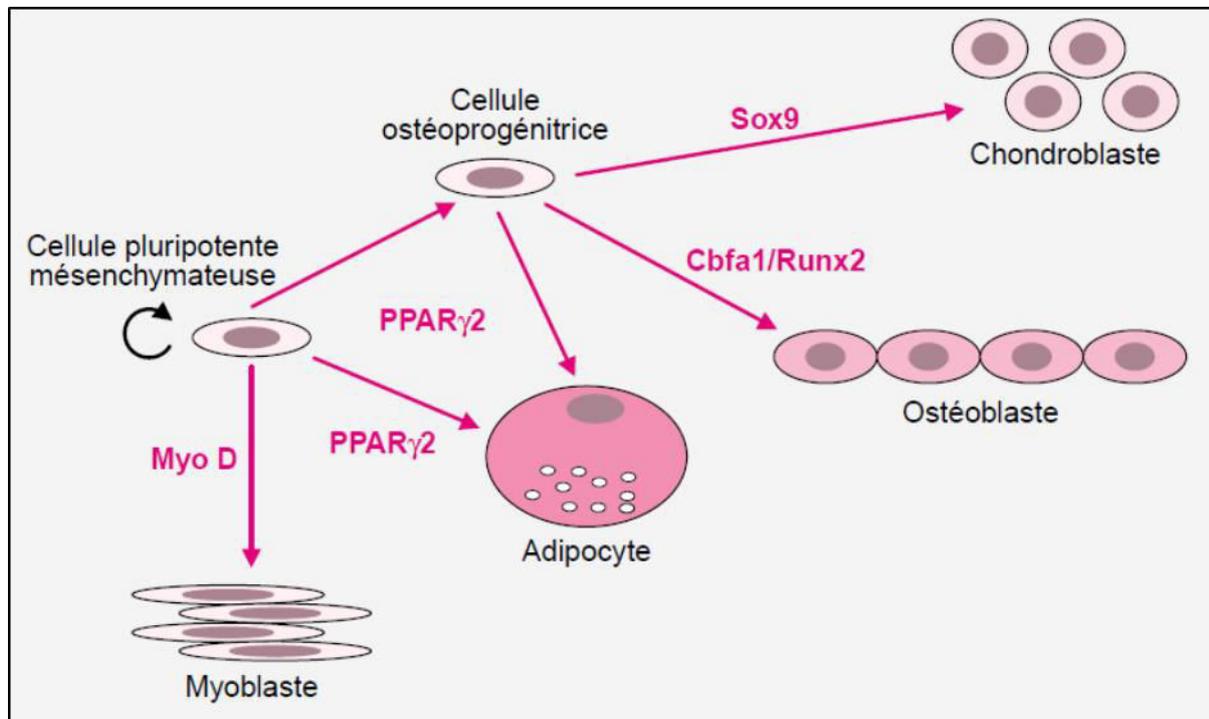


Figure 2 : différenciation des cellules mésenchymateuses multipotentes.

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.

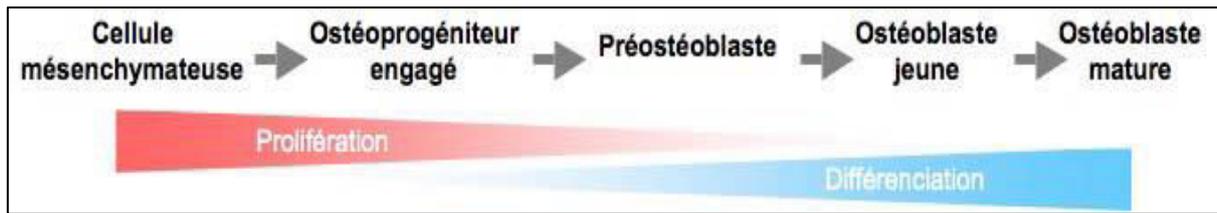


Figure 3 : les phases du développement de la cellule souche mésenchymateuse à l'ostéoblaste mature, selon Barré, 2012

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).

