

## Chapitre IV. Résultats et discussions

---

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

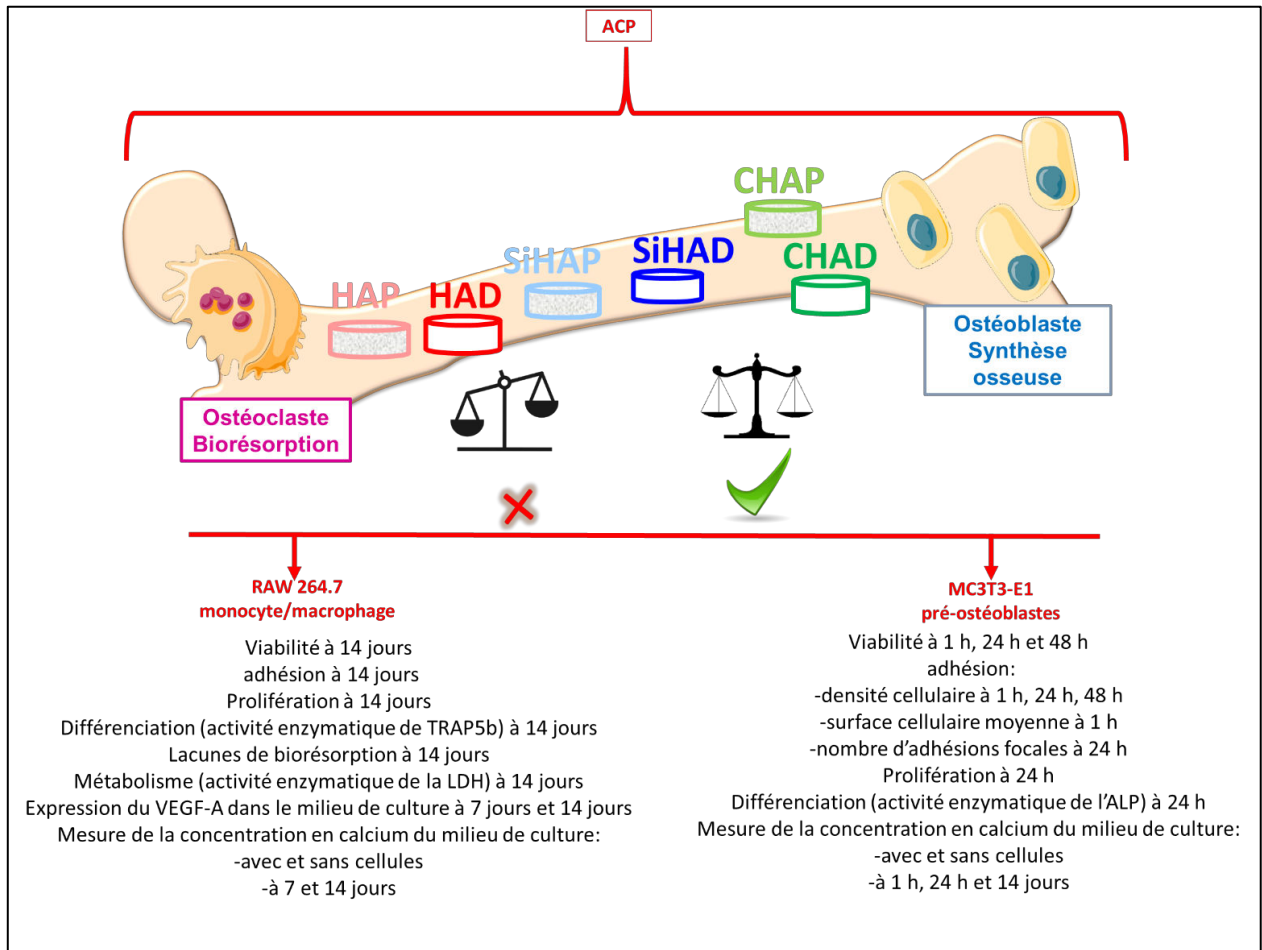
#### **IV.1.1. Contexte et objectif de l'étude**

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

##### **IV.1.1.1 Approche expérimentale**

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

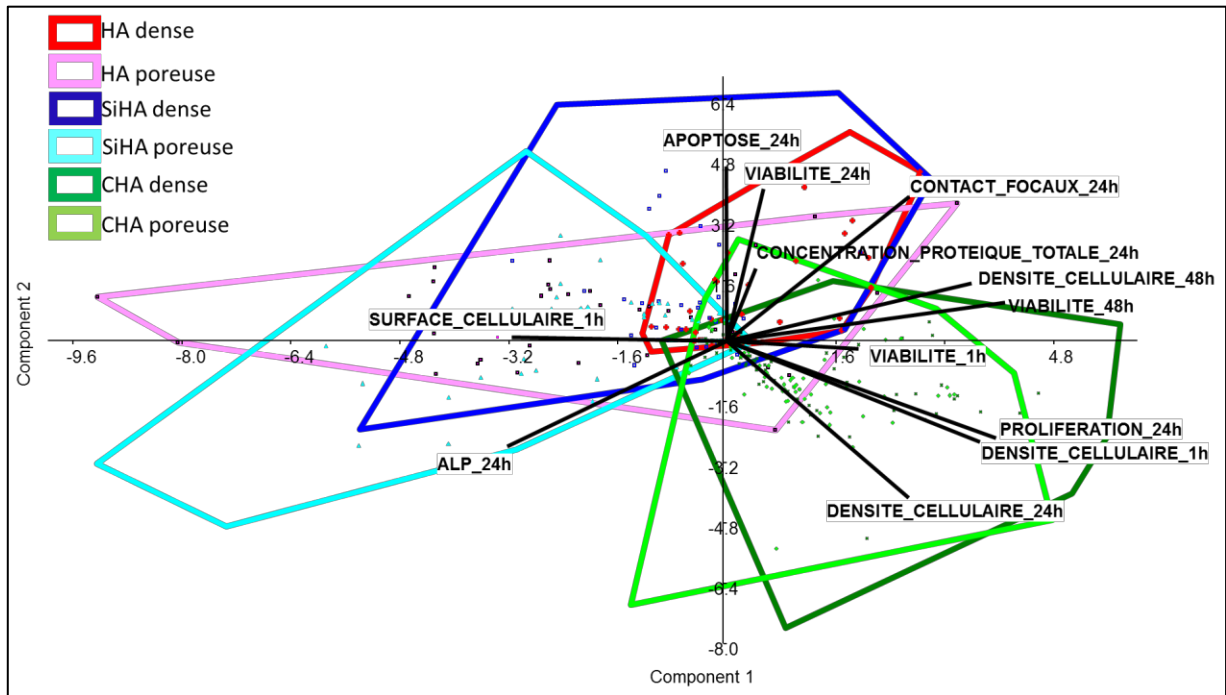
biocéramiques, cultivées ou non avec les RAW 264.7. Cela, afin de tenter de corrélérer les réponses biologiques des cellules avec les concentrations en calcium du milieu. En effet, comme énoncé précédemment, les biocéramiques de phosphate de calcium libèrent du calcium dans l'environnement, communément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



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

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

## IV.1.2. Réponse cellulaire ostéoblastique



**Figure 35** : réponse biologique des ostéoblastes aux 6 biocéramiques

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

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

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

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

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

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

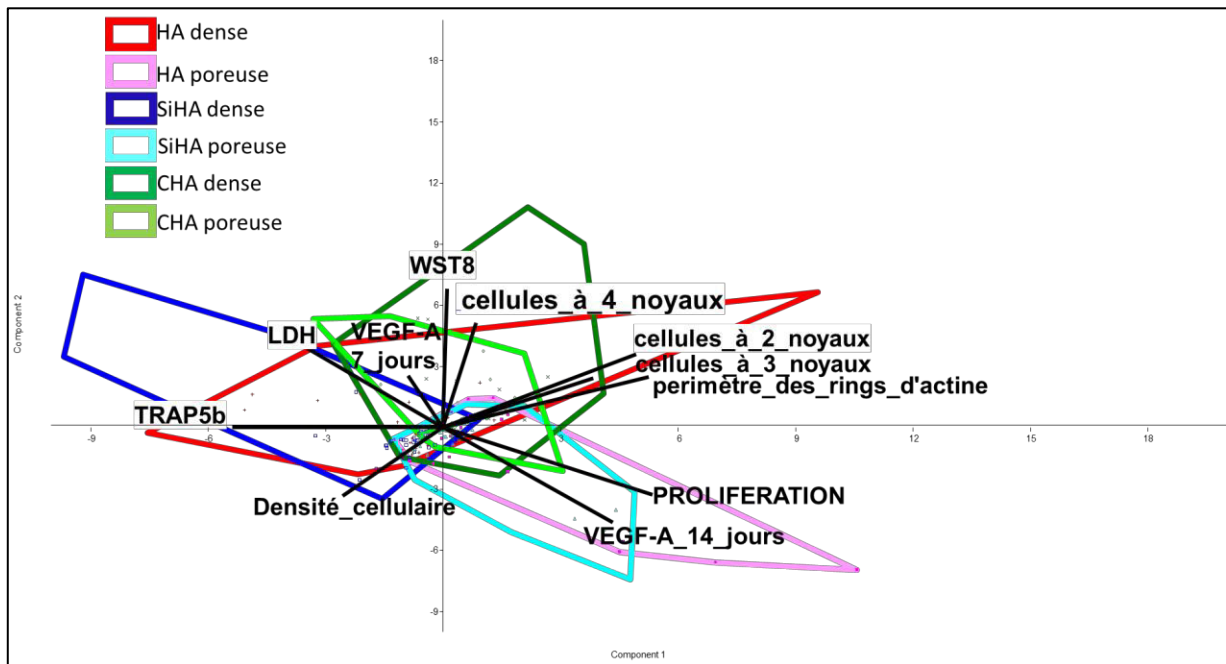
**HA dense** est un autre groupe à distinguer car son enveloppe plus étroite touche principalement l'enveloppe SiHA dense. Ce matériau partagerait davantage de caractéristiques communes avec SiHA dense. Cela laisse supposer que la microstructure dense, indépendamment de la composition chimique HA ou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

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

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

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

### IV.1.3. Réponse cellulaire ostéoclastique



**Figure 36** : réponse biologique des ostéoclastes aux 6 biocéramiques

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

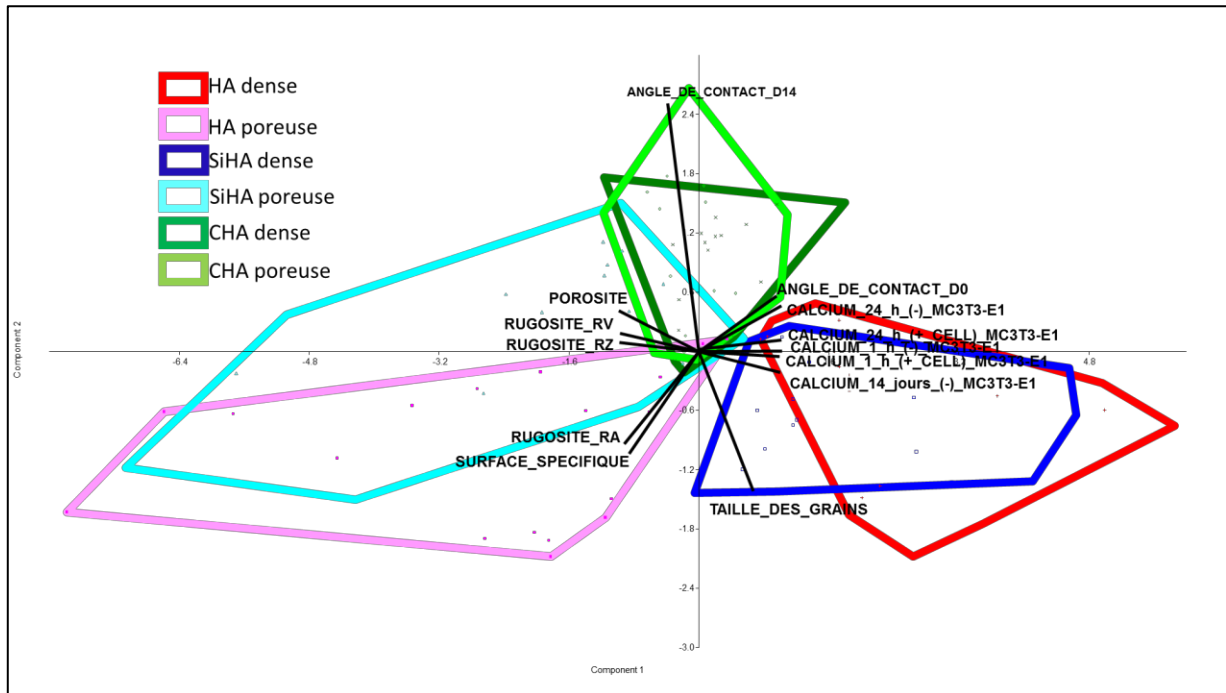
L'analyse prenant en compte les réponses biologiques des ostéoclastes, a permis la distinction d'un groupe en particulier : **SiHA poreuse** et **HA poreuse**. Comme précédemment, l'orientation commune de ces deux enveloppes laisse supposer qu'elles partageront des réponses biologiques de façon spécifique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

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

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

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

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



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

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

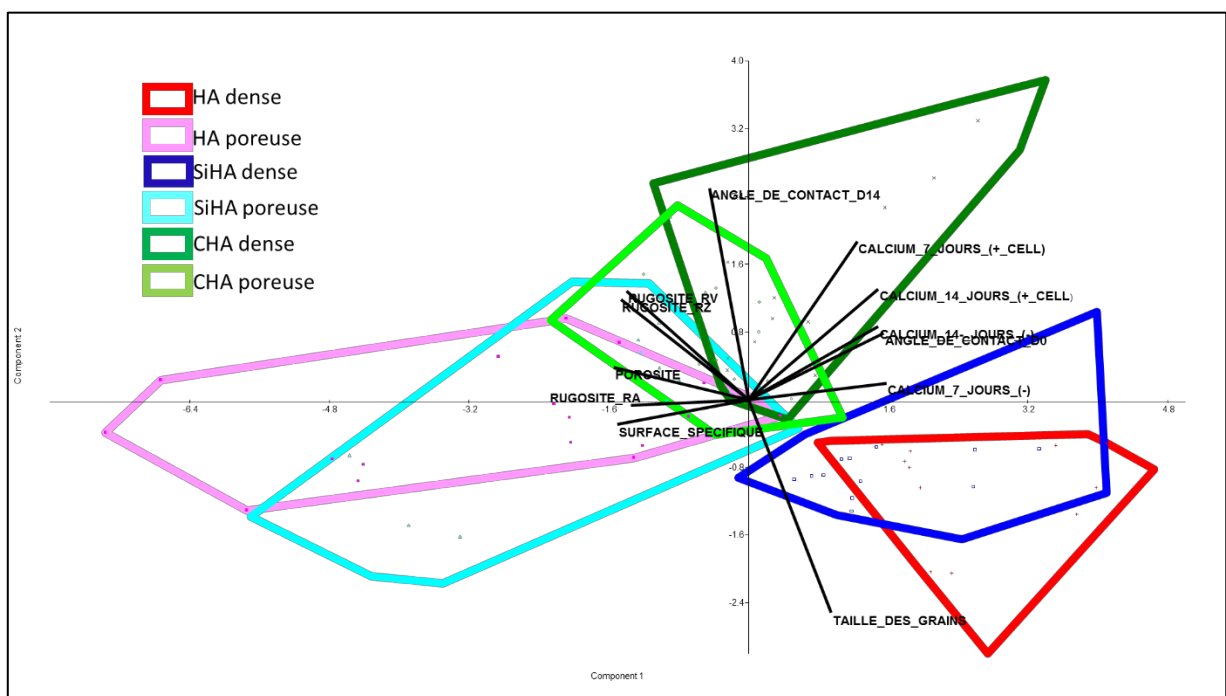
Pour les cultures d'ostéoblastes, (Figure 37), 3 mêmes groupes ont pu clairement être identifiés :

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

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

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

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



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

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

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



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

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

### **IV.1.5. Conclusion de l'étude**

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

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

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

### **IV.2.1. Contexte et objectif de l'étude**

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

## IV.2.2. Résultats

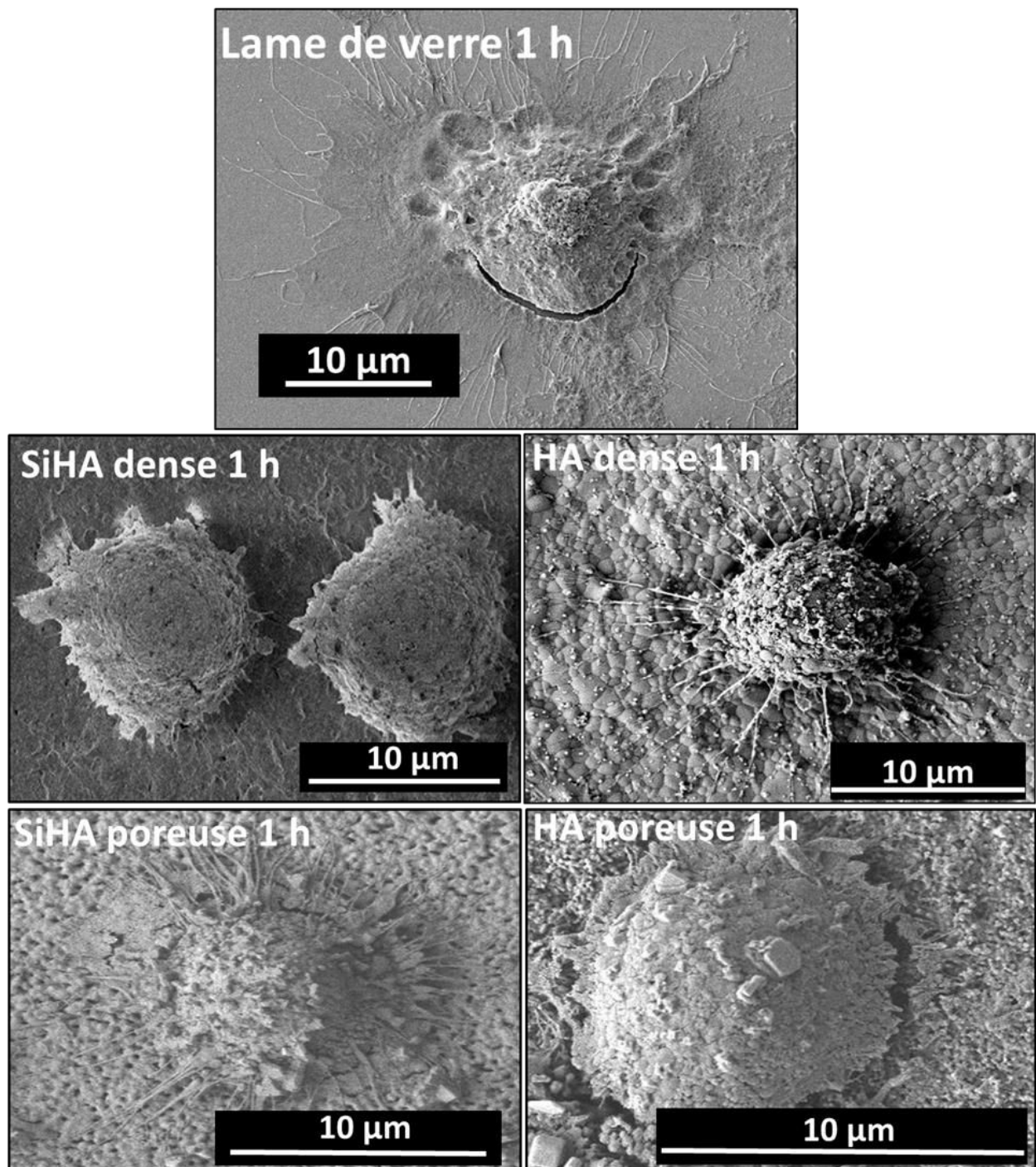
### IV.2.2.1 Examen morphologique et adhésion cellulaire

Deux techniques d'imagerie ont été utilisées pour évaluer qualitativement la façon dont les pré-ostéoblastes adhèrent aux biomatériaux : la dessiccation par contournement du point critique du CO<sub>2</sub>, ([Figure 39](#), [Figure 40](#)), ainsi que l'immunofluorescence, ([Figure 41](#), [Figure 42](#)).