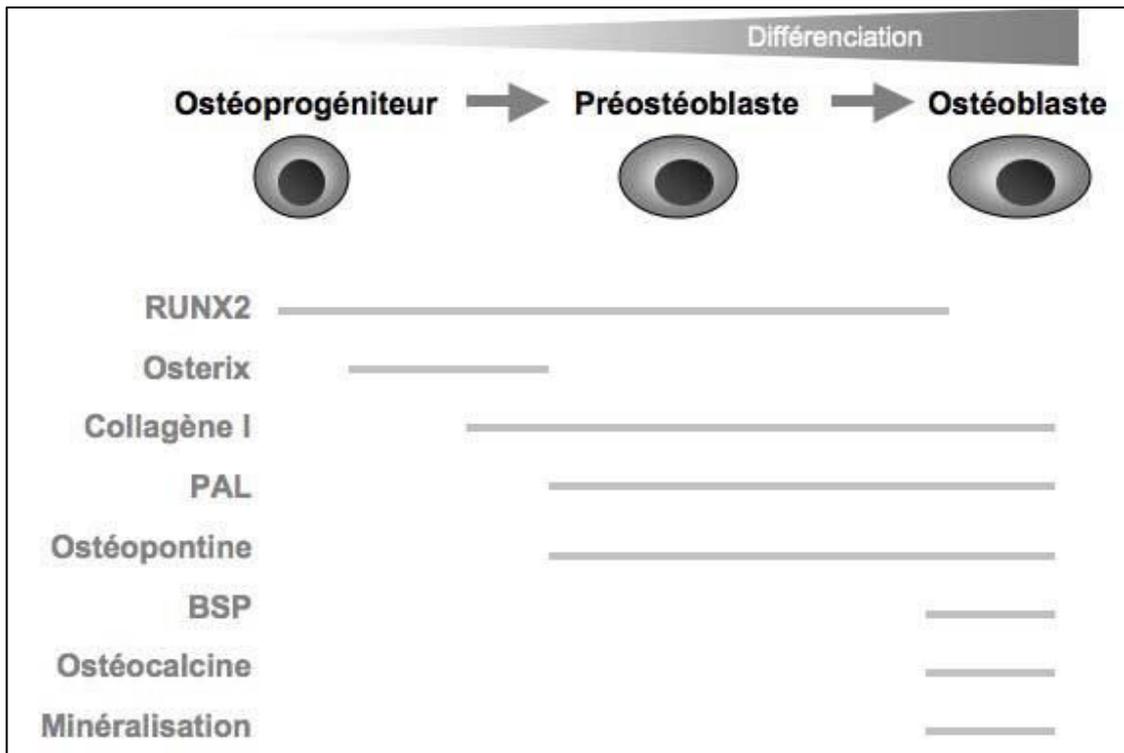


Figure 4 : expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique selon Barré, 2012

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](#)).

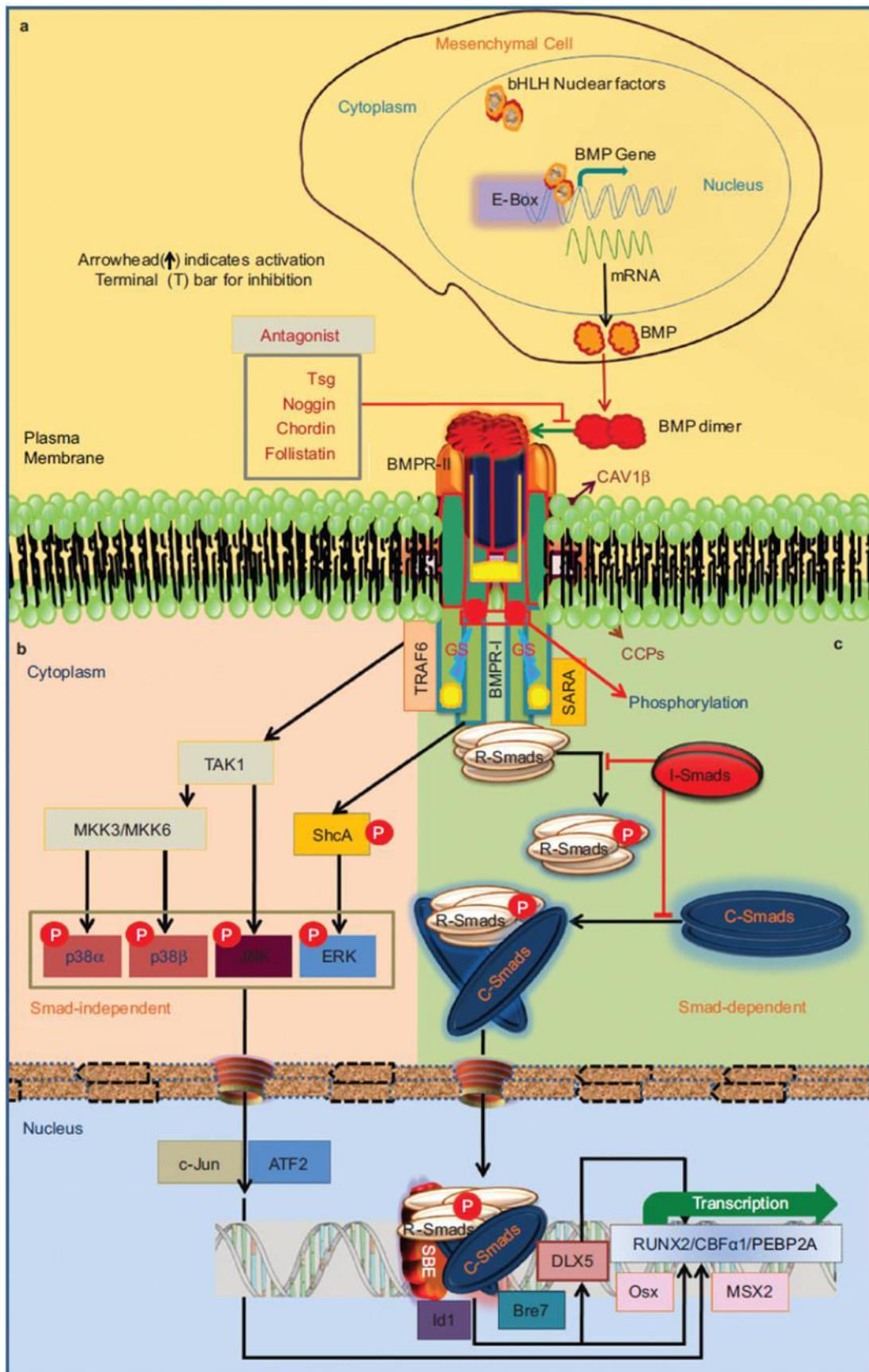


Figure 5 : schéma représentant les voies de signalisation des BMPs et leur régulation d'après (Rahman et al., 2015)

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).

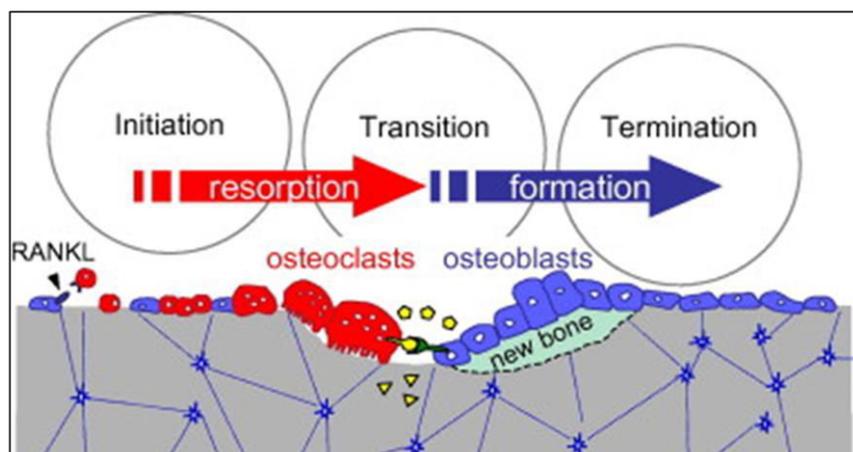


Figure 6 : les 3 phases du remodelage osseux : résorption, transition et terminaison selon (Matsuo and Irie, 2008).

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).

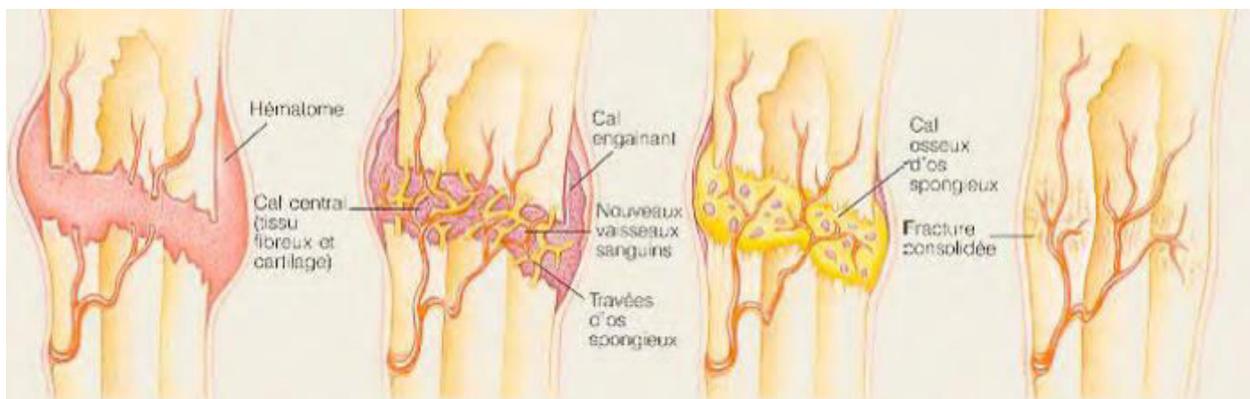


Figure 7 : les 4 étapes de la réparation osseuse: processus de réparation osseuse : conséquences sur le délai de mise en contrainte

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).