#### IV.2.2.1.1. Images en MEB

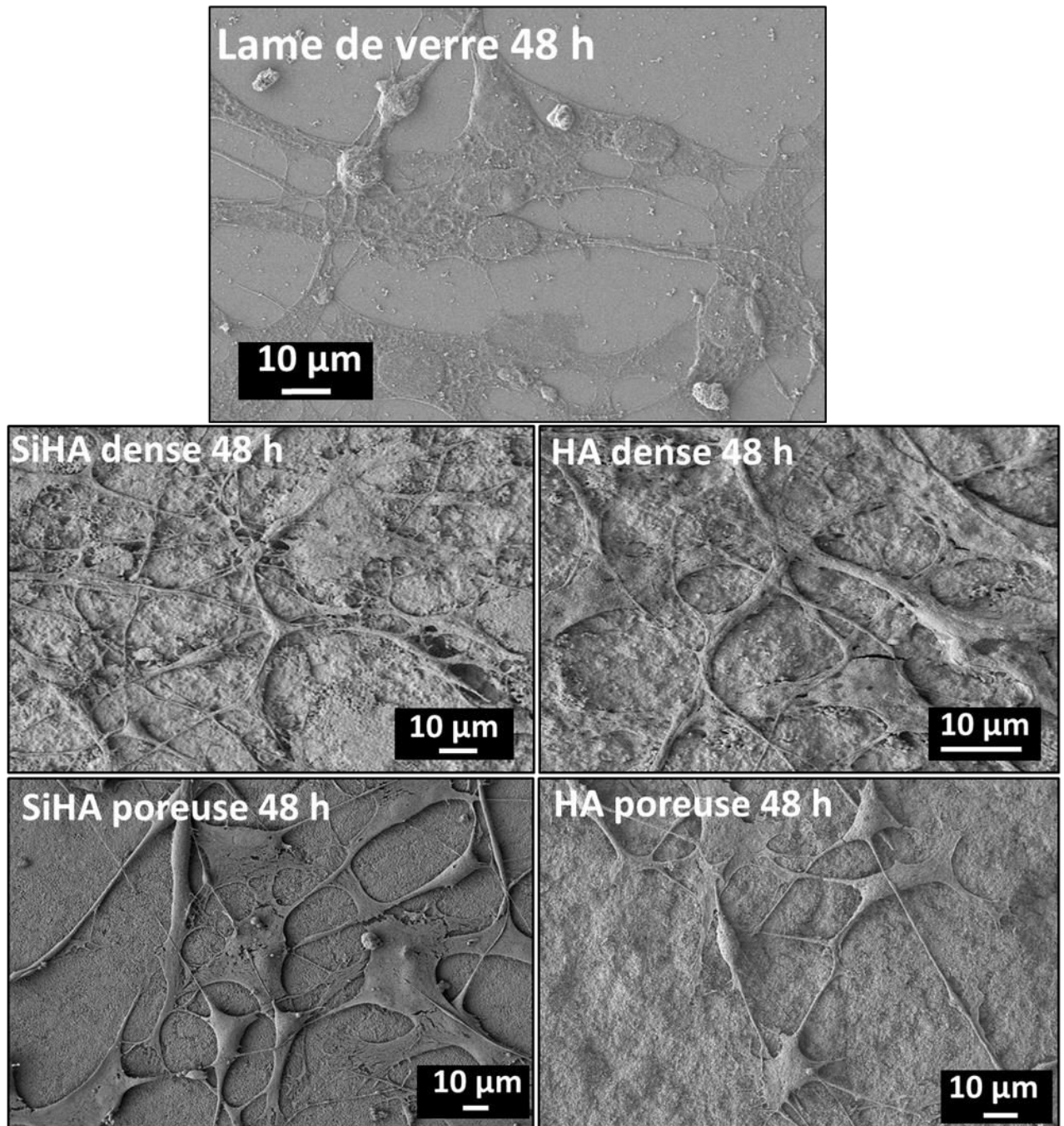
Dès 1 h de culture, les cellules avaient adhéré à la surface de tous les biomatériaux. A 1 h, sur les images en MEB, il est possible de distinguer clairement les extensions membranaires, tout autour des cellules : les filopodes qui adhèrent aux grains des biomatériaux. Cependant, le corps cellulaire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

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



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

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

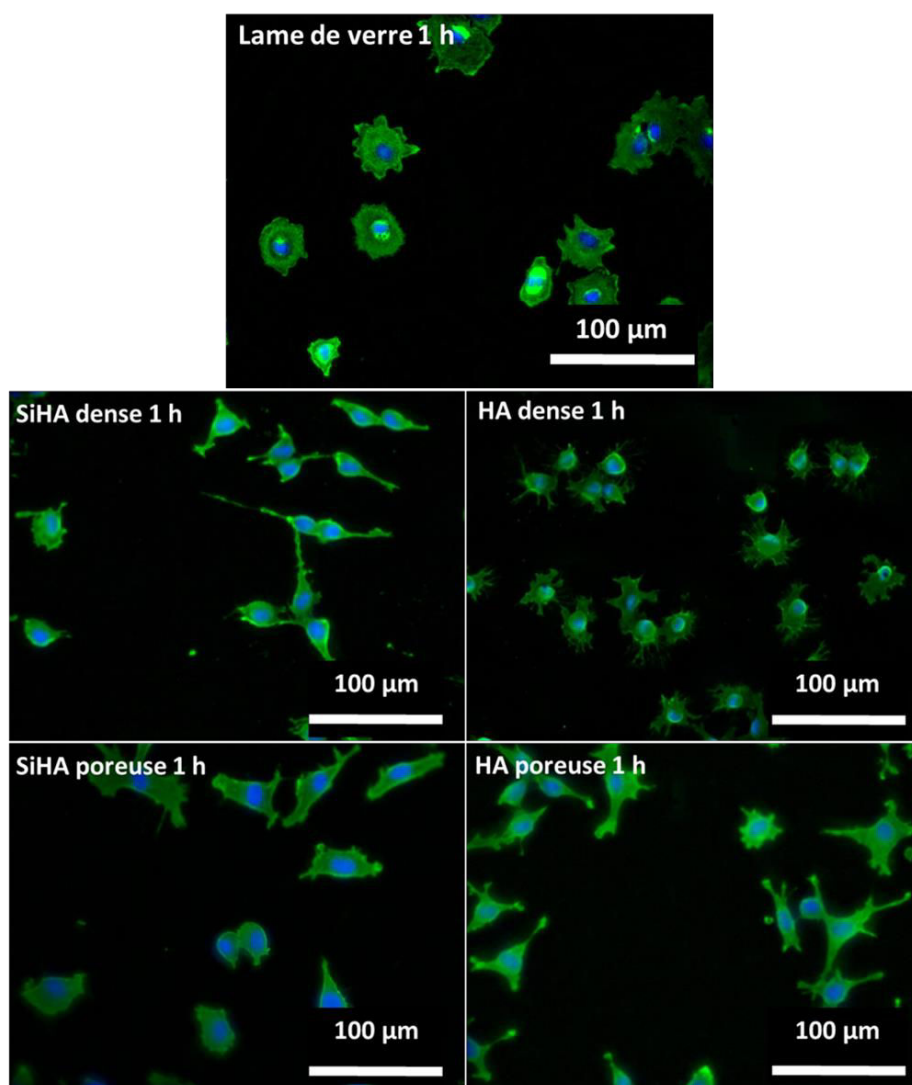


**Figure 40** : images en MEB des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 48 h de culture

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

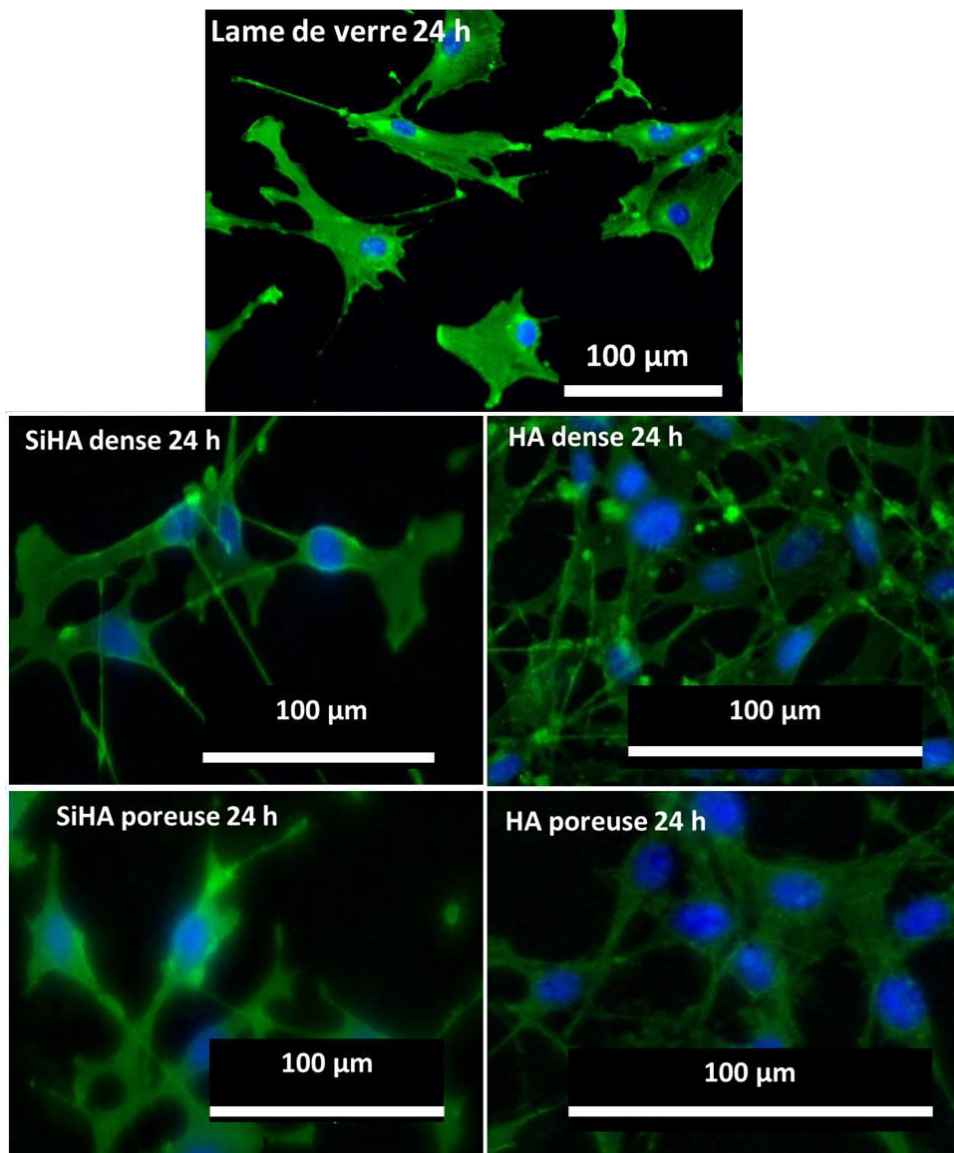
#### IV.2.2.1.2. Images d'immunofluorescences

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



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

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

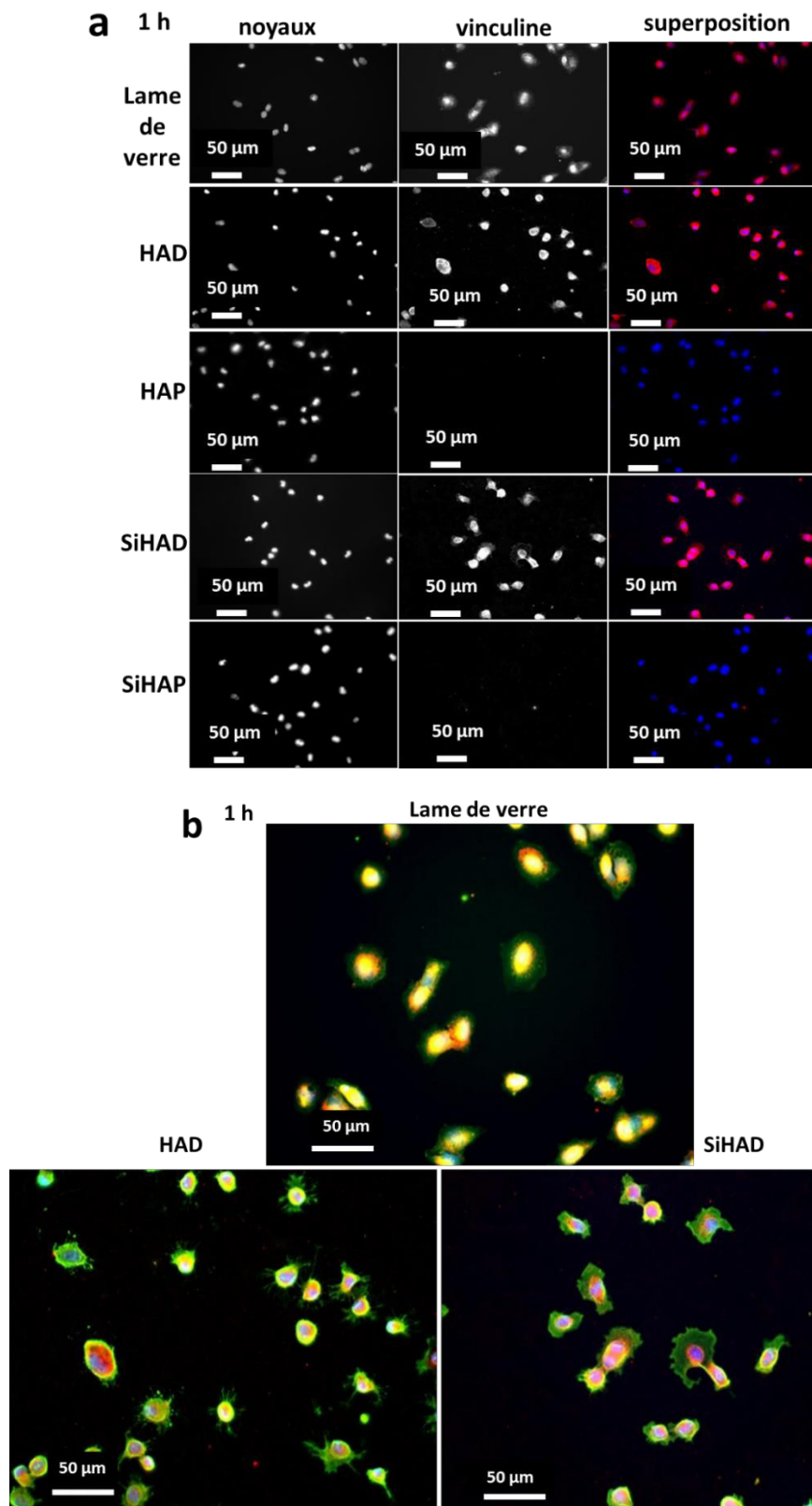


**Figure 42** : images en microscopie à épifluorescence des MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 24 h de culture.

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

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

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

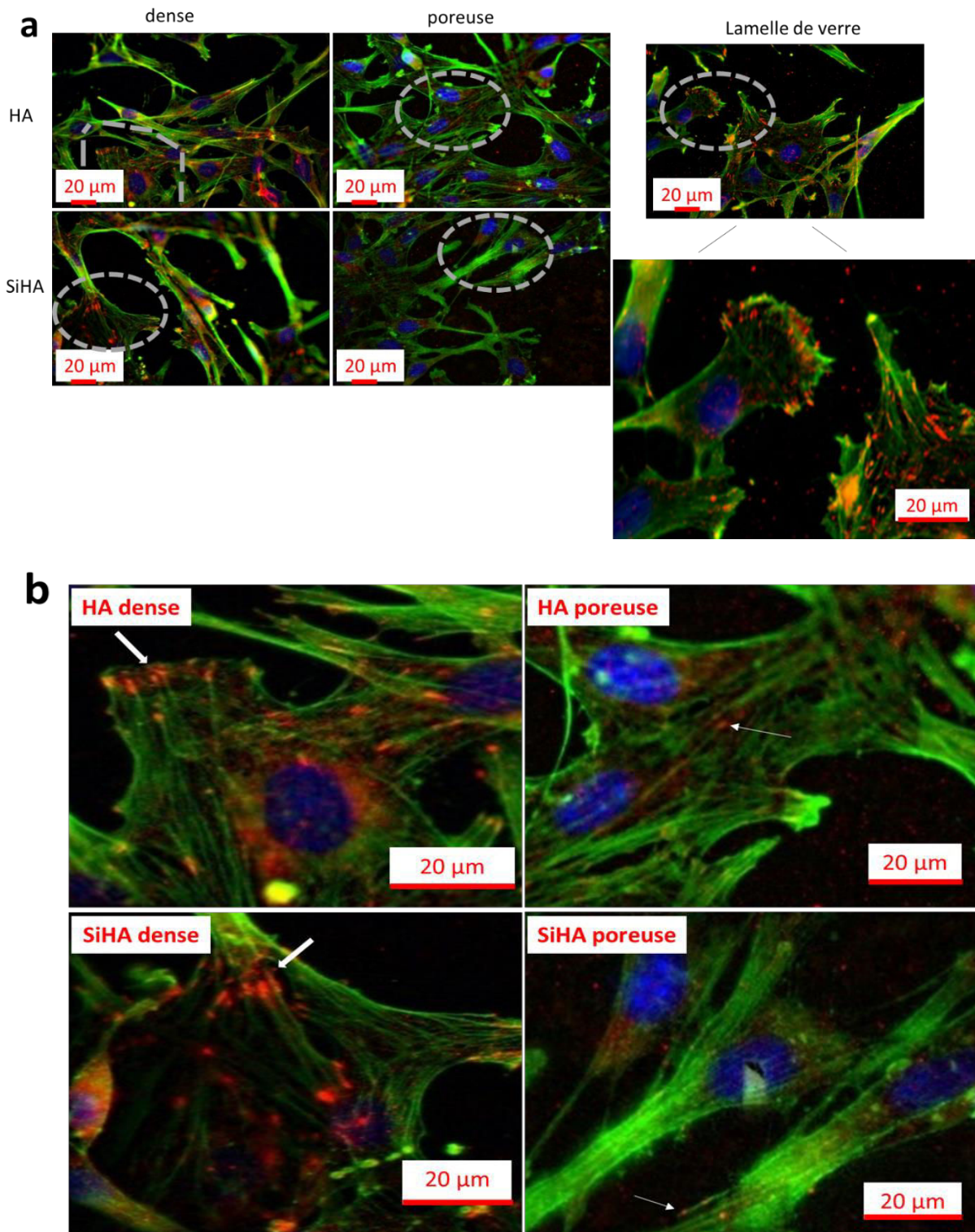


**Figure 43** : images des immunofluorescences des cellules MC3T3-E1 adhérant aux biomatériaux et à la lame de verre après 1 h de culture.

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

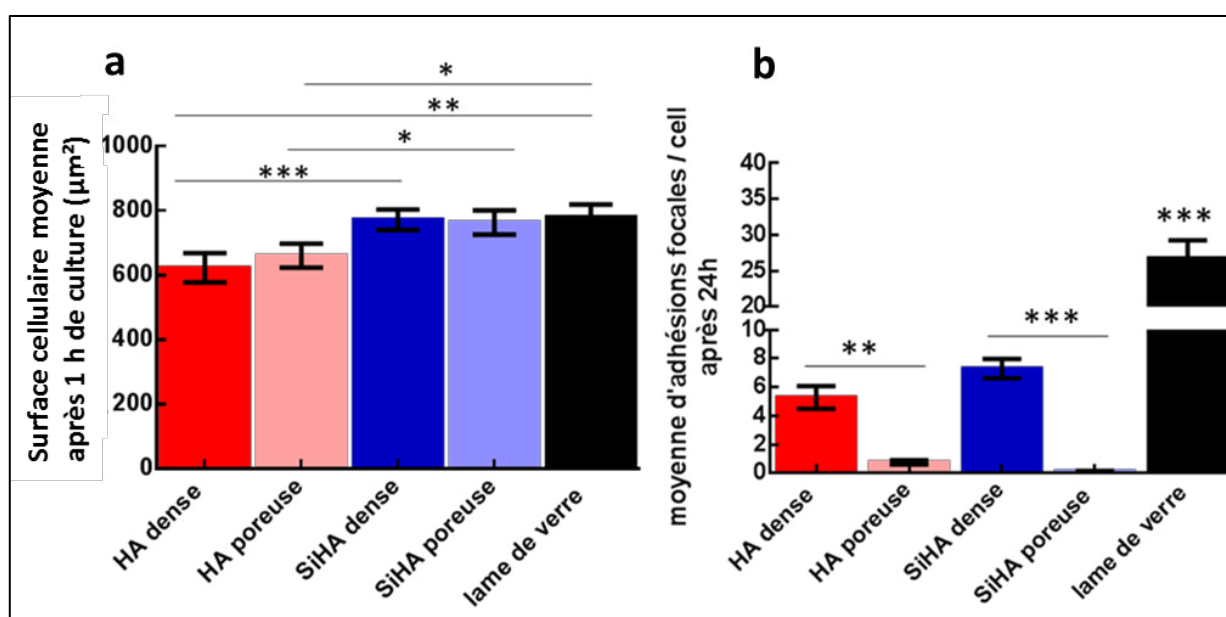


Après 24 h, au contact de tous les substrats, les filaments d'actine se sont réorganisés en faisceaux linéaires : les fibres de stress. Ces fibres sont observables sur tous les substrats: la lame de verre et les 4 variantes de biomatériaux testés, (Figure 41, Figure 42). Ces fibres sont particulièrement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



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

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



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

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

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

### **IV.2.2.2 Apoptose et viabilité cellulaire**

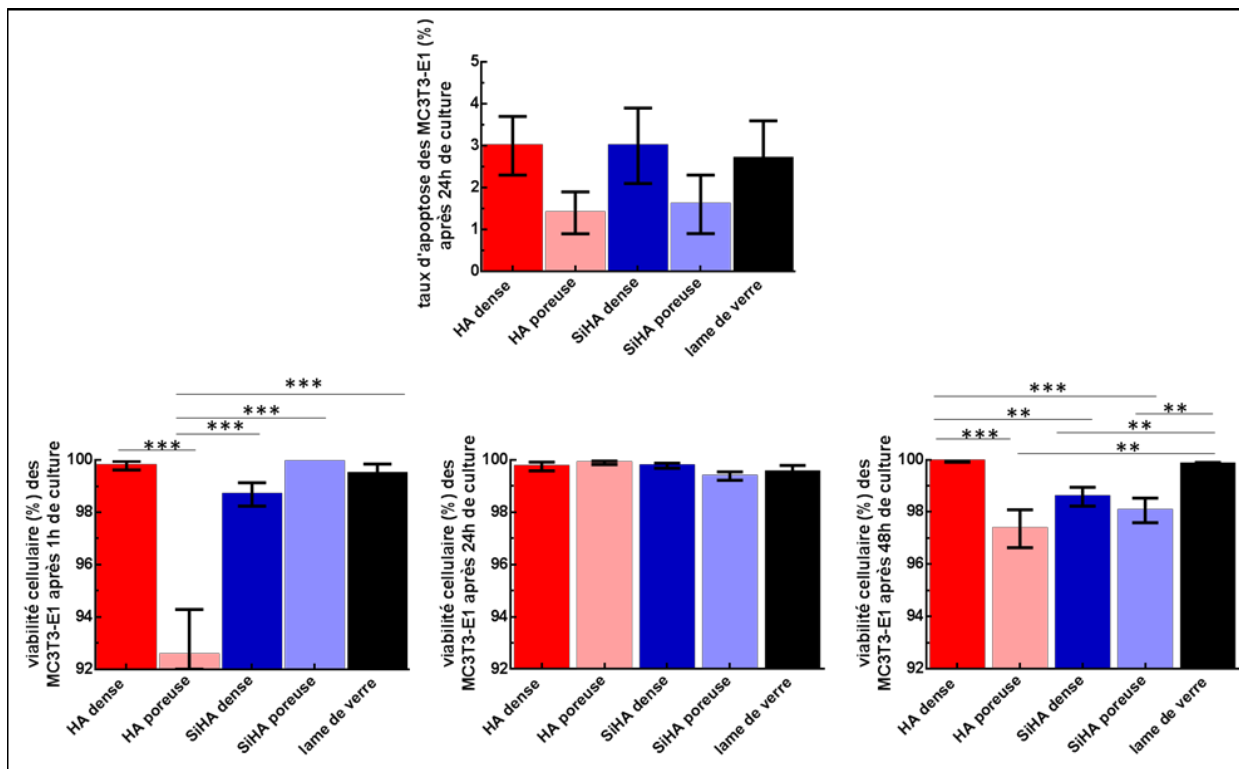
La présence de contact cellulaire et d'adhésion focales, permet d'affirmer que les cellules interagissent avec le matériau. Cependant, il reste à évaluer le comportement de celles-ci à l'aide de tests de viabilité et de tests fonctionnels cellulaires.