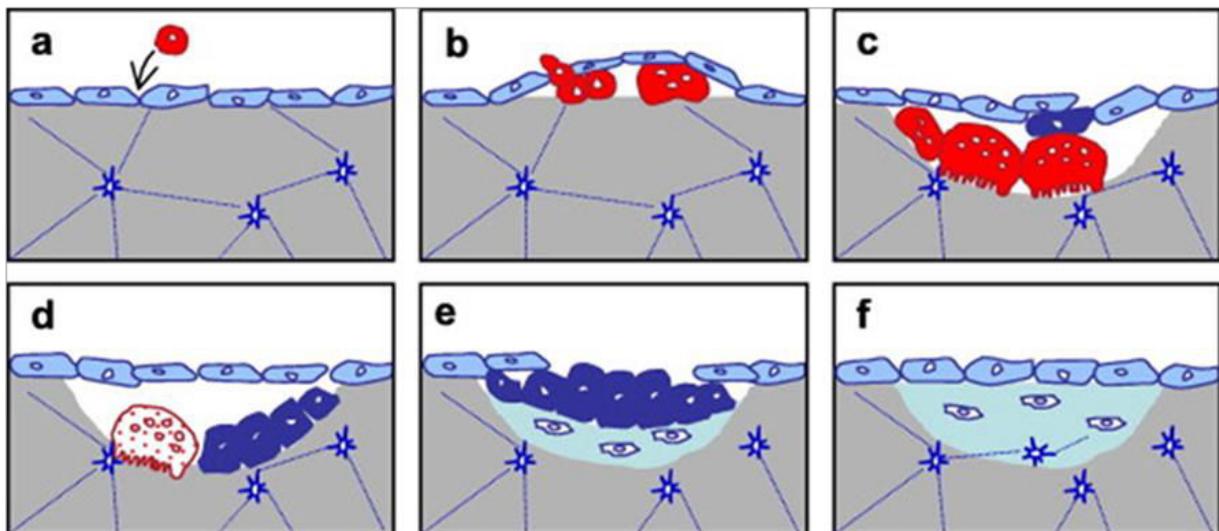


Figure 8 : les différentes étapes du remodelage osseux selon (Matsuo and Irie, 2008)

- 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.

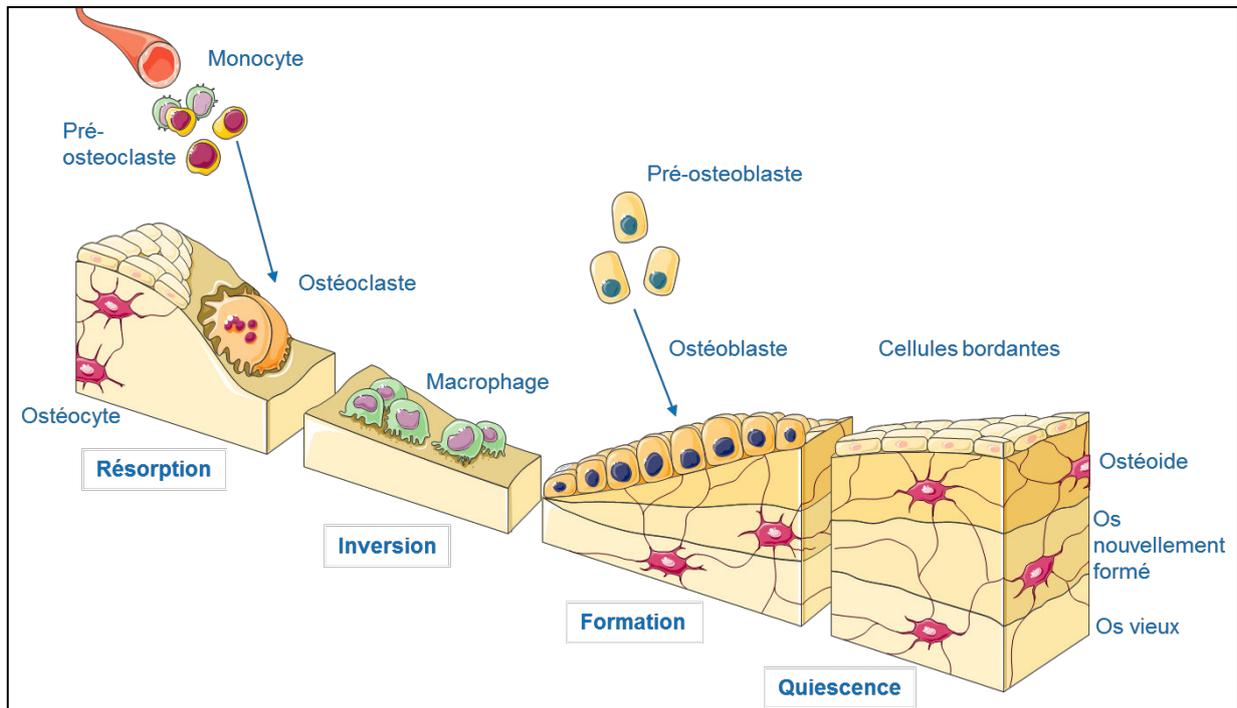


Figure 9 : les cycles du remodelage osseux (banque d'images servier medical art).

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 : $CO_2 + H_2O = H_2CO_3$.

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.

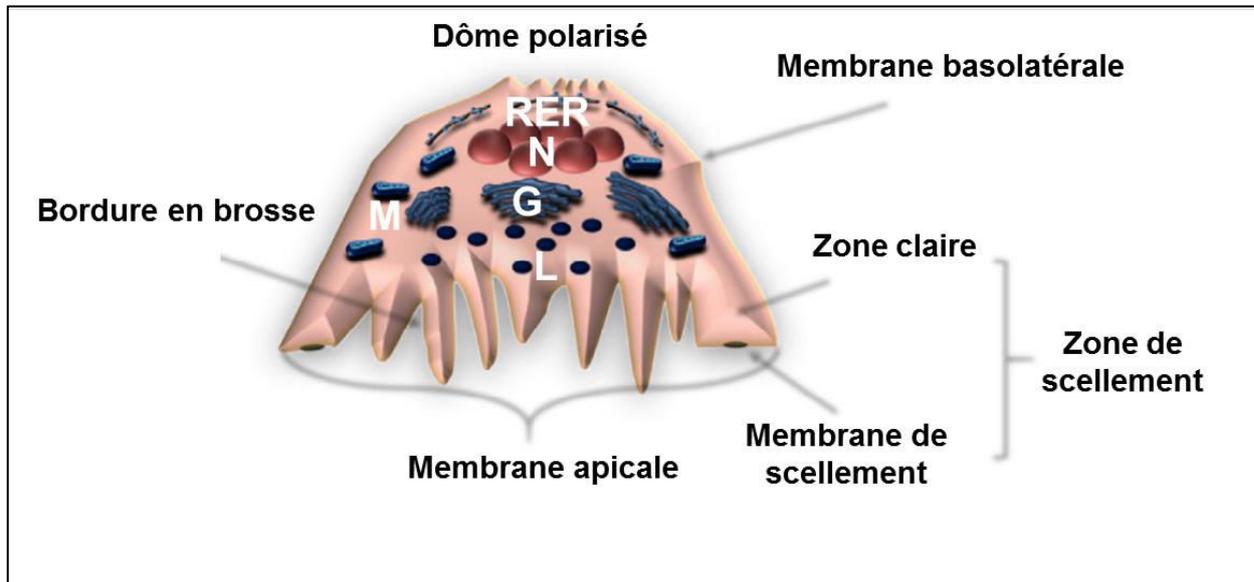


Figure 10 : morphologie d'un ostéoclaste. Image modifiée selon Cappariello *et al*, 2014.
(Cappariello *et al.*, 2014)

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).