#### **IV.2.2.2.1. Mesure de l'apoptose cellulaire**

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

#### **IV.2.2.2.2. Test de la calcéine**

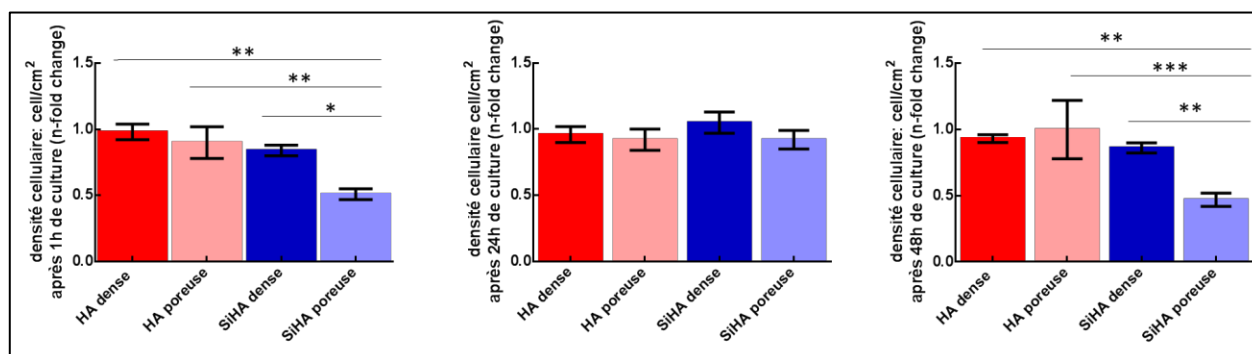
A 1 h, le biomatériau HA poreux a montré un taux de viabilité significativement plus faible que toutes les autres conditions testées. A 24 h, le taux de viabilité était très élevé, (quasi égal à 100%) et du même ordre de grandeur sur tous les biomatériaux, y compris sur la lame de verre. A 48 h, la viabilité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



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

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

#### IV.2.2.2.3. Densité cellulaire

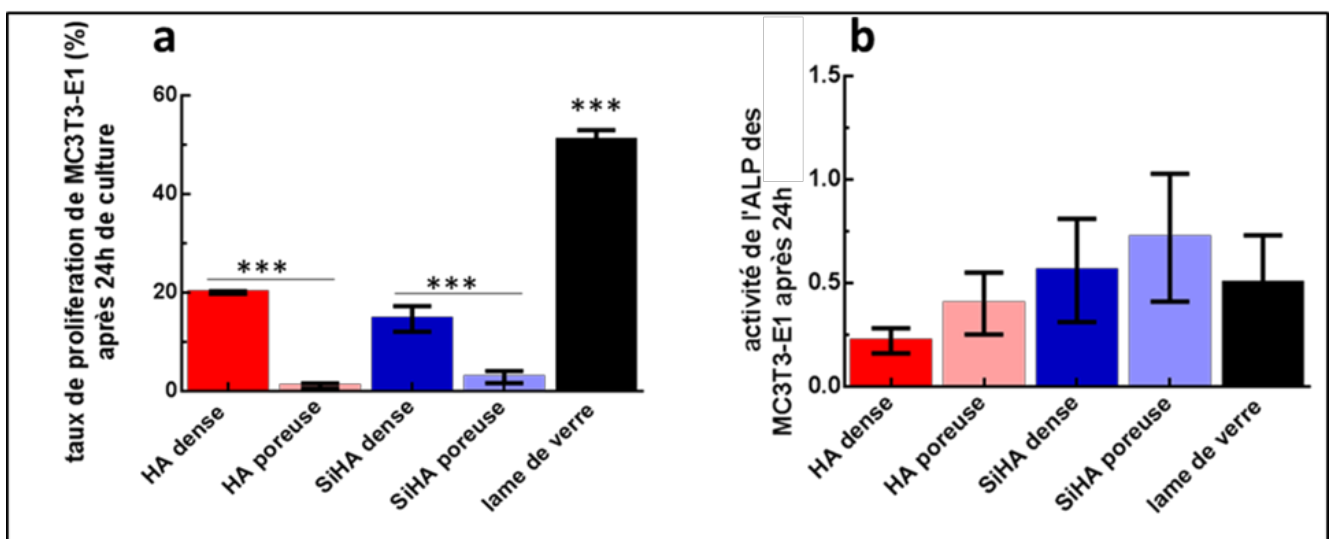


**Figure 47** : densité cellulaire en surface des biomatériaux sur la cinétique d'1 h, 24 h et 48 h.

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

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

#### IV.2.2.2.4. Tests fonctionnels



**Figure 48** : analyse fonctionnelle des cellules.

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

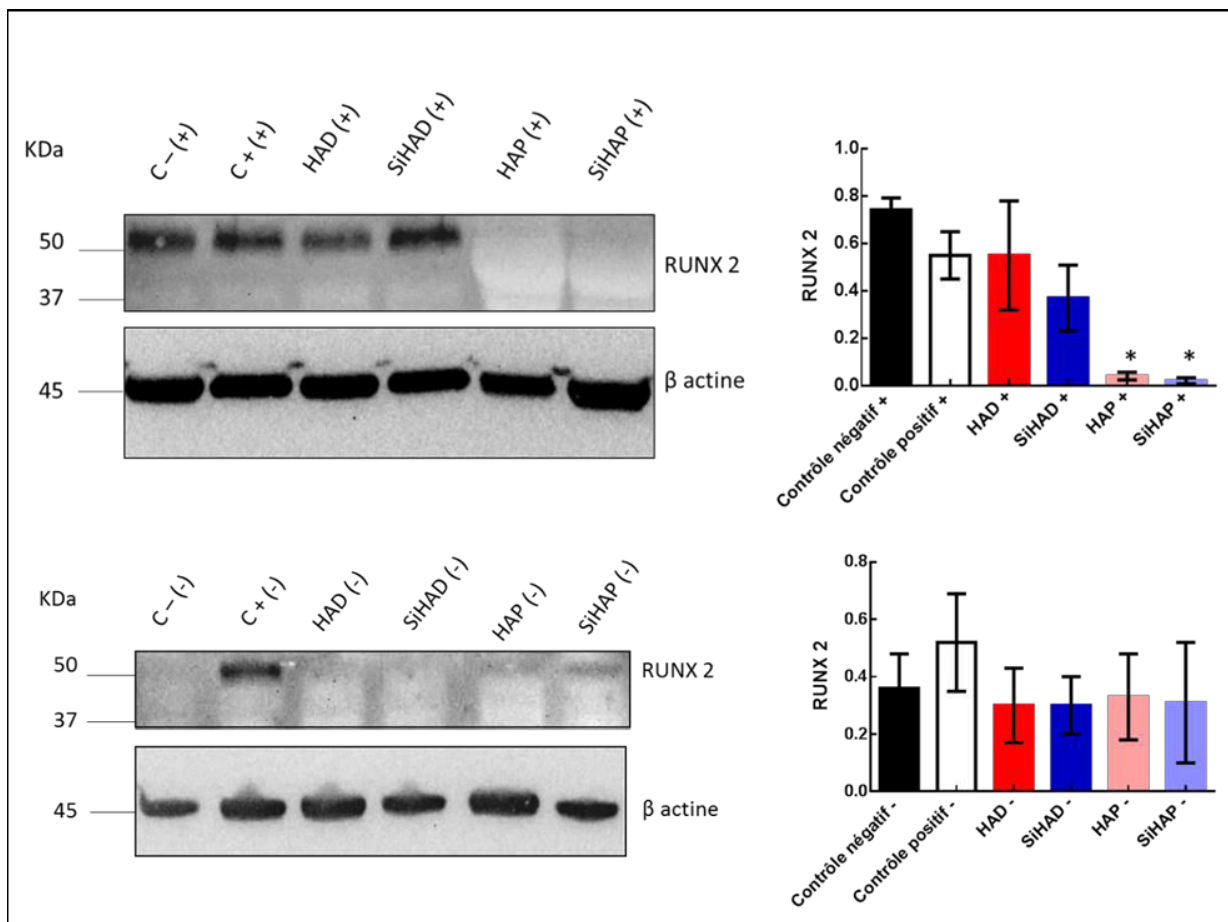
La prolifération cellulaire était significativement supérieure sur les biomatériaux denses et la lame de verre, comparée aux matériaux poreux, (Figure 48 a), tandis qu'à 24 h, les niveaux d'activité de l'ALP étaient similaires entre les différents matériaux, (Figure 48 b). La mesure de l'ALP permet d'évaluer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

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

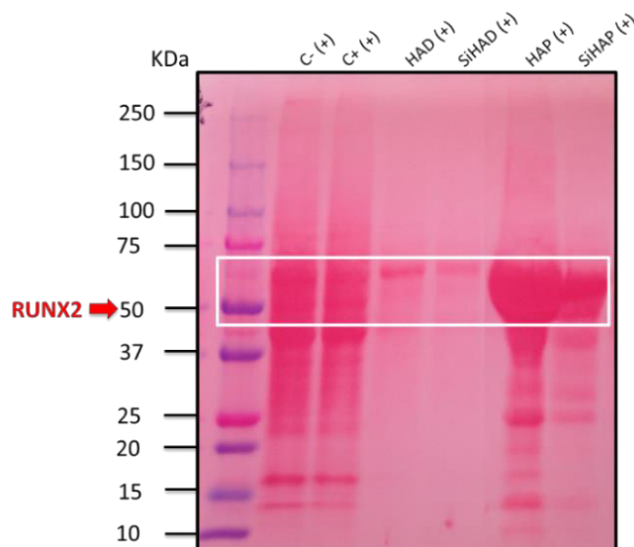
##### IV.2.2.2.5.1. Analyse de l'expression de protéines ostéogéniques selon la nature du biomatériau

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

##### IV.2.2.2.5.1.1. RUNX2



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



**Figure 50** : membrane marquée au rouge ponceau

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

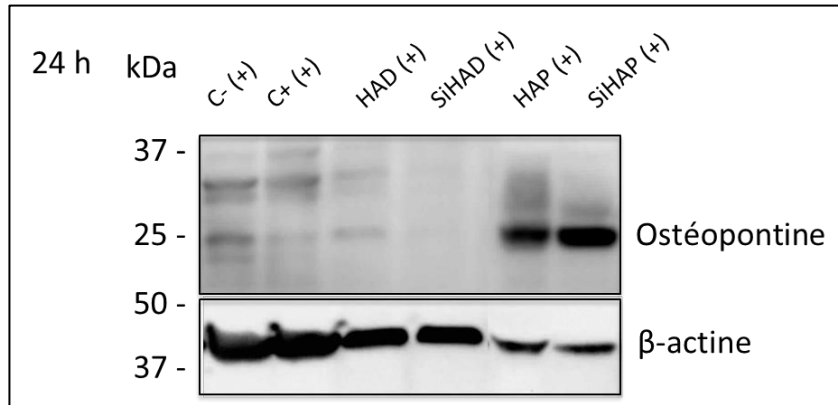
A 7 jours, la protéine RUNX2 n'était pas exprimée sur les pastilles poreuses d'HA et de SiHA, alors qu'elle l'était sur les pastilles denses de HA et de SiHA, tout comme elle l'était sur le plastique, dans le milieu de croissance, (contrôle négatif) et dans le milieu de différenciation, (contrôle positif).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

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

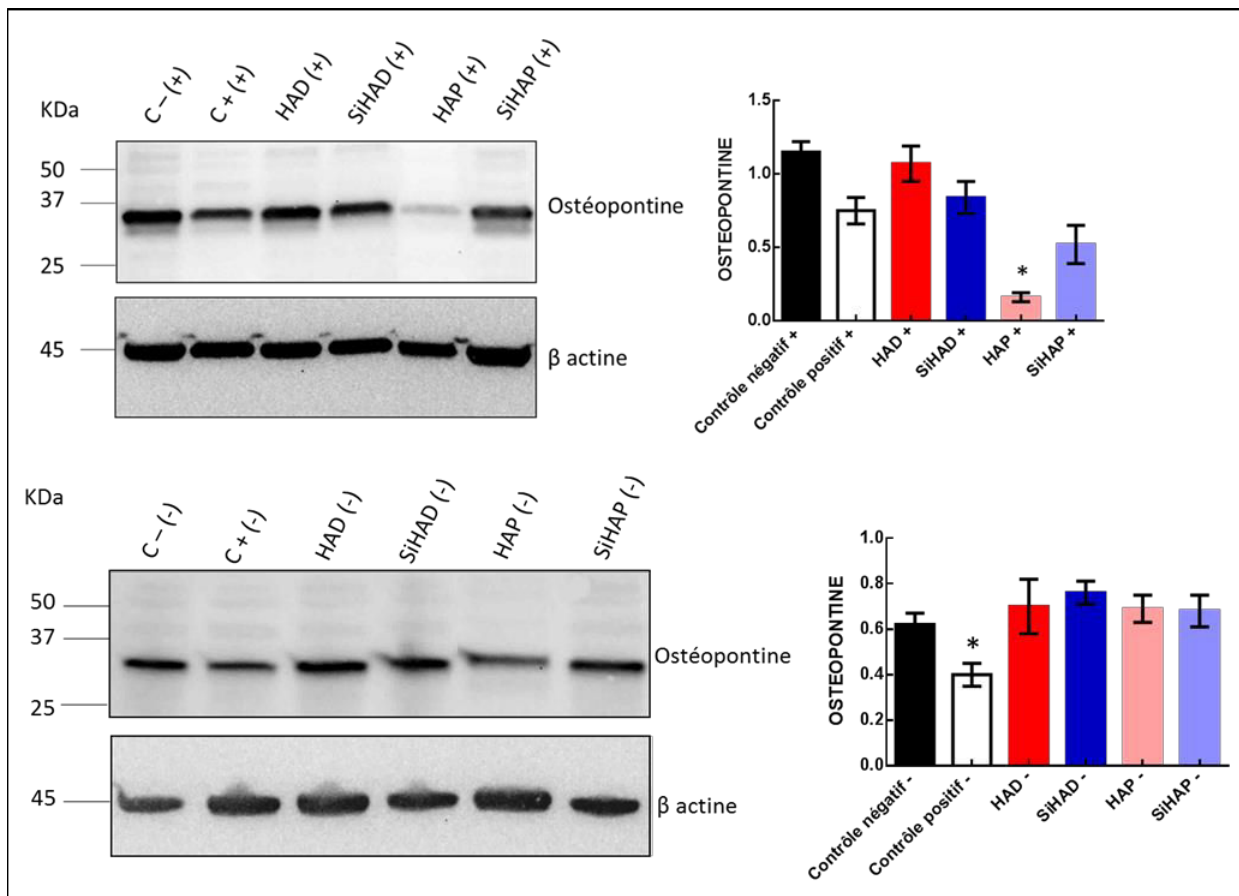


#### IV.2.2.2.5.1.2. Ostéopontine

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



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

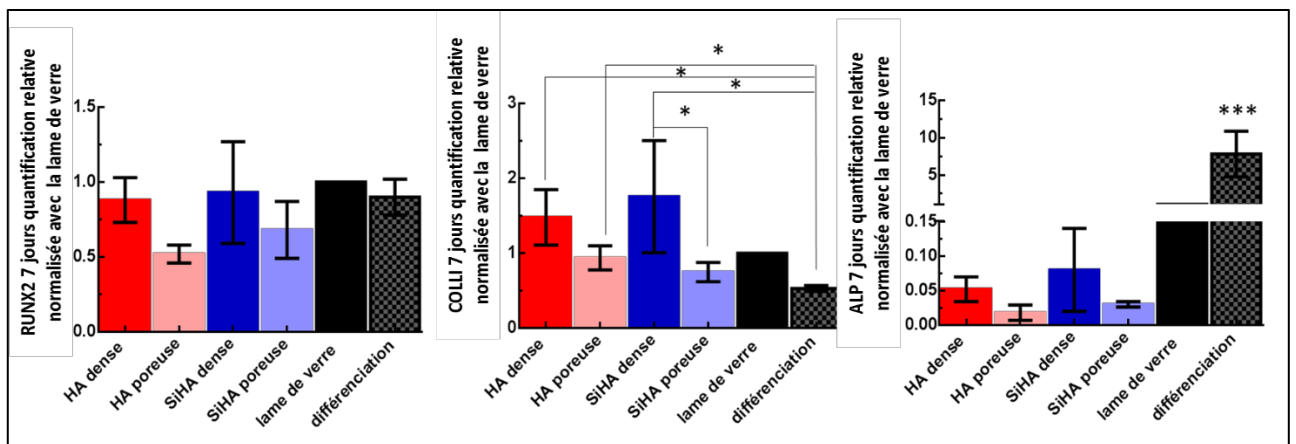


**Figure 52** : expression protéique d'ostéopontine, par les cellules cultivées sur les pastilles, pendant 7 jours (+) et celles cultivées sur le plastique, autour des pastilles, pendant 7 jours (-). La quantification a été normalisée par la protéine β actine.

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

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

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



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

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

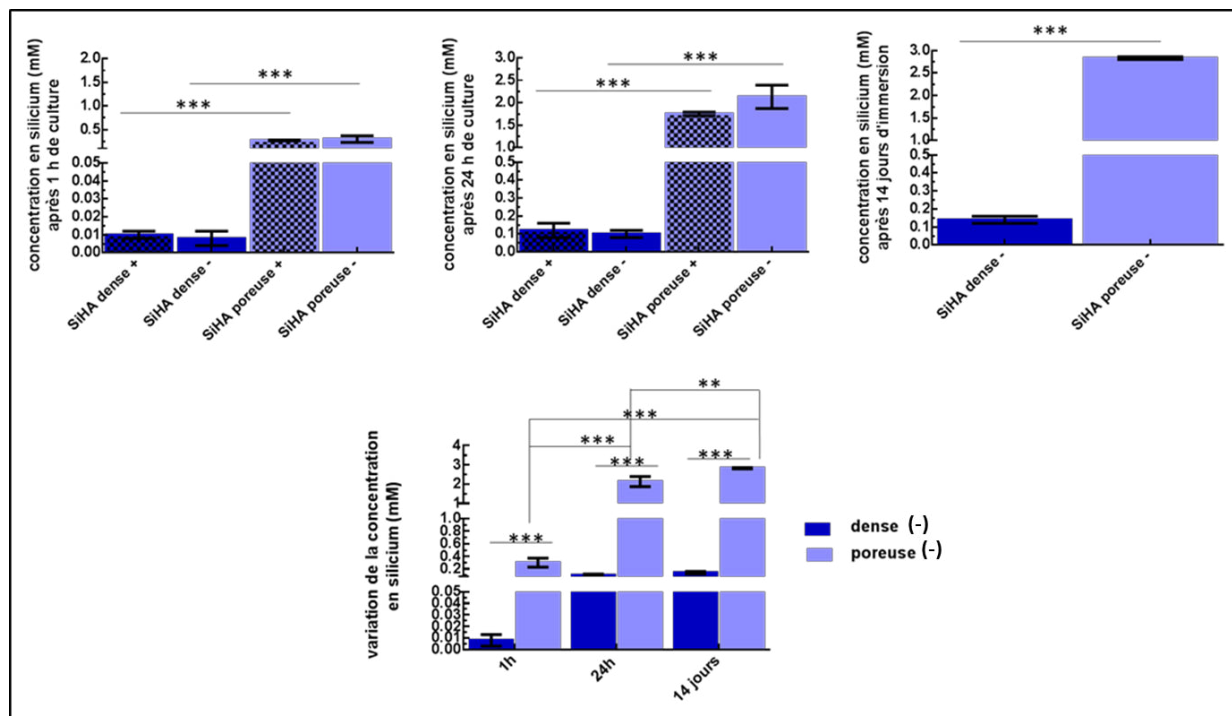
On ne peut parler que de tendance quant à l'expression de RUNX2 et d'ALP car les différences ne sont pas significatives et empêchent d'émettre des conclusions quant à l'influence de la microstructure et de la composition chimique. Par contre, il y a eu une différence significative de l'expression du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

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

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

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

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

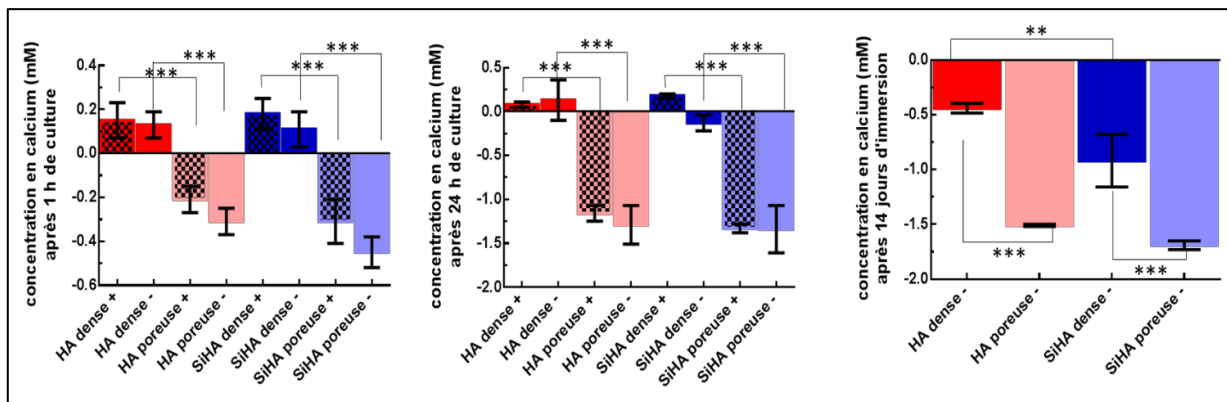


**Figure 54** : cinétique de relargage de l'élément silicium dans le milieu de culture complet par les pastilles SiHA denses et poreuses cultivées (+) ou non (-) avec des MC3T3-E1

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

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

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



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

Des mesures d'élément calcium libéré dans le milieu de culture ont également été réalisées, (Figure 55). Comme il a été montré précédemment que le silicium n'a pas précipité, il a pu être utilisé comme traceur pour suivre la libération en calcium par les pastilles. Selon la formule théorique de l'hydroxyapatite silicatée :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$ , pour 0,4 mol de silicium relargué, 25 fois plus de calcium devrait l'être. Ainsi, si à 1 h, 0,01 mM de silicium a été libéré par les pastilles SiHA dense, une augmentation de 0,25 mM de calcium aurait du être trouvée dans le milieu de culture. Cette concentration aurait également du augmenter 50 fois plus à 24 h et atteindre les 12,5 mM et se stabiliser. A 1 h, 0,2 mM de calcium a été retrouvé dans le milieu de culture des pastilles SiHA denses, ce qui se rapproche de la valeur théorique attendue. Par contre, à 24 h, elle est très inférieure à la valeur théorique attendue, ce qui a prouvé une précipitation du calcium à la surface des pastilles.