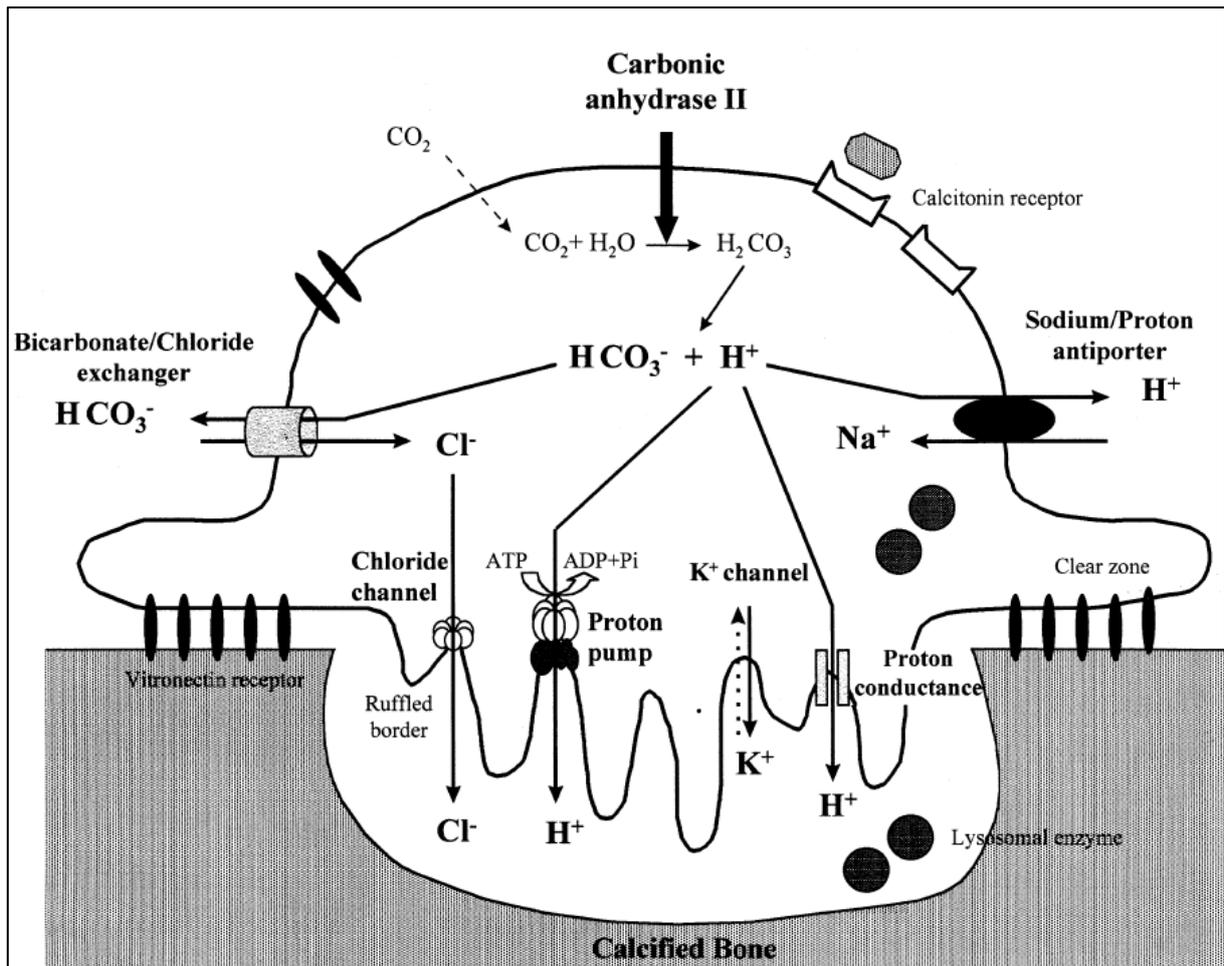


Figure 11 : mécanisme d'acidification intervenant dans les lacunes de résorption selon Rouselle et Heymann, 2002, (Rousselle and Heymann, 2002)

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).

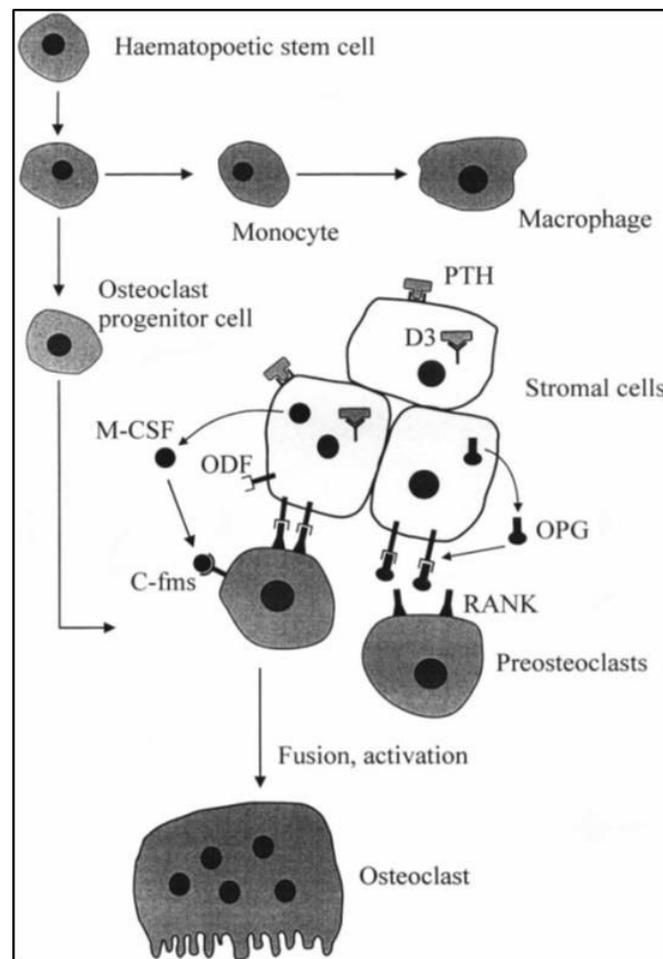


Figure 12 : voie de différenciation des cellules hématopoïétiques en ostéoclastes multinucléés, (Lerner, 2000)

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).

1.1.4.2.1. 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

1.1.5.1 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).