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

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

### **IV.2.3. Discussions**

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

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

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

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

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

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

#### **IV.2.3.2 Biocompatibilité**

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

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

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



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

##### **IV.2.3.2.1.1. Prolifération et différenciation cellulaire**

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

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

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

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

### **Expression des marqueurs ostéogéniques**

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

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

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

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

## IV.2.4. Conclusion de l'étude

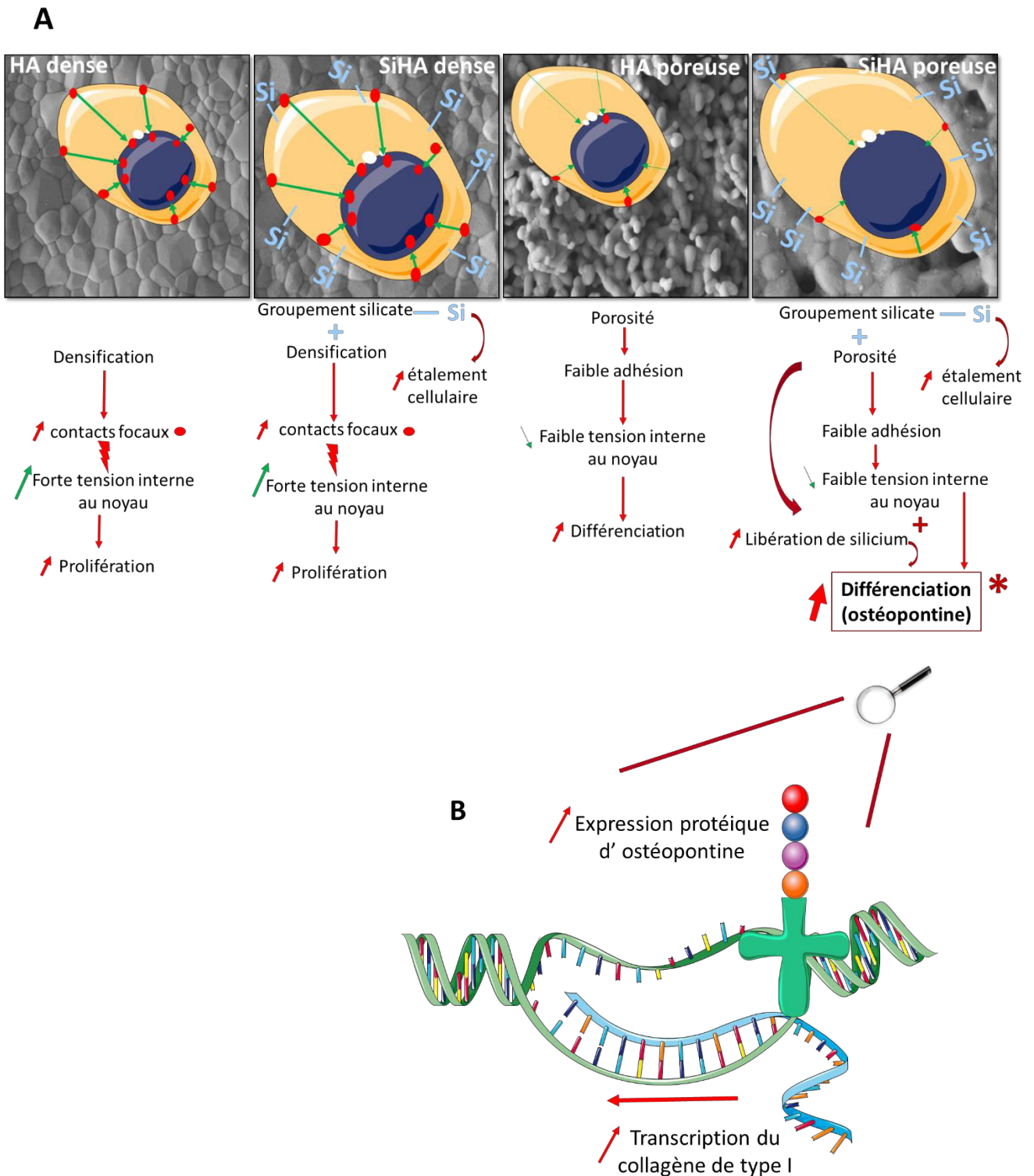
Cette étude a montré que la première étape d'attachement des cellules est influencée par la microstructure des biomatériaux, quelle que soit la composition chimique. La microstructure dense s'est avérée plus avantageuse pour l'adhésion cellulaire. En effet, après 1 h, les cellules ont développé des contacts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

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

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

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

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



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

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

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

### **IV.3.1. Contexte et objectif de l'étude**

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

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

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



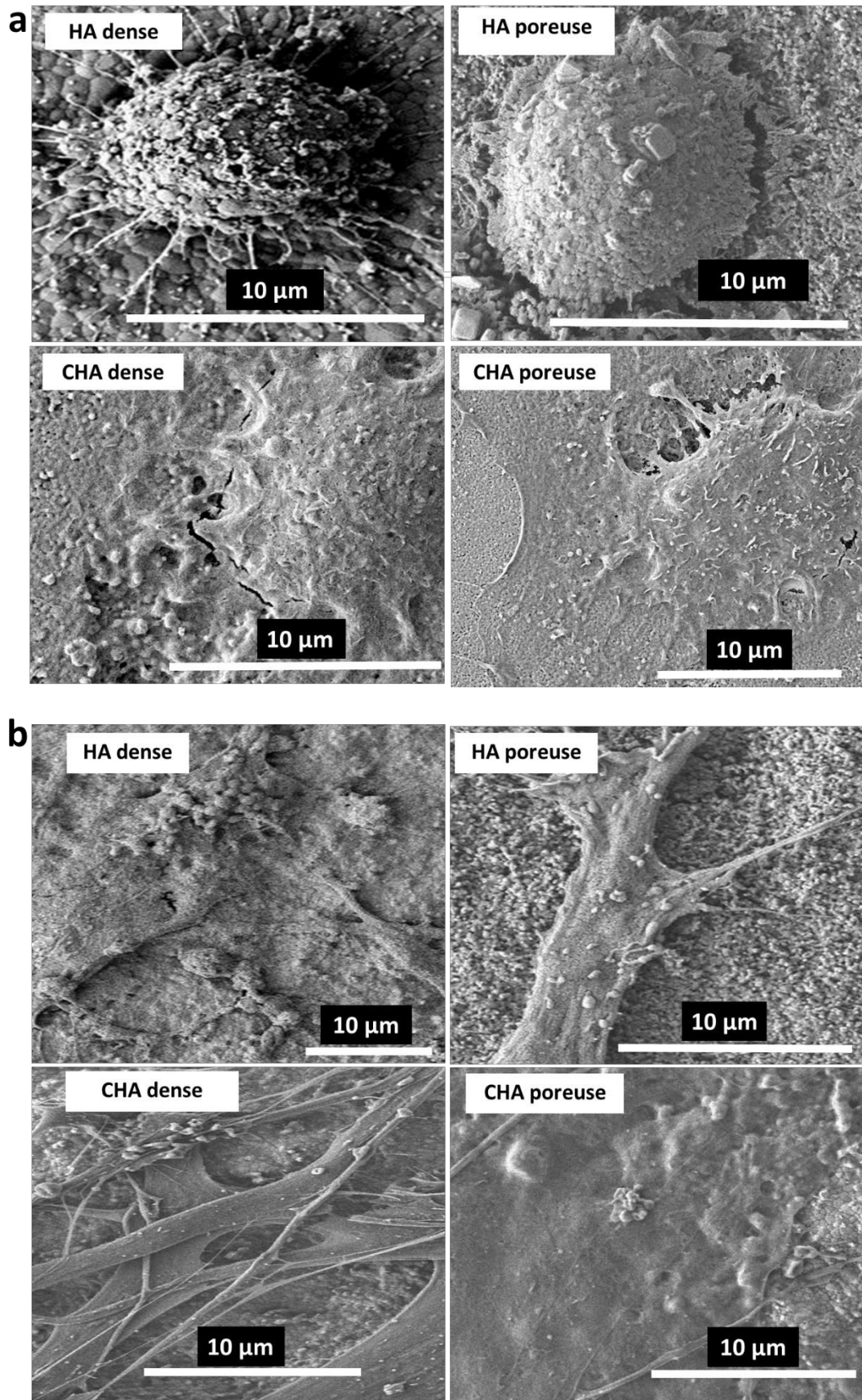
déterminer si le biomatériau CHA :  $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,08}(\text{CO}_3)_{0,23}$  possédait des propriétés supérieures au biomatériau HA en matière d'induction de la régénération osseuse.

## **IV.3.2. Résultats**

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

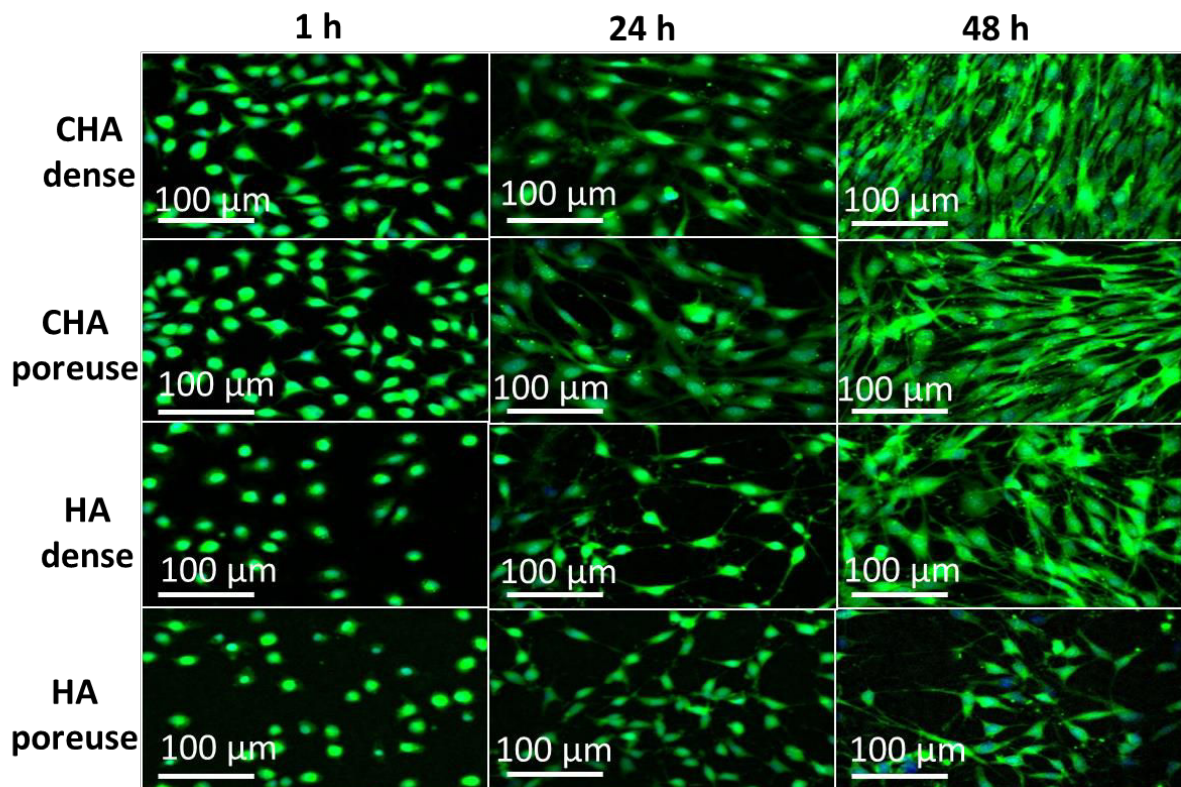
#### **IV.3.2.1.1. Morphologie, densité et viabilité cellulaires**

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



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

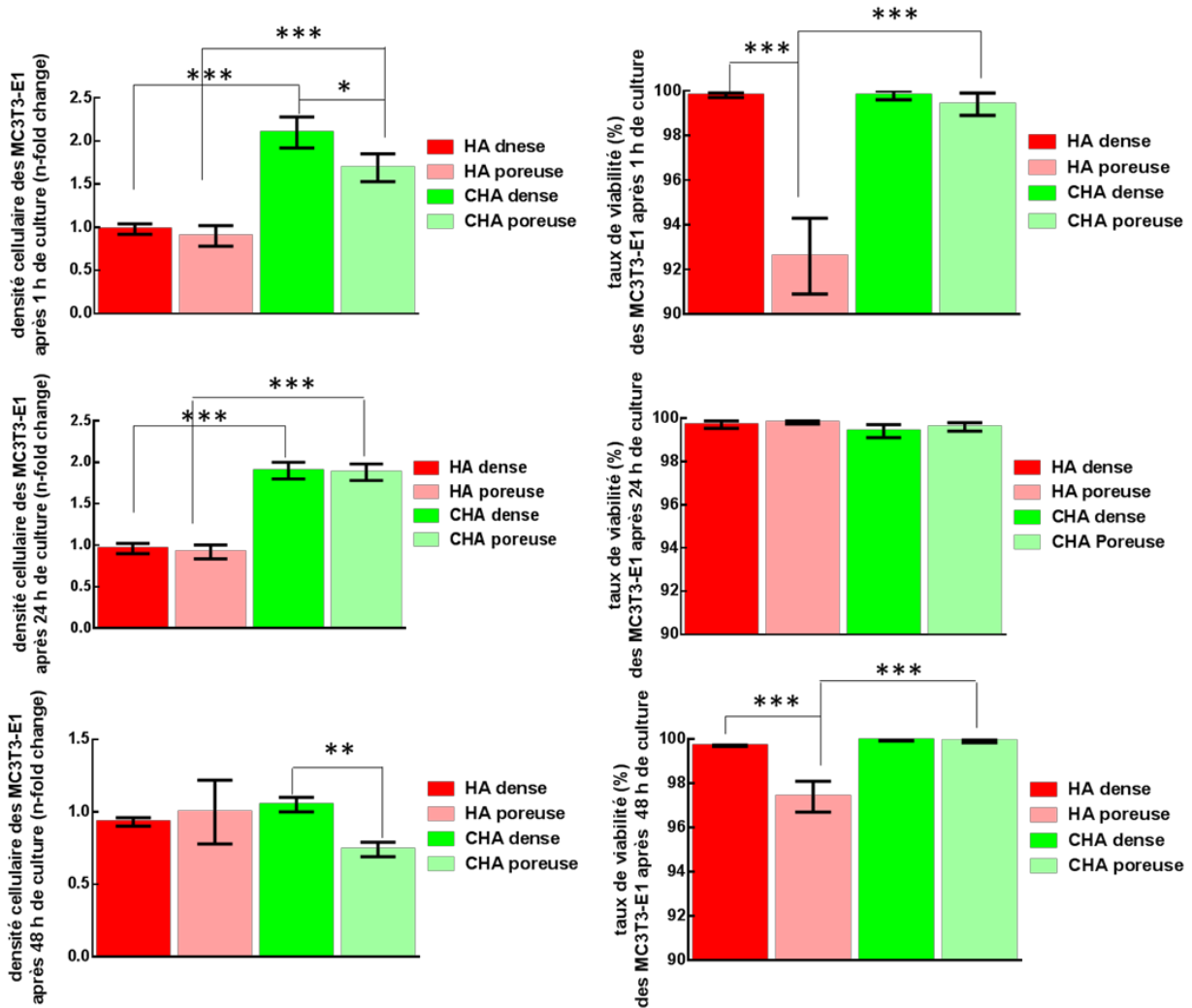
Les MC3T3-E1 cultivées au contact des 4 variantes de biomatériaux, après 1 h et 24 h de culture, formaient une couche cellulaire homogène à la surface des pastilles et positive pour le marquage à la calcéine. A 24 h, le corps cellulaire était plus allongé, avec des extensions membranaires : les filopodes.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



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

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

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



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

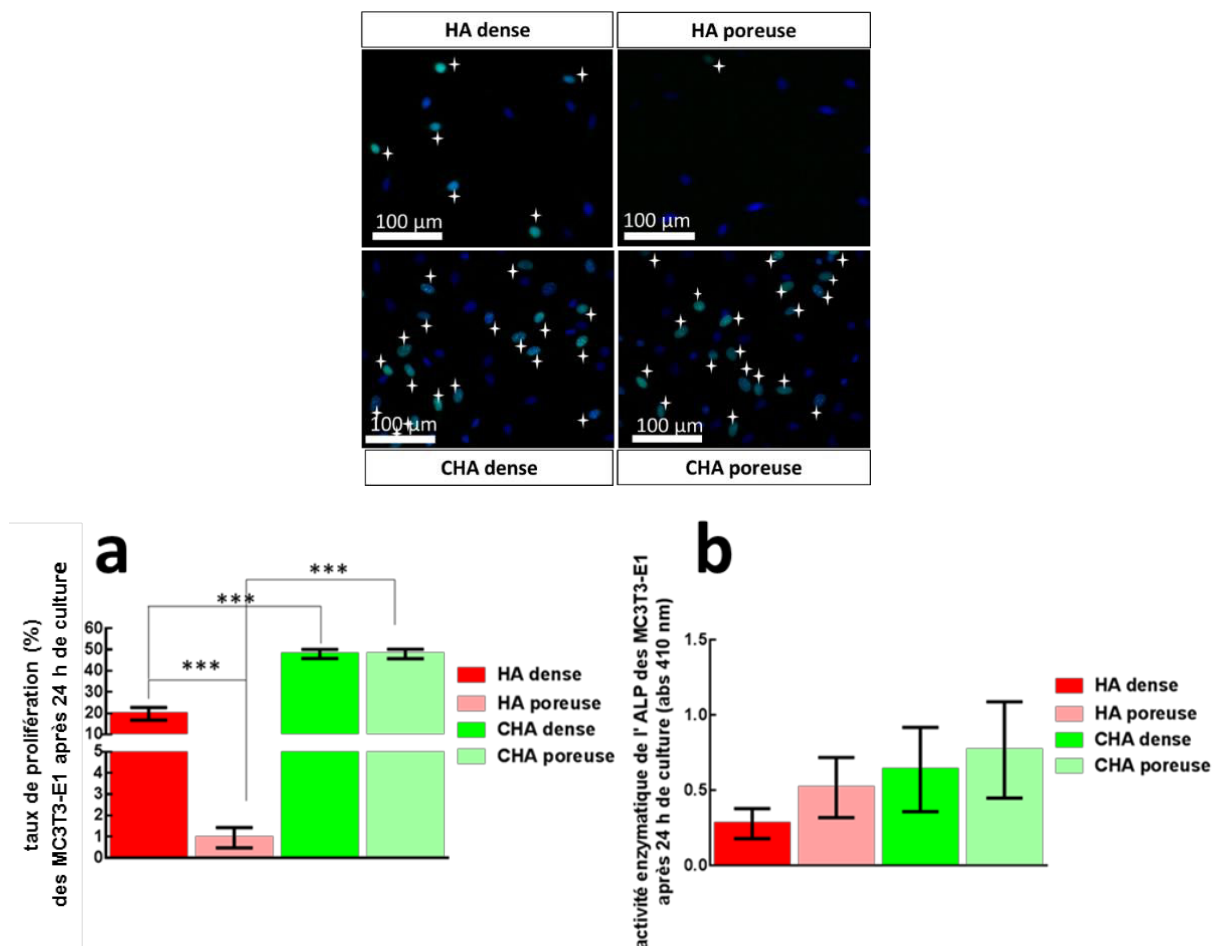
La densité et la viabilité cellulaire ont été analysées sur 10 images x 3 pastilles, soit 30 images. Le résultat est une moyenne  $\pm$  SD. La densité cellulaire est normalisée par la valeur du contrôle : la lame de verre. (Sur l'axe en ordonnée le *n-fold change* est exprimé par rapport à la lame de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

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

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

#### IV.3.2.1.2. Tests fonctionnels

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

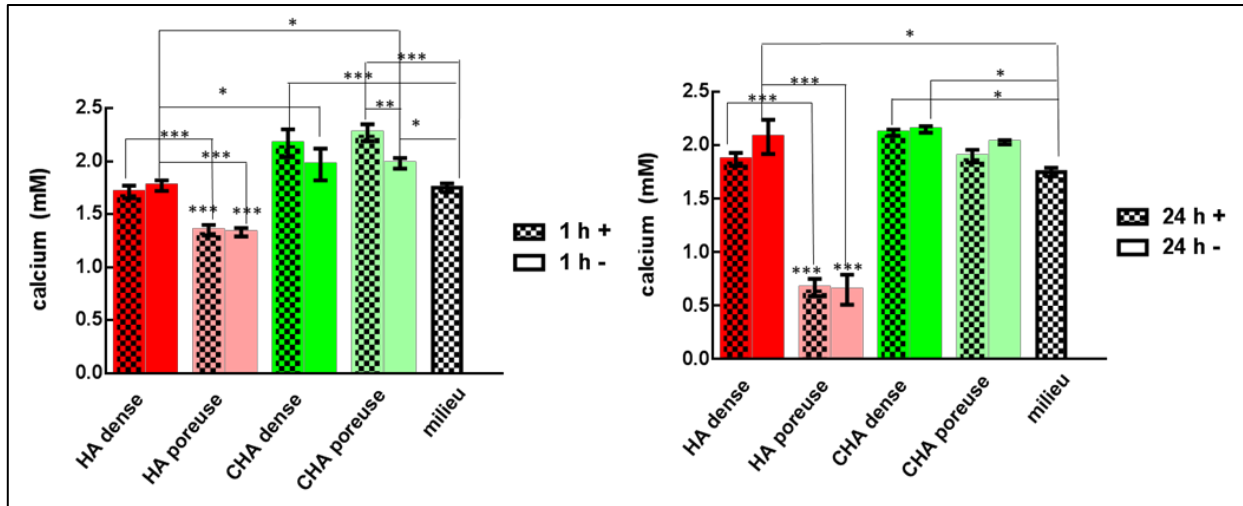


**Figure 60** : analyses fonctionnelles (prolifération et différenciation) des MC3T3-E1, cultivées 24 h sur les biomatériaux.

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

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

#### IV.3.2.2 Mesure en calcium du milieu de culture



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

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

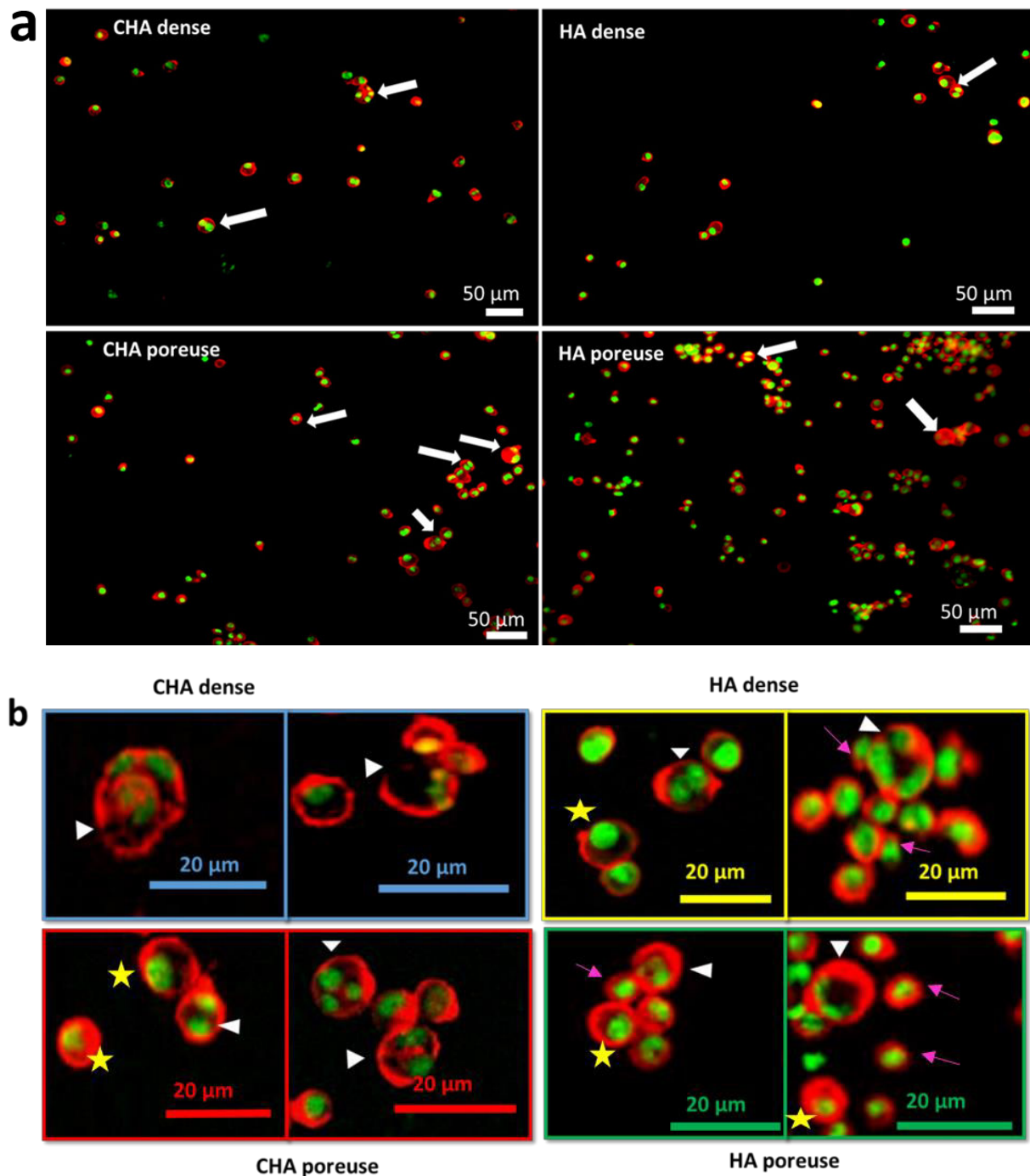
En comparant le calcium dans le milieu de culture des 4 biocéramiques,ensemencées ou non avec des cellules, il peut être constaté que le niveau de calcium n'est pas significativement différent, en présence et en l'absence de cellules, excepté pour CHA poreux. A 1 h, significativement plus de calcium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

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

#### **IV.3.2.3.1. Adhésion et différenciation cellulaire**

##### ***IV.3.2.3.1.1. Immunofluorescence***

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

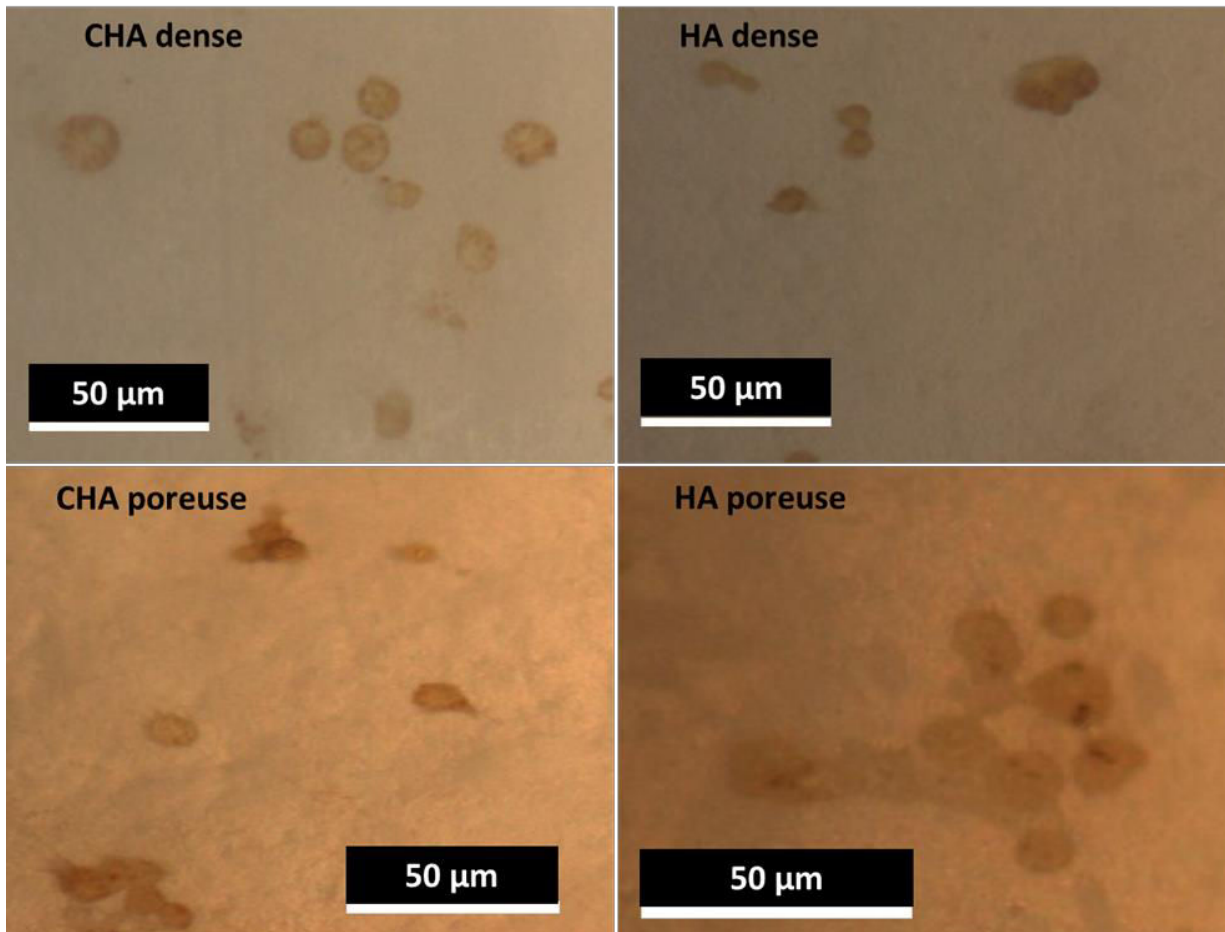


**Figure 62** : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7 cultivées sur les biomatériaux dans le milieu différenciant (M-CSF et RANK-L) après 14 jours de culture. a) faible grossissement (X10) et b) zoom sur une cellule multinucléée

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



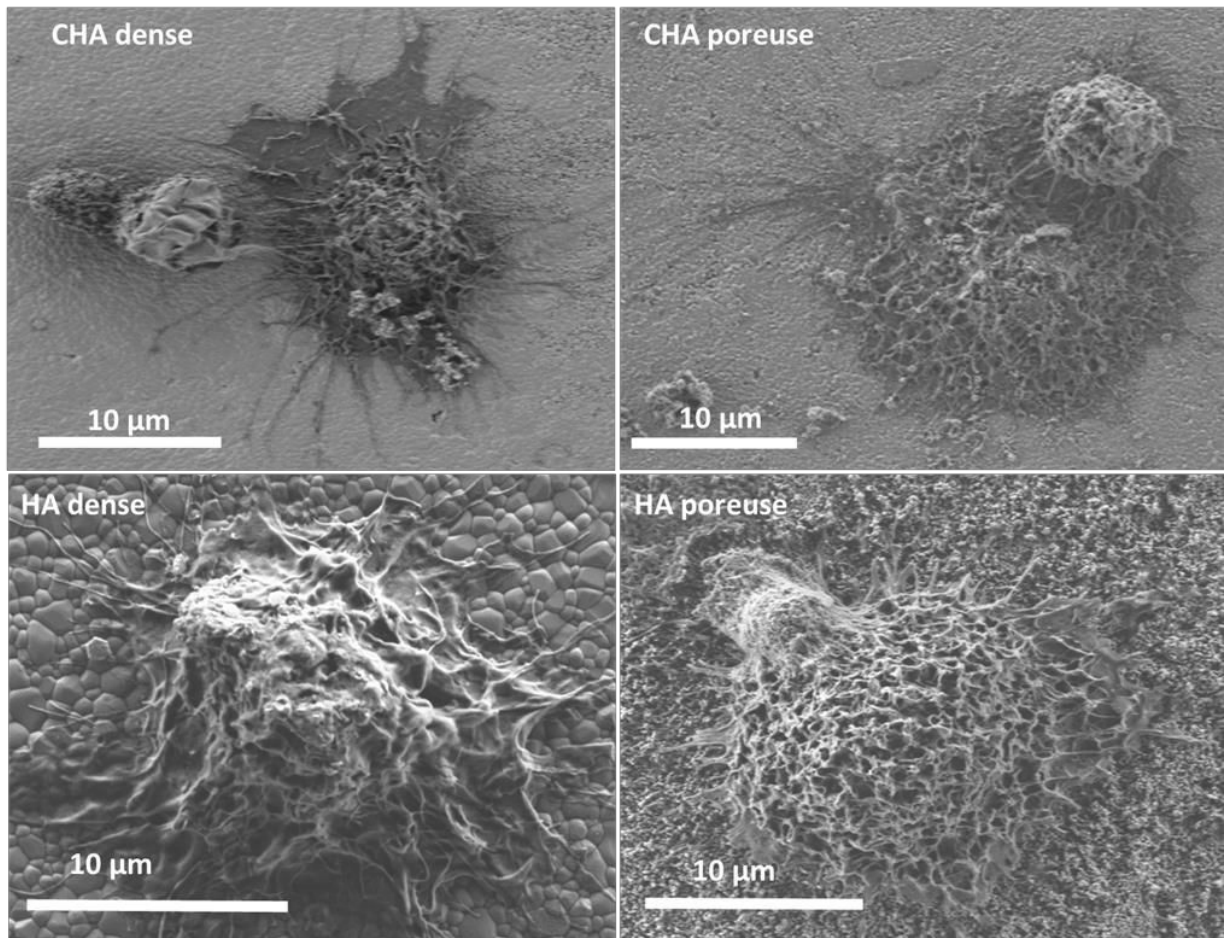
TRAP est une enzyme exprimé par les ostéoclastes. Le marquage des cellules pour TRAP est un test couramment utilisé pour vérifier la différenciation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes (paragraphe III.2.6.4.1). Le marquage des cellules pour TRAP, a confirmé que les cellules multinucléées observées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



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

#### **IV.3.2.3.1.2. MEB**

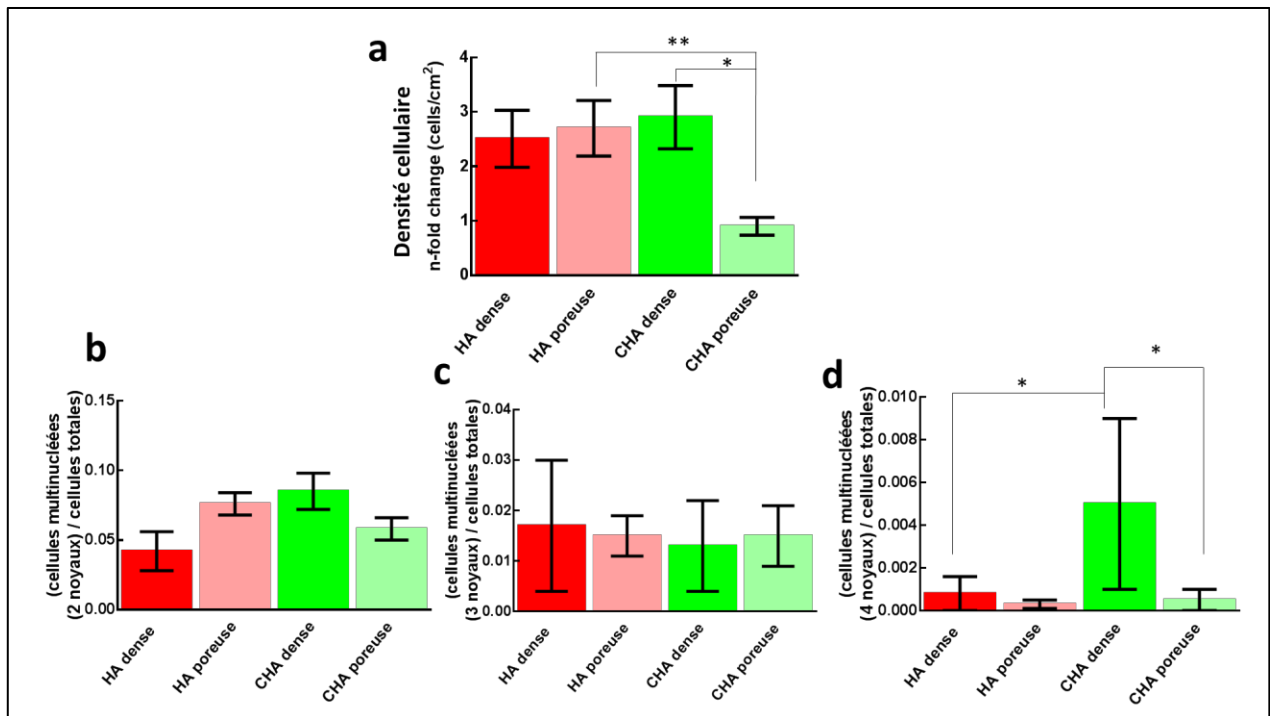
Les images en MEB ont confirmé la présence d'ostéoclastes en montrant la morphologie typique de ces cellules ([Figure 10](#)). Le dôme polarisé au pôle apical des cellules (sorte de rugosité) a pu être observé. La bordure en brosse localisée tout autour des cellules et la zone de scellement entre la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



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

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

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



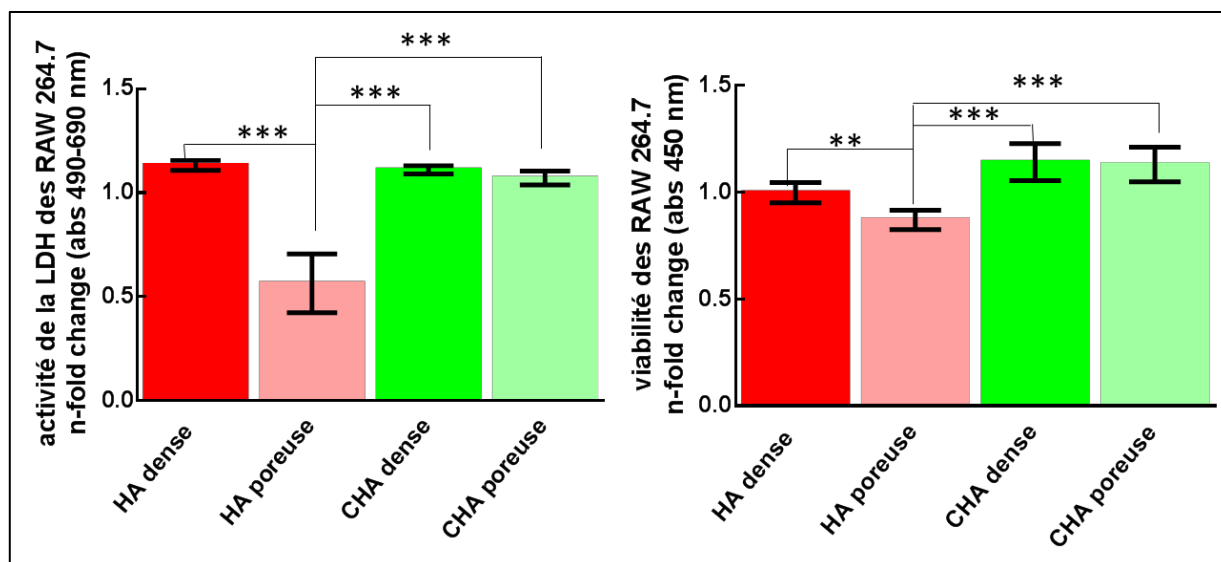
**Figure 65** : analyse de la densité cellulaire et de la différenciation des cellules RAW 264.7. a) densité cellulaire et b), c), d), nombre de cellules multinucléées.

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

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

#### IV.3.2.3.2. Viabilité cellulaire

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



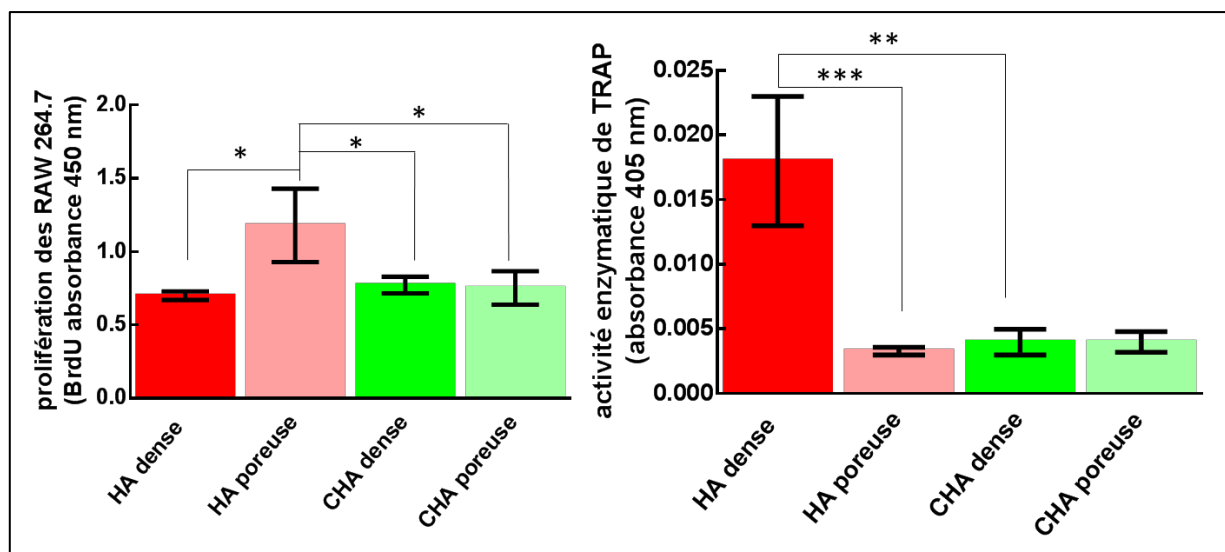
**Figure 66** : tests de viabilité des RAW 264.7.