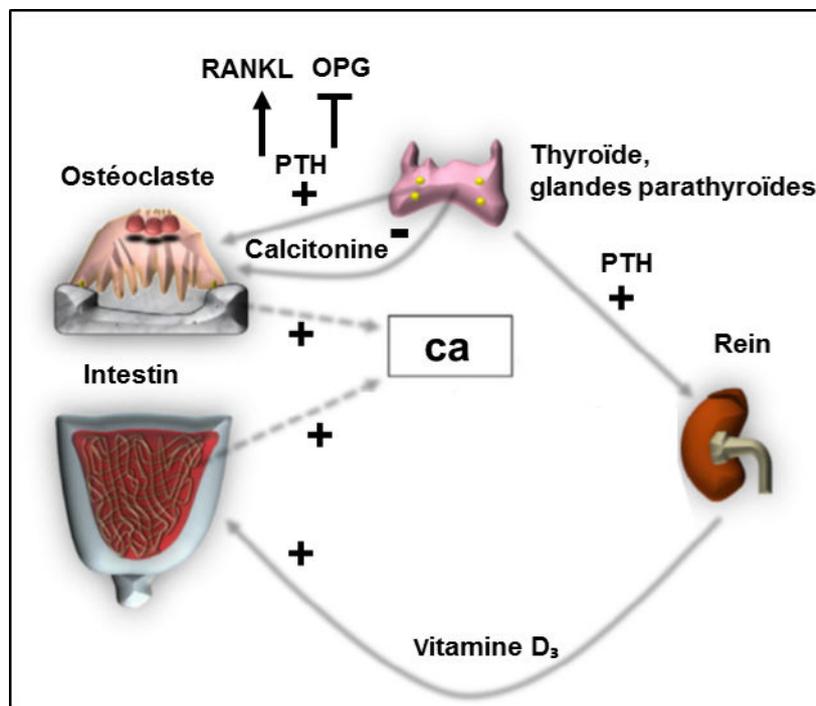


Figure 13 : contrôle hormonal du calcium et implication sur l'activité ostéoclastique

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](#)).

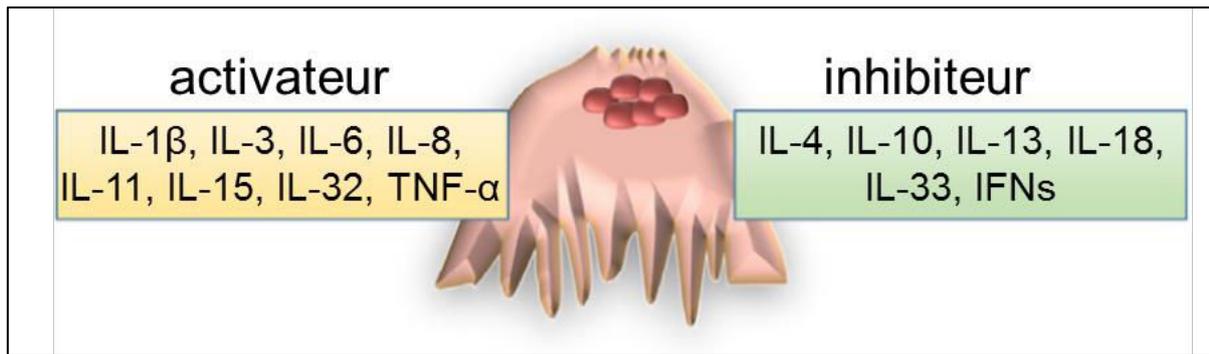


Figure 14 : lien entre ostéoclaste et système immunitaire. Image modifiée selon (Cappariello et al., 2014)

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.