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

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

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

#### IV.3.2.3.3. Tests fonctionnels



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

**Les histogrammes représentent la moyenne de 3 ou 6 réplicats indépendants  $\pm$  SD.**

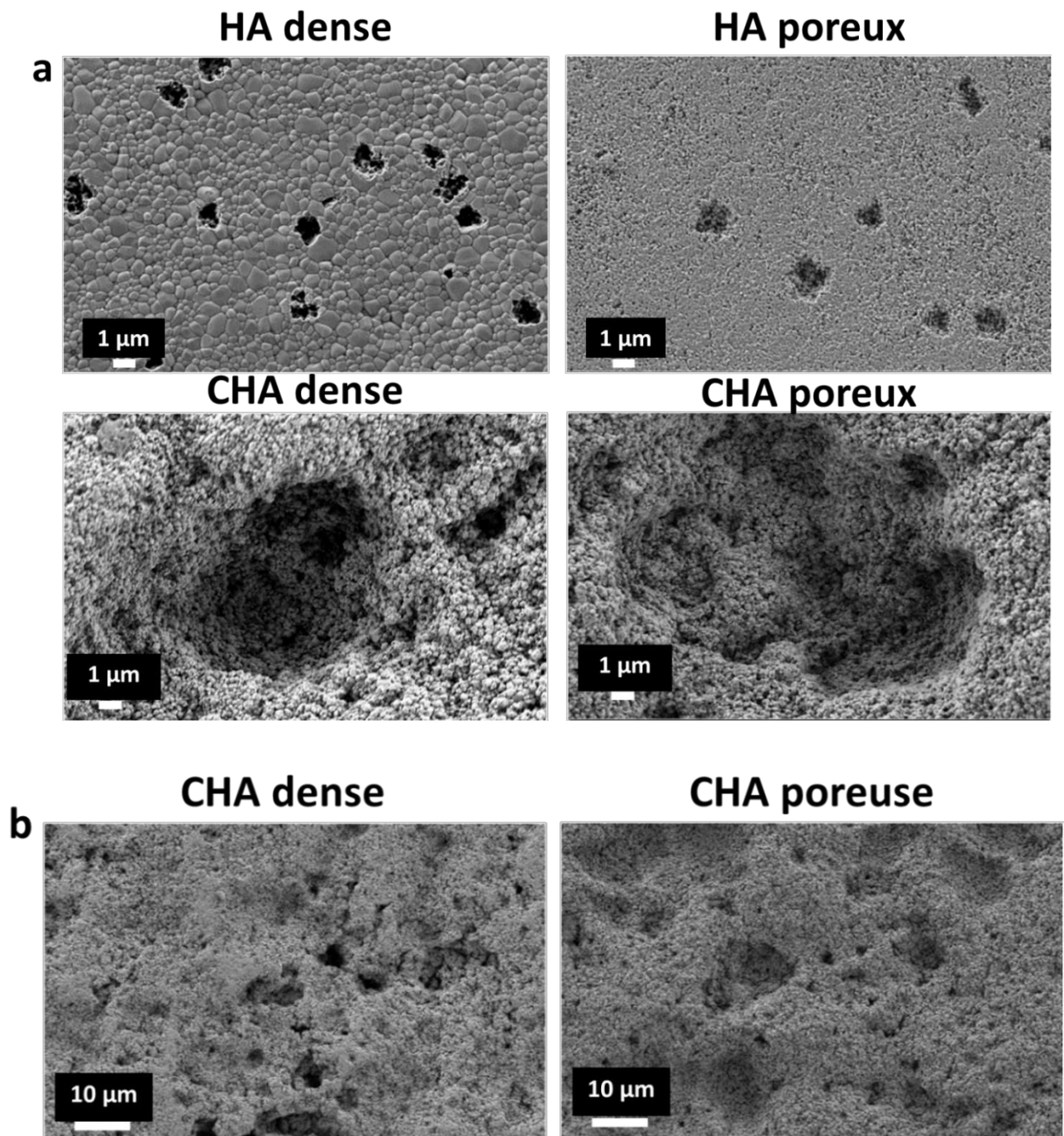
Le taux de prolifération était similaire sur tous les biomatériaux. Aucune différence significative n'a été constatée entre les biomatériaux. Le taux était légèrement inférieur à celui du contrôle interne : la lame de verre, pour les biomatériaux HA denses et CHA, quelle que soit la microstructure. Le taux était similaire entre les biomatériaux HA poreux et la lame de verre, avec une absorbance respective de  $0,99 \pm 0,13$  et  $0,99 \pm 0,16$ .

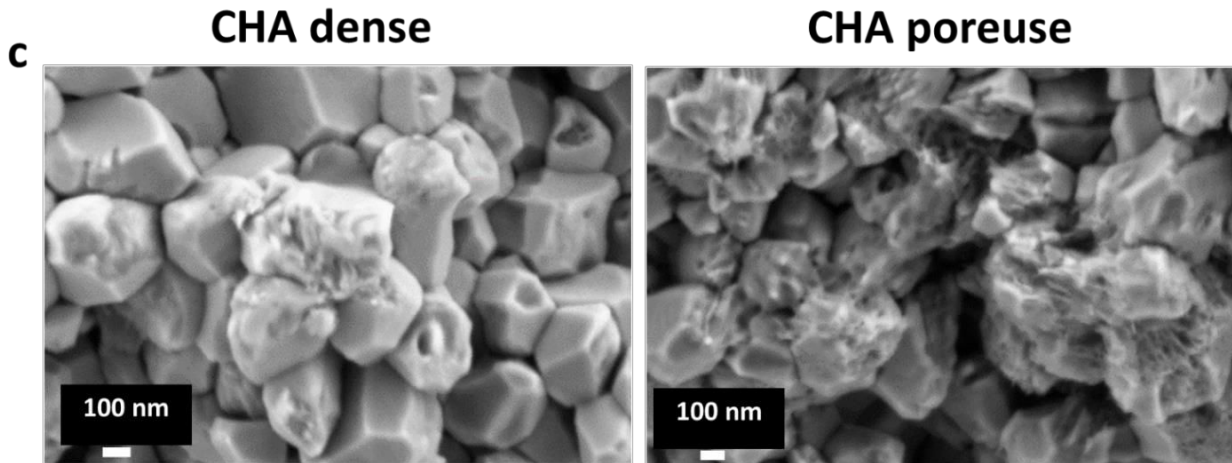
Concernant, l'activité enzymatique de TRAP 5b, elle était significativement supérieure sur HA dense, en comparaison des autres biomatériaux. La valeur d'absorbance était près de trois fois supérieure à tous les autres biomatériaux, mais restait, cependant, très faible et égale à  $0,018 \pm 0,005$ . Dans le cas du biomatériau HA poreux, le taux de prolifération est maximum tandis que l'activité enzymatique de TRAP 5b est la plus faible de toutes les valeurs mesurées pour les différents biomatériaux (Figure 67).

#### IV.3.2.3.4. Biorésorption

Des lacunes de résorption ont pu être observées sur tous les biomatériaux. Par contre, la morphologie des lacunes était différente en fonction de la composition. Sur les biomatériaux HA, quelle que soit la microstructure, de petites lacunes de résorption aux contours bien délimités, ont pu être observées. Sur les biomatériaux CHA, quelle

que soit la microstructure, des lacunes de taille 10 fois supérieure avec des contours irréguliers ont été observées, (Figure 68 a). En considérant des images à plus faible grossissement, il est possible de constater que sur les biomatériaux CHA, la totalité de la surface est endommagée de façon homogène avec des lacunes de tailles différentes, (Figure 68 b). Un grossissement supérieur a permis de constater l'altération de la surface des grains (Figure 68 c).

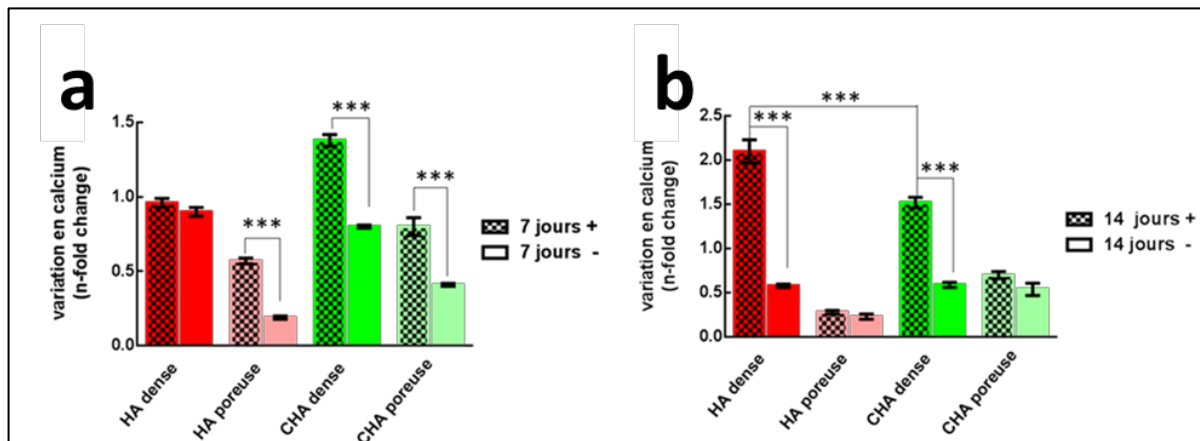




**Figure 68** : images en MEB des lacunes de résorption sur la surface des pastilles après 14 jours de culture

#### IV.3.2.3.5. Mesure du calcium et du pH dans l'environnement

##### IV.3.2.3.5.1. Mesure du calcium



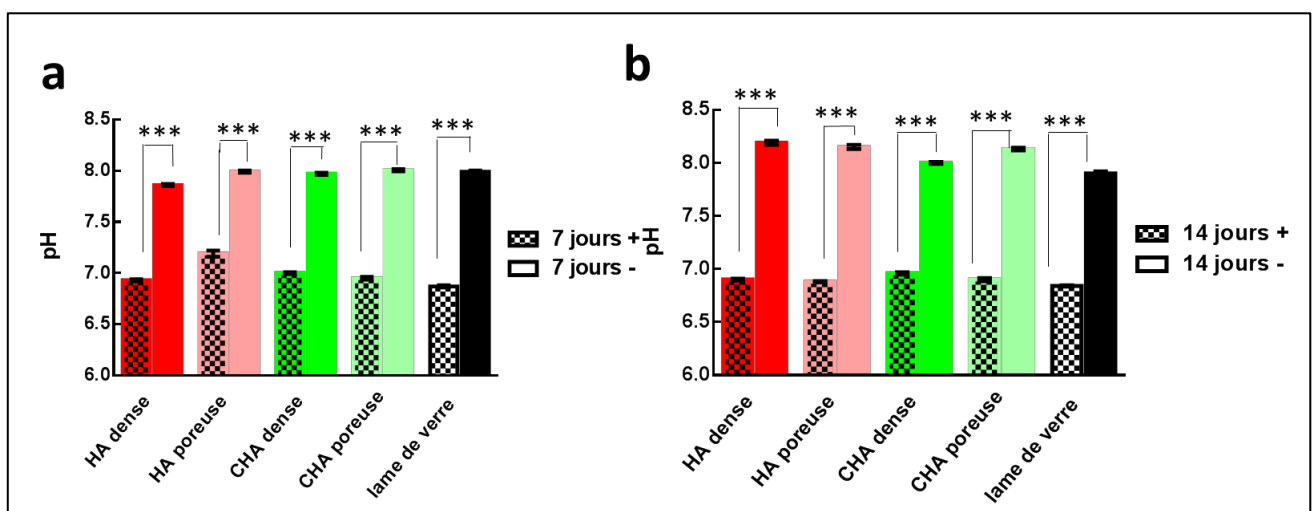
**Figure 69** : variation de la concentration en calcium du milieu sur les biomatériaux, cultivés avec les cellules RAW 264.7, pendant 7 jours (7 jours +) et 14 jours (14 jours +), ou sur les biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours (7 jours -) et 14 jours (14 jours -).

La mesure a été normalisée par rapport à la valeur obtenue pour le contrôle, (la lame de verre). (Les valeurs n-fold change indiquées sur l'axe des ordonnées sont normalisées par rapport à la lame de verre). Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes  $\pm$  SD.

A 7 jours, la concentration en calcium du milieu de culture sans cellule était significativement inférieure à celle contenant les cellules, pour CHA, quelle que soit la microstructure et pour HA poreuse. Par contre, les niveaux de calcium du milieu de culture avec et sans cellule étaient similaires pour HA dense (Figure 69 a). A 14 jours,

la concentration en calcium du milieu de culture pour HA dense avec cellules avait doublé, par rapport au contrôle, alors que celle du milieu de culture sans cellule, avait diminué. A 14 jours, en comparant les concentrations calciques des milieux de culture avec ou sans cellule, aucune différence significative de concentration calcique n'a été observée pour les matériaux HA et CHA, de microstructure poreuse. Par contre, pour les matériaux denses, quelle que soit la composition chimique, la concentration du milieu avec cellules était significativement supérieure, comparée à la concentration sans cellule, (Figure 69 b).

#### IV.3.2.3.5.2. Mesure du pH



**Figure 70** : mesure du pH du milieu de culture des biomatériaux cultivés avec les cellules, pendant 7 jours (7 jours +), ou pendant 14 jours (14 jours +), ou bien du milieu de culture des biomatériaux seuls, sans cellule, pendant 7 jours (7 jours -), ou pendant 14 jours (14 jours -).

**Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes  $\pm$  SD.**

A 14 jours, pour tous les biomatériaux, quelle que soit la composition chimique et la microstructure, une valeur de pH plus acide dans le milieu de culture contenant les cellules, comparée au milieu de culture n'en contenant pas, a été observée, (Figure 70 b). Le pH du milieu avec cellules, est allé en s'acidifiant au cours du temps, de 7 à 14 jours, pour les biomatériaux, quelle que soit la composition chimique. Il est passé de 8 à 7. En revanche, le pH s'est basifié au cours du temps, de 7 à 14 jours, pour les milieux de culture sans cellule.



### **IV.3.3. Discussions**

#### **IV.3.3.1 Réponse cellulaire ostéoblastique au contact des biomatériaux**

La substitution en carbonate dans l'hydroxyapatite a favorisé l'augmentation de la densité cellulaire précocement, dès 1 h et 24 h de culture. A 48 h, la stabilisation de la densité cellulaire, sur tous les biomatériaux, pourrait être expliquée par le mécanisme d'inhibition de contact. La croissance cellulaire a été plus rapide sur CHA, quelle que soit la microstructure et s'est stabilisée par la suite, faute de surface libre. La densité cellulaire a augmenté plus tardivement sur HA, quelle que soit la microstructure et a rattrapé le taux de densité cellulaire observée sur les CHA. Lorsque les cellules commençaient à être confluentes, la croissance cellulaire a été stabilisée. A 48 h, la croissance cellulaire sur CHA poreuse, par rapport à CHA dense, a été ralentie. Les tests fonctionnels réalisés à 24 h, (prolifération et différenciation cellulaire), ont corroboré la tendance des résultats précédents sur la densité cellulaire. L'augmentation de la densité cellulaire sur CHA est indépendante de la microstructure des biomatériaux et reflète l'augmentation de la prolifération. Les résultats de l'activité enzymatique de l'ALP ont confirmé que des cellules qui prolifèrent ne se différencient pas, (Shi et al., 2015). Ces résultats permettent également d'expliquer qu'à 48 h, moins de cellules avaient été comptées sur CHA poreux contrairement à CHA dense. Les cellules se sont différenciées davantage sur CHA poreux, comparé à CHA dense, donc, il y a eu moins de prolifération cellulaire et donc diminution de la densité cellulaire.

Ces résultats suggèrent que les caractéristiques d'un biomatériau idéal pour favoriser l'activité fonctionnelle ostéoblastique pourraient combiner une substitution en carbonate à 4,4 % massique dans l'apatite et une microstructure poreuse. En effet, un taux de prolifération cellulaire significativement supérieur sur CHA, comparé aux biomatériaux HA, quelle que soit la microstructure, a été observé. Parallèlement, seul le biomatériau de microstructure poreuse CHA présentait une activité enzymatique de l'ALP avec des tendances supérieures comparées à tous les autres biomatériaux (Figure 60).

### **IV.3.3.2 Influence des propriétés physico-chimiques des biomatériaux sur la dissolution des biomatériaux**

Dans la mesure où le calcium est un élément qui reprécipite sous forme d'apatite biologique à la surface des biomatériaux lors de la dissolution de ces derniers (Elliott, 1994), le calcium mesuré dans le milieu de culture ne reflète pas le niveau de calcium total libéré par la pastille. Comme mentionné précédemment, dans la partie sur l'étude des hydroxyapatites silicatées, (paragraphe 0), la concentration calcique en solution est égale à la concentration calcique libérée, soustraite de celle qui a précipité. En supposant que la dynamique de dissolution est identique pour tous les biomatériaux, les hypothèses suivantes pourraient être émises.

Les biomatériaux HA denses se seraient dissous les plus tardivement, puisque la variation en calcium dans le milieu de culture n'est apparue qu'à 24 h.

Les biomatériaux HA poreux ont commencé leur dissolution rapidement mais ont cessé de se dissoudre aussi rapidement, laissant suggérer une dissolution incomplète de ce biomatériau. Le calcium dans le milieu de culture a rapidement précipité en surface.

Les biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure, se seraient dissous aussi rapidement que HA poreux, mais contrairement à HA poreux, ils ont continué une dynamique de dissolution en continu. Cela s'est traduit par une augmentation du niveau de calcium dans le milieu de culture dès 1 h, puis une stabilisation de la concentration calcique à 24 h du fait d'un probable équilibre entre dissolution et précipitation. Cependant, l'influence bénéfique des cellules ostéoblastiques sur la dissolution de la pastille n'a été observée que pour le biomatériau CHA poreux.

La cinétique et le degré de dissolution des biomatériaux pourraient être classés de la sorte : CHA poreux  $\geq$  CHA dense > HA poreux > HA dense.

### **IV.3.3.3 Réponses cellulaires ostéoclastiques au contact des biomatériaux**

#### **IV.3.3.3.1. Adhésion et différenciation des précurseurs ostéoclastiques**

Les marquages d'immunofluorescence ont montré que 14 jours dans du milieu différenciant, ne sont pas suffisants pour induire la différenciation de tous les

précurseurs ostéoclastiques. Toutes les cellules précurseuses des ostéoclastes n'avaient pas fusionné pour former des cellules ostéoclastiques multinucléées. La plus faible densité cellulaire retrouvée sur CHA poreuse ne peut pas être associée à une moins bonne capacité des cellules à adhérer à ce biomatériau. L'hypothèse d'un détachement des cellules sur ces biomatériaux après qu'elles aient fini leur activité de résorption pourrait être émise. C'est le cycle normal de vie des cellules ostéoclastiques (Boyle et al., 2003), (Lerner, 2000), (Cappariello et al., 2014). Ces cellules ont probablement résorbé le biomatériau plus rapidement et se sont donc détachées du biomatériau plus vite que sur les autres compositions. La surface résorbée de ce biomatériau pourrait en témoigner ([Figure 68](#)). Les ostéoclastes de 4 noyaux maximum pourraient être considérés comme de petits ostéoclastes, dans la mesure où il existe des ostéoclastes avec 10 noyaux, (Trebec et al., 2007). La substitution en carbonate et la microstructure dense semblent augmenter la différenciation des précurseurs, puisque le plus fort taux de cellules à 4 noyaux, a été retrouvé sur le biomatériau CHA dense. Toutefois, l'effet de la microstructure dense ou poreuse ne peut pas être déduit de ce résultat. En effet, le nombre total de cellules à 4 noyaux reste faible dans tous les cas (>5/1000) et comme indiqué précédemment, les cellules ostéoclastiques sur les biomatériaux CHA poreux se sont probablement détachées plus rapidement.

#### IV.3.3.3.2. Viabilité cellulaire et tests fonctionnels ([Figure 66](#), [Figure 67](#))

A 14 jours, le biomatériau poreux HA présentait des cellules moins actives métaboliquement, par rapport à tous les autres biomatériaux et en particulier, par rapport au biomatériau dense de même composition chimique, ([Figure 66](#)). Il peut en être déduit que la microstructure poreuse a été moins favorable à l'activation du métabolisme cellulaire. De ce fait, la substitution en ions carbonates aurait contrebalancé l'effet néfaste d'une microstructure poreuse, puisque le taux de viabilité sur les CHA poreuses était du même ordre que sur les autres biomatériaux : CHA dense et HA dense.

Une étude ancienne corrélée à des études plus récentes sur le fonctionnement de TRAP 5b, de la LDH et de l'activité de résorption a montré qu'il pourrait y avoir un lien entre l'activité enzymatique de la LDH et de TRAP 5b, (Coleman et al., 1976), (Halleen et al., 2000), (Halleen et al., 1996). L'étude histochimique de Coleman a montré par une réaction de capture de ferrocyanure de cuivre, la présence de l'activité

enzymatique de la LDH exprimée dans les vésicules et les vacuoles cytoplasmiques ainsi que dans la membrane cytoplasmique des ostéoclastes fixés. Par contre, cette activité de la LDH était principalement présente dans les mitochondries des ostéoclastes non fixés donc actifs. Les molécules de LDH étaient concentrées principalement au niveau de la zone de la bordure en brosse où des débris d'os ont également été retrouvés. Coleman a donc émis l'hypothèse que la LDH participe à l'activité de résorption des ostéoclastes et que les mitochondries des ostéoclastes utilisent la lactate, produite suite à l'activité enzymatique de la LDH, pour fabriquer l'énergie nécessaire.

En parallèle, l'étude de Halleen a montré que TRAP 5b est produite par les ostéoclastes qui endocytent les produits de dégradation de la matrice osseuse, après la sécrétion d'acides et de protéases lysosomales dans l'intervalle entre la membrane cellulaire et la matrice osseuse. Dans la cellule, les vésicules transcytotiques contenant les produits de la matrice osseuse dégradée vont fusionner avec des vésicules contenant TRAP. Les produits de dégradation sont ensuite détruits par les dérivés réactifs de l'oxygène (*ROS : reactive oxygen species*, qui sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres par exemple), produits par TRAP, (Halleen et al., 1996). Les produits de dégradation et des molécules TRAP sont ensuite sécrétés à travers la membrane basolatérale. Ainsi, il existe une corrélation entre la quantité de TRAP en circulation et la quantité d'os résorbé, ce qui reflète le taux de résorption osseuse (Halleen et al., 2000).

En revanche, les travaux scientifiques de Moonga ont montré que l'activité de TRAP 5b est modulée par la concentration calcique – l'ajout de concentration croissante en calcium dans l'environnement a diminué l'activité de TRAP 5b des ostéoclastes cultivés sur des lamelles osseuses –, (Moonga et al., 1990). Moonga a appelé ce mécanisme : mécanisme d'auto-régulation. Cela permettrait l'équilibre entre dégradation et résorption pour le maintien de l'intégrité du mécanisme de résorption osseuse.

Des travaux réalisés avec des ostéoclastes cultivés sur du  $\beta$ -TCP, un matériaux très soluble (Signs et al., 1979) ont montré que l'activité des ostéoclastes est diminuée à cause du fort taux de calcium relargué par ces biomatériaux. De plus petites lacunes de résorption ont été observées sur les  $\beta$ TCP, comparées à l'HA, (Detsch et al., 2008).

De plus petites lacunes ont également été observées sur le matériaux  $\beta$ TCP pure, comparées au matériau BCP (HA25/TCP75), (Yamada et al., 1997).

3 grandes tendances ont pu être observées, en analysant l'ensemble de ces 3 paramètres :

- 1 le profil de résorption des biomatériaux,
- 2 l'activité enzymatique de la LDH,
- 3 l'activité enzymatique de TRAP 5b.

Les biomatériaux CHA, indépendamment de la microstructure, présentent une activité enzymatique de TRAP 5b qui aurait été rétro-régulée par l'importante quantité en calcium relarguée par ces biomatériaux du fait d'une action couplée de la biorésorption par les ostéoclastes mais également d'une dissolution accentuée par la présence de carbonate dans la structure de l'apatite, (Barralet et al., 2000). En effet, le profil de résorption des CHA denses ou poreuses, montre des lacunes de résorption près de 10 fois plus grosses, comparées aux lacunes sur HA, quelle que soit la microstructure, (Figure 68). De plus, l'activité de la LDH sur ces biomatériaux est similaire à celle du contrôle interne : la lame de verre, (activité supérieure à 1), (Figure 66). L'activité de TRAP 5b est donc régulée à posteriori par le mécanisme d'auto-régulation décrit par Moonga, mais, la production d'énergie par l'activité de la LDH, est bien fonctionnelle et disponible pour initier la résorption. HA poreuses et HA denses présentent un comportement différent. L'effet moins avantageux de la microstructure poreuse pourrait à ce stade être émis. La faible activité enzymatique de TRAP 5b retrouvée pour HA poreux pourrait être corrélée à moins de différenciation cellulaire donc moins d'activité ostéoclastique. En effet, significativement plus de prolifération a été observée sur HA poreux, comparée à HA dense. De plus, la faible activité enzymatique de la LDH, retrouvée sur HA poreuse, comparée à HA dense, prouve que moins d'énergie a été produite par les cellules cultivées sur HA poreuse, pour la biorésorption. Par contre, en analysant le profil de résorption des HA denses et poreuses, on remarque un profil de résorption similaire. Pourtant, l'activité de TRAP 5b et de la LDH sont significativement plus élevée sur HA dense, comparée à HA poreuse. Davantage de cellules sur HA dense se sont différenciées et ont produit de l'énergie pour la résorption, mais, n'arrivent pas à résorber le matériau HA, autant que le matériau CHA. La microstructure dense a certainement influencé la différenciation et l'activation des cellules grâce à une concentration en calcium moins élevée absorbée par les cellules

sur un matériau dense, comparé à un matériau poreux. Néanmoins, un autre élément semble plus important pour stimuler l'activité de résorption par les ostéoclastes. La présence d'ions carbonates agit comme des récepteurs sur les cellules pour accroître l'activité de résorption. Dans leur publication Moonga et Kirstein ont cultivé les ostéoclastes sur du plastique et sur de l'os. Kirstein est allée jusqu'à traiter le plastique avec de la vitronectine. Le plastique n'a pas été résorbé. Kirstein a émis la conclusion que l'induction de l'activité de résorption des ostéoclastes dépend de la stimulation par la matrice osseuse, des « récepteurs minéraux » exprimés par les ostéoclastes, (Kirstein et al., 2006).

Dans cette étude, il a été montré que le calcium régule de façon dose dépendante la différenciation et l'activité métabolique des ostéoclastes en favorisant la production d'énergie par la production de lactate via l'activation de l'enzyme LDH. Par contre, les carbonates, sont apparus comme des signaux activateurs de supposés « récepteurs minéraux » à la surface des ostéoclastes, nécessaires pour initier la résorption.

#### **IV.3.3.3.3. Dissolution physico-chimique, biorésorption et mesure du calcium et du pH du milieu de culture (Figure 68, 69 et 70).**

L'état de surface des pastilles et le profil des lacunes de résorption après retrait des cellules, laissent supposer qu'il y a eu une synergie du phénomène de dissolution physico-chimique et de biorésorption plus importante sur les pastilles de CHA, quelle que soit la microstructure. Comme déjà mentionné, le niveau de calcium mesuré dans le milieu de culture ne permet pas de connaître le taux de calcium libéré par la pastille car du calcium reprécipite en surface, (Elliott, 1994). Cela permet d'expliquer qu'il y a eu diminution du niveau de calcium dans le milieu de culture de 7 à 14 jours. Par contre, le fait qu'il y ait eu plus de calcium dans le milieu de culture avec les cellules, comparé au milieu sans cellule, est la preuve qu'il y a eu biorésorption par les ostéoclastes des biomatériaux CHA, quelle que soit la microstructure du biomatériau. Ce n'est qu'à 14 jours qu'il y a eu augmentation du calcium du milieu de culture avec les cellules, pour HA dense, comparé au milieu sans cellule. L'hypothèse d'une biorésorption plus tardive de HA dense par rapport à tous les autres biomatériaux peut donc être émise. L'acidification du pH du milieu de culture en présence des cellules est une autre preuve de l'activité de résorption des cellules sur tous les biomatériaux. En effet, les cellules ostéoclastiques résorbent la partie minérale

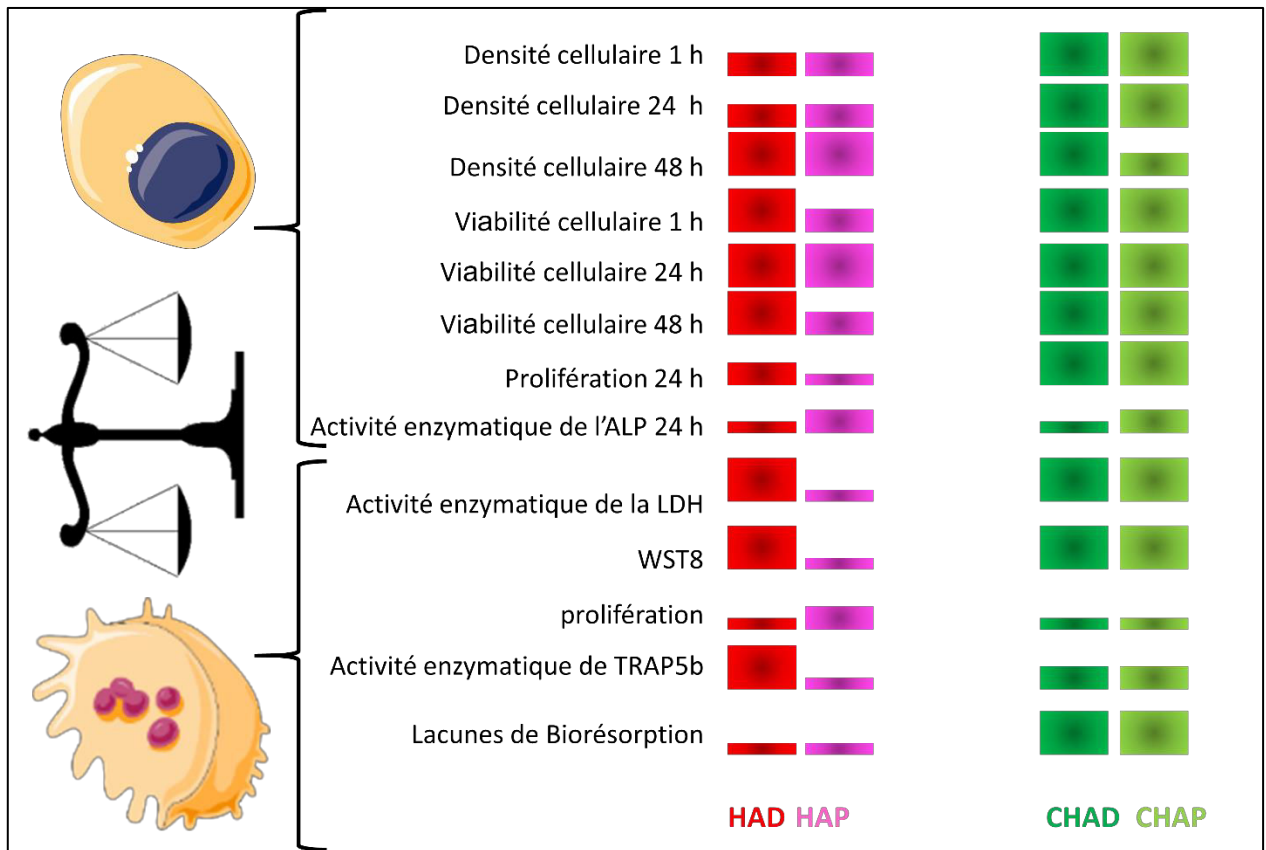
osseuse en fabriquant un environnement acide, (Rousselle and Heymann, 2002), (Väänänen et al., 1998), (Cappariello et al., 2014).

#### **IV.3.4. Conclusions de l'étude**

Les biomatériaux pour la médecine régénérative osseuse doivent dans un premier temps servir de support pour guider la formation et la croissance osseuse mais doivent également à terme complètement disparaître pour laisser place au nouveau tissu formé.

La figure 71, (Figure 71), résume les différentes réponses évaluées sur les quatre matériaux HA et CHA, denses et poreux. En considérant l'ensemble des réponses biologiques, des ostéoblastes et des ostéoclastes, le biomatériau poreux CHA, semble davantage répondre aux exigences de la médecine régénérative, suivi du biomatériau dense CHA. L'HA stéchiométrique conformément aux résultats connus, n'apparaît pas totalement biodégradable. Sa dissolution est limitée (produit de solubilité  $K_s \approx 10^{-121}$ ), (Elliott, 1994), et, comme montré ici, sa résorption ostéoclastique est faible.

La combinaison entre la substitution en carbonate à 4,4 % massique et la microstructure à 25 % de porosité ouverte, pourrait promouvoir la régénération osseuse. Ce biomatériau possède une composition chimique proche de la phase minérale osseuse et n'est pas plus compliqué à obtenir que de l'HA, du  $\beta$ TCP, ou du BCP. Par un procédé de précipitation aqueuse, il est possible d'obtenir ce matériau. La consolidation se réalise à faible température, sous flux de  $\text{CO}_2$ .



**Figure 71** : schéma récapitulatif de la réponse ostéoblastique et ostéoclastique aux biomatériaux. La représentation est arbitraire : il n'y a pas d'échelle. Le code de représentation est le suivant : plus la hauteur de la barre est importante, plus la réponse biologique mesurée était importante et inversement.



## **IV.4. Influence des propriétés physico-chimiques des biocéramiques de phosphate de calcium sur l'activité de biorésorption des cellules RAW 264.7 : corrélation avec l'expression du VEGF-A**

### **IV.4.1. Contexte de l'étude**

En se servant comme substrat de six céramiques de phosphate de calcium, de différentes compositions chimiques et microstructures, cette partie des travaux a consisté à évaluer le comportement des cellules précurseuses des ostéoclastes, en réponse aux différentes compositions chimiques et microstructures des biomatériaux. En estimant la qualité de la biorésorption des biomatériaux, l'objectif était de savoir si l'activité cellulaire de résorption observée, se répercuterait sur un génotype cellulaire en particulier et plus spécifiquement sur l'expression de VEGF-A par les cellules.

En préambule, les fonctions des protéines VEGF-A et TRAP 5b, identifiées et décrites dans la littérature scientifique, sont résumées ci-dessous.

### **IV.4.2. Contexte bibliographique**

#### **IV.4.2.1 Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)**

##### **IV.4.2.1.1. Fonction et mécanisme d'action du VEGF**

Les facteurs de croissance de la famille VEGF, jouent un rôle majeur dans la prolifération, la migration et l'activation des cellules endothéliales. Leur fonction sur ces différents mécanismes contribue au contrôle de l'angiogenèse et du développement vasculaire. La famille des VEGFs comprend 6 membres : Le VEGF-A (VEGF), (Senger et al., 1983), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, VEGF-E et PIGF (*placental growth factor* ; facteur de croissance placentaire). Une désignation alternative pour VEGF- A est VPF (*vascular permeability factor* ; facteur vasculaire de perméabilité), (Koch et al., 2011). Cependant, le VEGF n'agit pas uniquement sur les mécanismes angiogéniques, mais, il jouerait également un rôle important dans la régulation du remodelage osseux, en attirant les cellules endothéliales et les

ostéoclastes et en stimulant la différenciation des ostéoblastes, (Detsch and Boccaccini, 2014), (Hu and Olsen, 2016), (Huang et al., 2016). Dans le métabolisme osseux, les principaux facteurs actifs sont VEGF-A et VEGF-C.

### **Rôle du VEGF-C dans le métabolisme osseux**

Chez les ostéoclastes, le facteur de croissance VEGF-C est connu pour augmenter leur activité de résorption. Son expression dans les ostéoclastes dépend de RANK-L et de l'activation via NF- $\kappa$ B. VEGF-C stimule l'activité de résorption des ostéoclastes en se fixant à des récepteurs VEGFR-3 présents à leur surface, (Zhang et al., 2008). Les cellules ostéoprogénitrices sécrètent aussi du VEGF-C lorsqu'elles sont traitées par la PTH, (Drake et al., 2011).

La fonction biologique du VEGF est dictée principalement par l'expression de ses récepteurs sur les cellules dans différents tissus. Il existe deux types de récepteurs connus du VEGF. Le récepteur à tyrosine kinase Flt-1 ou (VEGFR-1) et KDR ou (VEGFR-2). La neuropiline-1 contenant un domaine (NRP-1) est un co-récepteur, isoforme spécifique de VEGFR-2, qui améliore l'activité biologique des VEGF en augmentant l'affinité de liaison de la molécule au récepteur VEGFR-2 (Koch et al., 2011).

### **VEGF-A et métabolisme osseux**

Le VEGF-A est impliqué dans différents mécanismes au cours de la réparation osseuse (inflammation, ossification de l'os endochondral, couplage entre angiogenèse et ostéogenèse) et de la régénération osseuse.

Il intervient dans le processus de remodelage osseux et de réparation osseuse à plusieurs niveaux :

- par le recrutement des macrophages et la formation d'angiogenèse durant la phase inflammatoire,
- par la stimulation et la maturation des ostéoblastes et la formation de la minéralisation, via son couplage au ligand VEGFR2, (Gerber et al., 1999).

VEGF-A joue un rôle dans le remodelage osseux en agissant principalement sur les cellules formatrices d'os : les ostéoblastes. L'étude de Duan a montré par des expériences *in vivo* chez la souris, qu'inhiber la sécrétion de VEGF-A par les cellules ostéoblastiques, revient à inhiber le recrutement des vaisseaux sanguins dans le périost et la différenciation des précurseurs des ostéoblastes, (Duan et al., 2015).

VEGF-A joue donc un rôle dans la régulation de la vascularisation périchondrale et la différenciation des ostéoblastes au premier stade de développement des os, (Duan et al., 2015). Son action sur les ostéoblastes dépend du récepteur VEGFR2. En effet, l'interaction VEGFA/VEGFR2 active l'expression et l'activité du facteur de transcription Indian hedgehog, augmente l'expression de  $\beta$ -caténine et inhibe Notch2.

- en stimulant la formation d'ostéoclastes dans la phase finale du remodelage du processus de réparation osseuse, (Hu and Olsen, 2016).

Le VEGF-A stimule la formation d'ostéoclastes dans la phase finale du remodelage du processus de réparation osseuse, (Hu and Olsen, 2016), comme le démontre une étude *in vitro*, réalisée sur les cellules MC3T3-E1 et RAW 264.7 transfectées avec du VEGF-A. L'étude de Kim a confirmé que l'ostéoclastogenèse est médiée par une voie d'activation incluant RANK-L, la PKC et Scr, (Kim et al., 2015). La sécrétion de RANK-L par les ostéoblastes et sa fixation sur son récepteur RANK exprimé par les pré-ostéoclastes est à l'origine de l'activation de leur différenciation. Au contraire, l'ostéoprotégérine (OPG), en tant qu'analogue de RANK-L joue le rôle d'antagoniste empêchant la liaison de RANK-L à RANK et inhibant la différenciation, (Lerner, 2000).

#### IV.4.2.2 TRAP 5b

L'enzyme TRAP exprimée par les ostéoclastes, jouerait un rôle dans l'activité de résorption. Le blocage de l'activité TRAP 5b par un anticorps anti-uterroferrine, inhibe l'activité de résorption par les ostéoclastes, (Moonga et al., 1990). Néanmoins, TRAP a également été retrouvée dans plusieurs autres tissus : la peau, le tissu épithélial de la langue, l'oropharynx, l'appareil gastro-intestinal y compris le côlon, ainsi que le thymus, le squelette et les papilles dentaires. La protéine TRAP a été identifiée aux mêmes endroits, mais le niveau d'expression dans les différents tissus, n'était pas toujours en corrélation avec l'activité enzymatique apparente. Ces résultats indiquent que l'expression de TRAP n'est pas cantonnée aux ostéoclastes dans l'os, mais se produit dans divers tissus hébergeant des cellules d'origine osseuse ou des cellules dendritiques et d'autres cellules appartenant à la lignée macrophagique, (Hayman et al., 2000), (Hayman and Cox, 2003), (Hayman et al., 2001).

Les raisons du manque de spécificité de cette protéine pour le tissu osseux ont été découvertes par Halleen et Janckila. En fait, il existe deux isoformes de l'enzyme : TRAP 5b et TRAP5a. De façon générale, les tests de détection prendraient en compte

les deux isoformes de TRAP5 : TRAP 5b, d'origine osseuse, mais également, TRAP 5a, d'origine non osseuse. Ces tests ont ainsi permis de mettre au point des protocoles pour améliorer de façon spécifique la détection de TRAP 5b. Ils ont prouvé que des mesures de l'activité de TRAP à pH 6,1 améliorent la spécificité du dosage immunologique pour l'isoforme 5b (Halleen et al., 1996), (Halleen et al., 2000), (Janckila et al., 2001).

TRAP 5b est produite par les ostéoclastes qui endocytent les produits de dégradation de la matrice osseuse après la sécrétion d'acides et de protéases lysosomales dans l'intervalle entre la membrane cellulaire et la matrice osseuse. Dans la cellule, les vésicules transcytotiques contenant les produits de la matrice osseuse dégénérée vont fusionner avec des vésicules contenant TRAP. Les produits de dégradation sont ensuite détruits par les ROS produites par TRAP, (Halleen et al., 1996). Ensuite, les produits de dégradation et des molécules TRAP sont sécrétés à travers la membrane basolatérale. Ainsi, il existe une corrélation entre la quantité de TRAP en circulation et la quantité d'os résorbé, ce qui reflète le taux de résorption osseuse (Halleen et al., 2000).

### **IV.4.3. Objectif de l'étude**

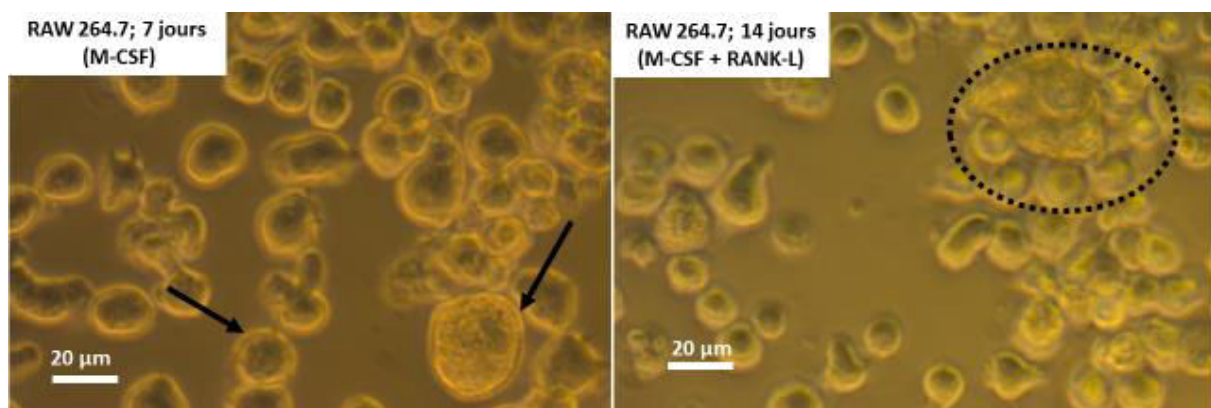
Bien que les ostéoclastes matures puissent être isolés directement à partir d'os, (Osdoby et al., 1982), (Zallone et al.), le faible taux de pureté et le niveau de vie courte de ces cellules, font d'eux un modèle moins adapté à l'étude menée dans ce contexte. C'est pourquoi, la lignée RAW 264.7, a été utilisée. Ces cellules précurseurs des ostéoclastes ont été cultivées sur les 6 variantes de céramiques de phosphate de calcium dans un milieu inducteur de la différenciation : milieu de culture complet dans lequel sont ajoutés les facteurs de différenciation M-CSF et RANK-L, ([Chapitre III page 133](#)).

Plusieurs paramètres cellulaires ont été analysés après une période de 14 jours : morphologie, densité cellulaire, viabilité cellulaire, formation de cellules multinucléées. Parallèlement, le taux de résorption mesuré par l'activité enzymatique de TRAP 5b et de la LDH, ainsi que la sécrétion de VEGF-A par les cellules ont également été analysés. L'activité de résorption des cellules a été analysée en observant le profil des lacunes de résorption. La quantité de calcium dans le milieu ainsi que le pH du milieu de culture environnant ont également été mesurés.