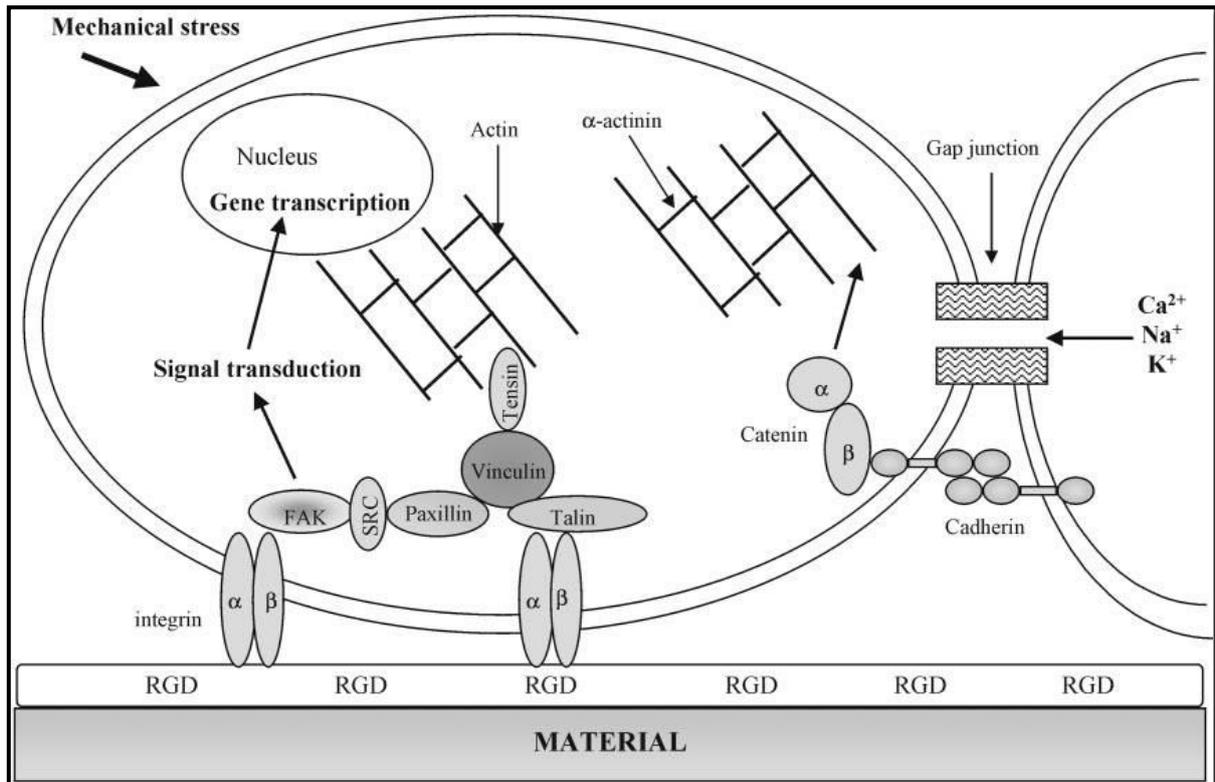


Figure 15 : représentation de protéines cellulaires ostéoblastiques impliquées dans l'adhésion cellulaire au biomatériau selon Anselme, 2000.

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).

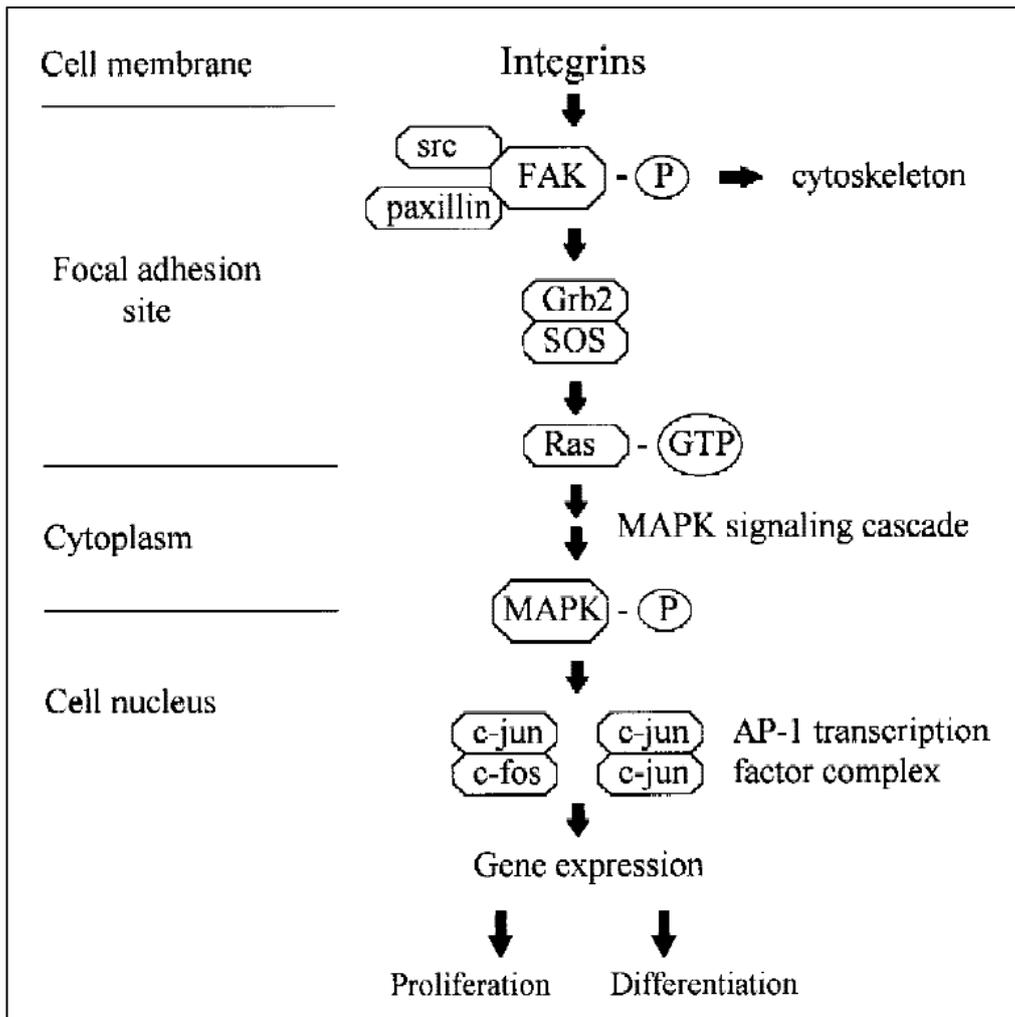


Figure 16 : voie de signalisation cellulaire médiée par l'interaction avec les intégrines selon Cowles et al 2000

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																				
Deligianhi et al, 2000	Cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse	Pastilles d'hydroxyapatite polies avec 3 rugosités différentes produites avec du papier en carbure 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 (HBDcs: 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 (CaMg₃(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 Laczka-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 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_{x\Box x}$) ou type B ($\text{Ca}_{10-x\Box x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x\Box x}$) ou bien elle peut être mixte de type A/B ($\text{Ca}_{10-x\Box x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_{y\Box x+y}$) 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 µm 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
Pieters <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 libre 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.