## IV.4.4. Résultats

La lignée de monocytes/macrophages, précurseurs ostéoclastiques, RAW 264.7, a été cultivée pendant 14 jours sur les 6 variantes de biomatériaux, (HA, dense et poreuse, SiHA, dense et poreuse et CHA, dense et poreuse), ainsi que sur la lame de verre, qui a servi de contrôle interne, pour visualiser l'état de différenciation des cellules dans le milieu de culture différenciant, (paragraphe III.2.1.2).

### IV.4.4.1 Culture cellulaire dans le milieu différenciant : contrôle interne de la lame de verre

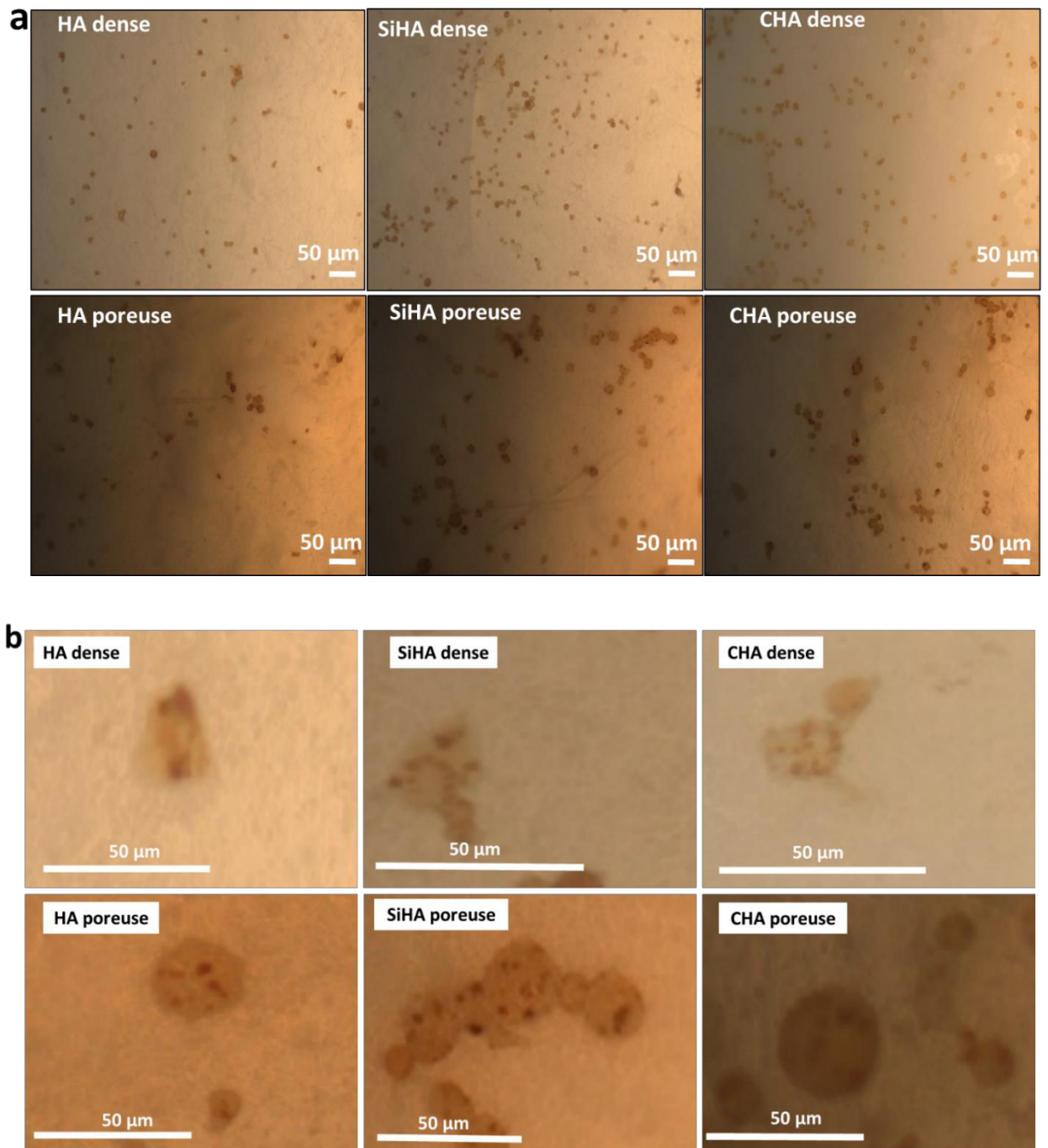


**Figure 72** : images en contraste de phase des cellules RAW 264.7 cultivées sur lame de verre dans le milieu différenciant après 7 jours et 14 jours de culture

**Les flèches noires représentent des cellules mononucléées, (monocytes pour la plus petite et macrophage pour la plus grosse). Après 14 jours, dans le milieu de culture, les pointillés montrent des fusions de cellules qui donneront une cellule ostéoclastique multinucléée**

Après 7 jours de culture dans le milieu différenciant, un mélange de cellules de tailles hétérogènes a été observé sur la lame de verre, (le contrôle interne). Les cellules de grosses tailles sont des macrophages, des pré-ostéoclastes ou des cellules multinucléées : les ostéoclastes. Les cellules de plus petites tailles sont des monocytes. A 14 jours, un amas de cellules ayant fusionné pour former une cellule multinucléée a pu être visualisée (cercle en pointillé noir) (Figure 72). Ce contrôle a permis de valider l'efficacité du milieu de différenciation et le commencement de la différenciation des cellules à partir de 14 jours. Pour valider ces premières observations visuelles, plusieurs approches différentes ont été utilisées : immunofluorescence, coloration de TRAP et imagerie en MEB après dessiccation par contournement du point critique du CO<sub>2</sub>.

#### IV.4.4.2 Marquage de TRAP



**Figure 73** : images en microscopie optique des cellules RAW 264.7, cultivées sur les biomatériaux et préalablement marquées pour TRAP.

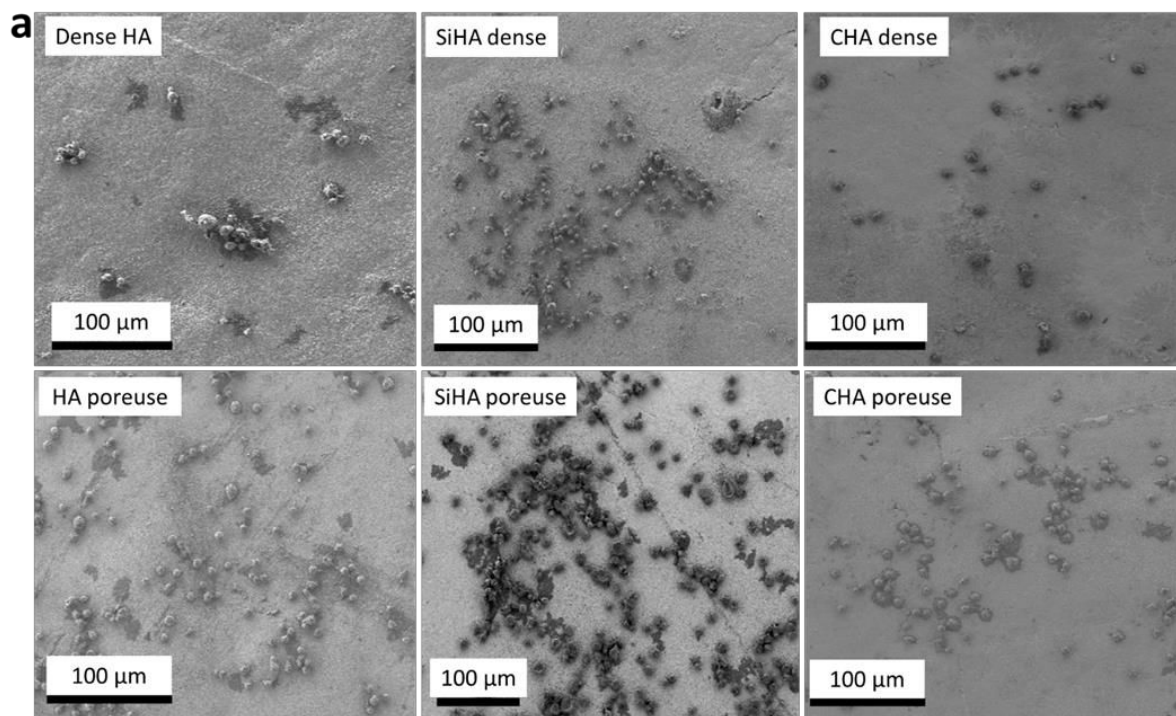
**a) faible grossissement montrant la colonisation par les cellules de tous les biomatériaux.**

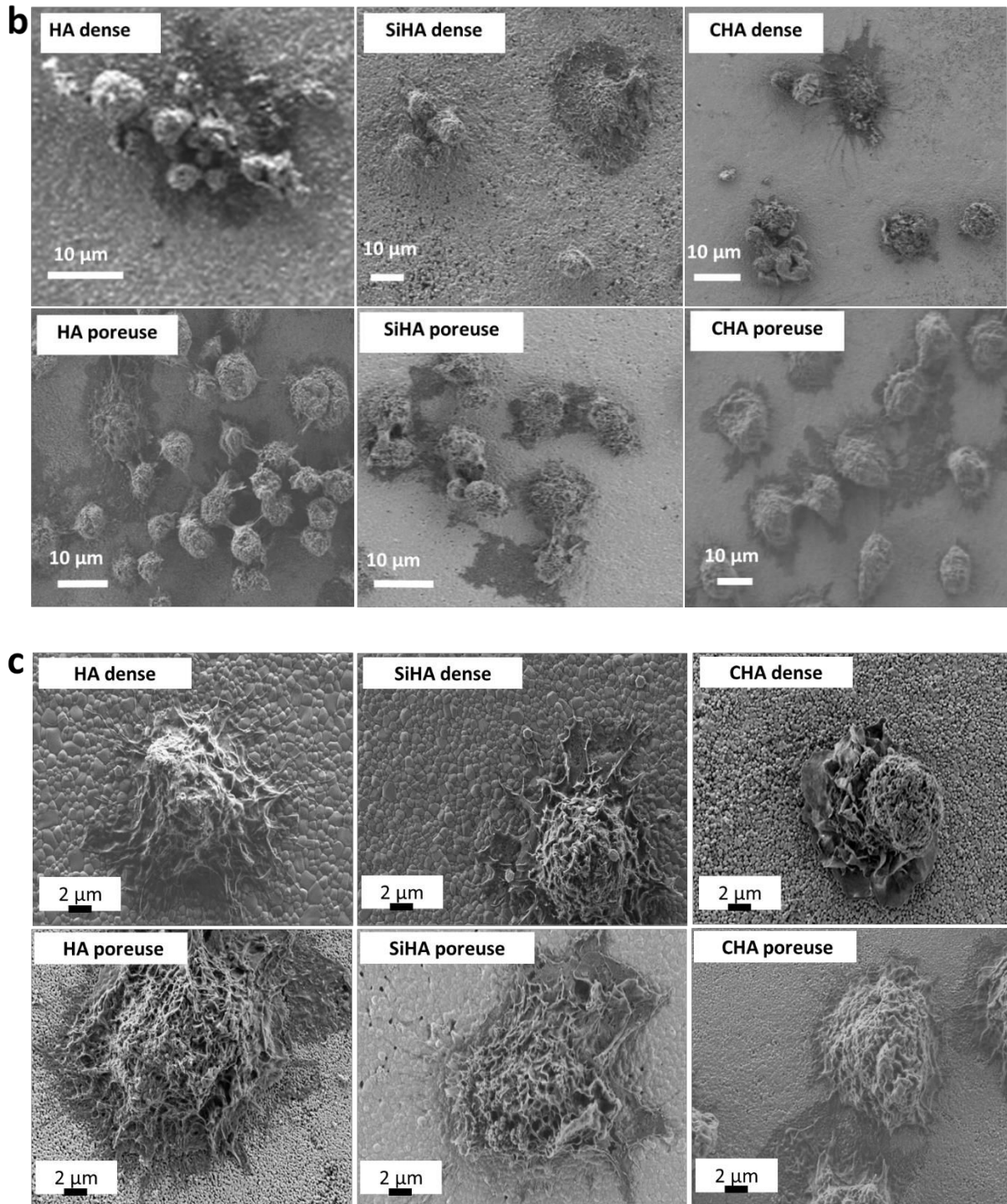
**b) fort grossissement révélant des cellules TRAP positives.**

La coloration de TRAP a confirmé la présence de cellules ostéoclastiques sur tous les biomatériaux. La densité des cellules aux biomatériaux s'est faite de façon homogène sur toute la surface des pastilles (Figure 73).

#### IV.4.4.3 MEB

Les images en MEB permettent de visualiser certaines caractéristiques spécifiques des ostéoclastes pour confirmer l'induction de la différenciation après 14 jours de culture dans le milieu différenciant.





**Figure 74** : images MEB des cellules RAW 264.7, cultivées sur les six biomatériaux, en présence milieu différenciant, (RANK-L et M-CSF).

a) faible grossissement montrant la colonisation par les cellules RAW 264.7, de tous les biomatériaux. b) fort grossissement montrant un mélange de cellules ostéoclastiques, de monocytes et de macrophages sur tous les biomatériaux. A ce grossissement, cette technique ne permet pas de discriminer les cellules monocytes des macrophages. Les gros grossissements ont permis de visualiser certaines caractéristiques typiques des ostéoclastes c) grossissement sur une cellule ostéoclastique ciblée sur chaque biomatériau

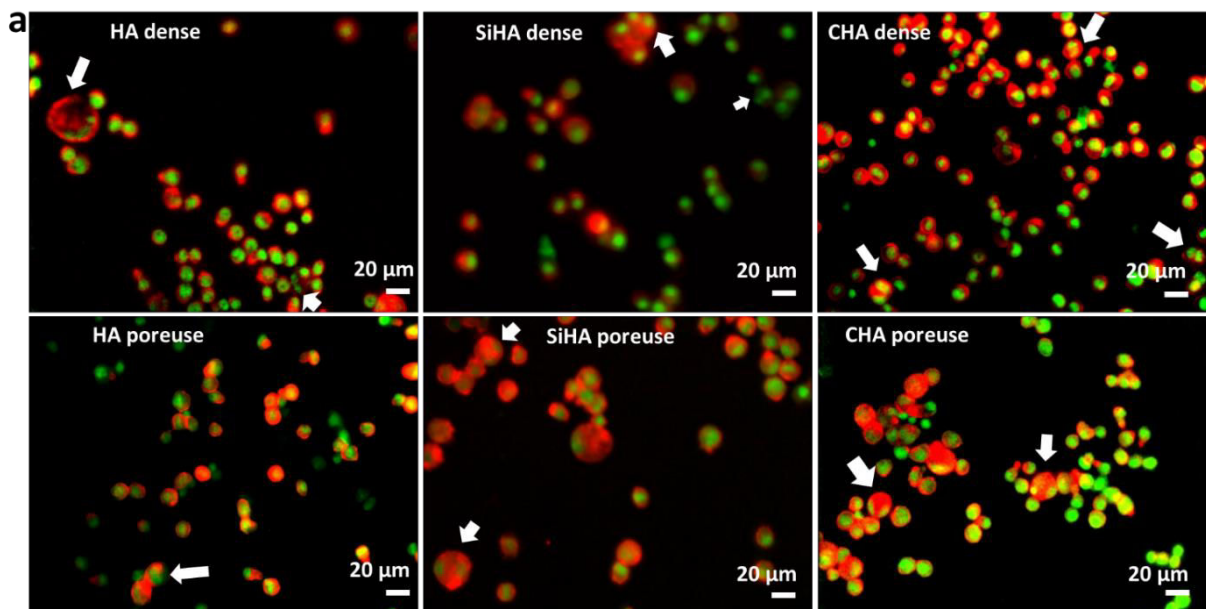


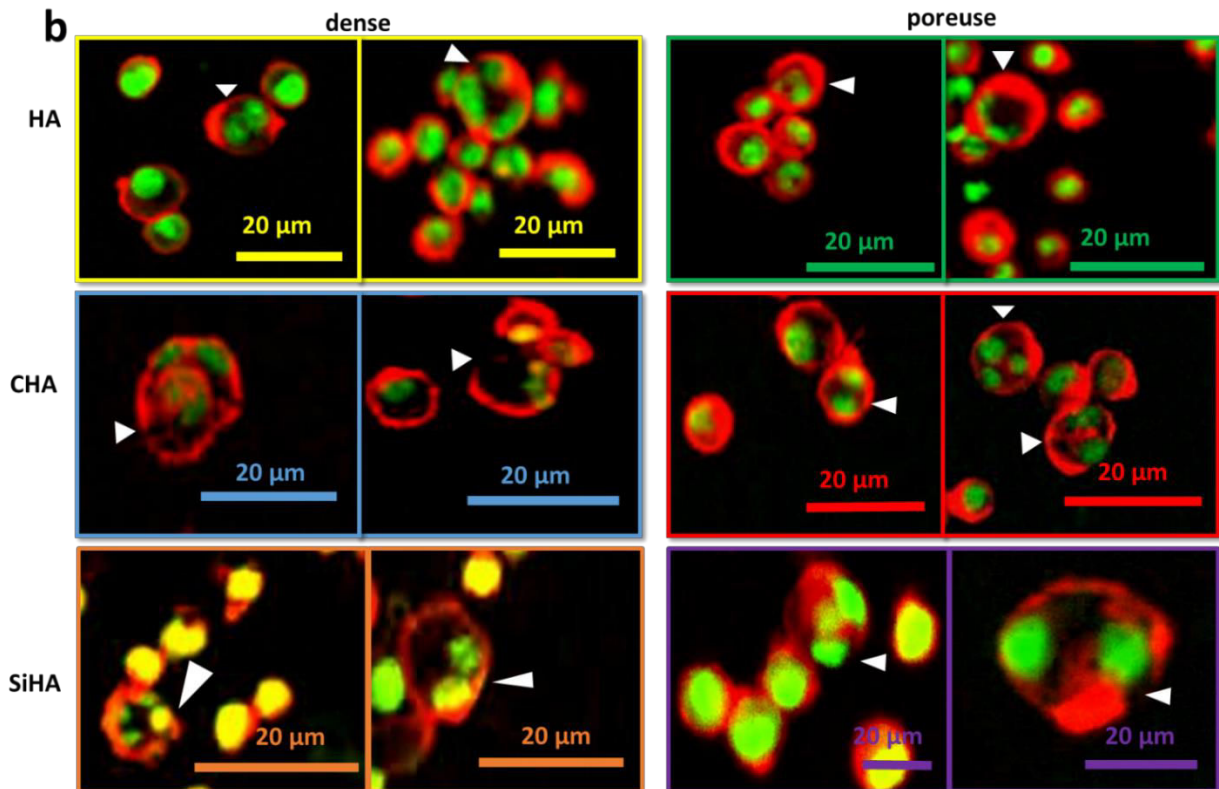
Comme expliqué précédemment, un dôme polarisé (une sorte de rugosité apparaissant au pôle apical), une zone de scellement entre la cellule et le biomatériau et un contour cellulaire en forme de bordure en brosse ont pu être visualisés, témoignant de la différenciation des cellules en ostéoclaste) ([Figure 10](#)). A 14 jours, des ostéoclastes ont pu être observés sur tous les biomatériaux ([Figure 74 c](#)).

#### IV.4.4.4 Immunofluorescence

Les images d'immunofluorescence ont permis de compléter les informations obtenues à partir des images MEB, car elles ont donné des informations sur la formation d'anneaux d'actine, ainsi que sur le nombre de noyaux contenus dans les cellules.

Un mélange de cellules non différenciées et de cellules différenciées, a été observé. Des cellules multinucléées, (2 à 4 noyaux), présentant un anneau d'actine en périphérie, ont été observées. De plus, les images d'immunofluorescence ont montré qu'il n'existe pas de relation de proportionnalité entre le nombre de noyaux dans une cellule et la dimension de la cellule. En effet, des cellules à deux noyaux peuvent être aussi volumineuses, que des cellules à 4 noyaux, ([Figure 75 b](#)).

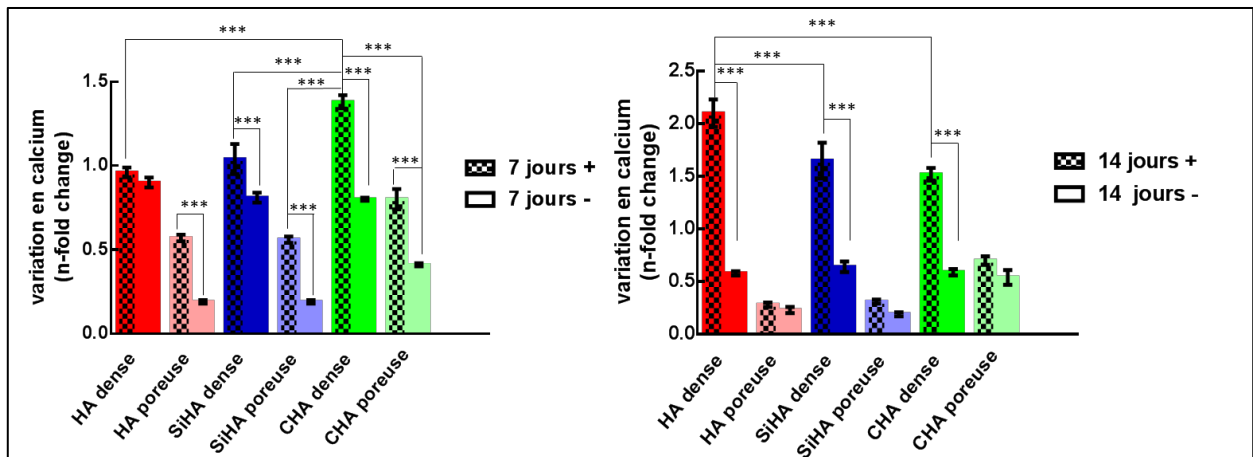




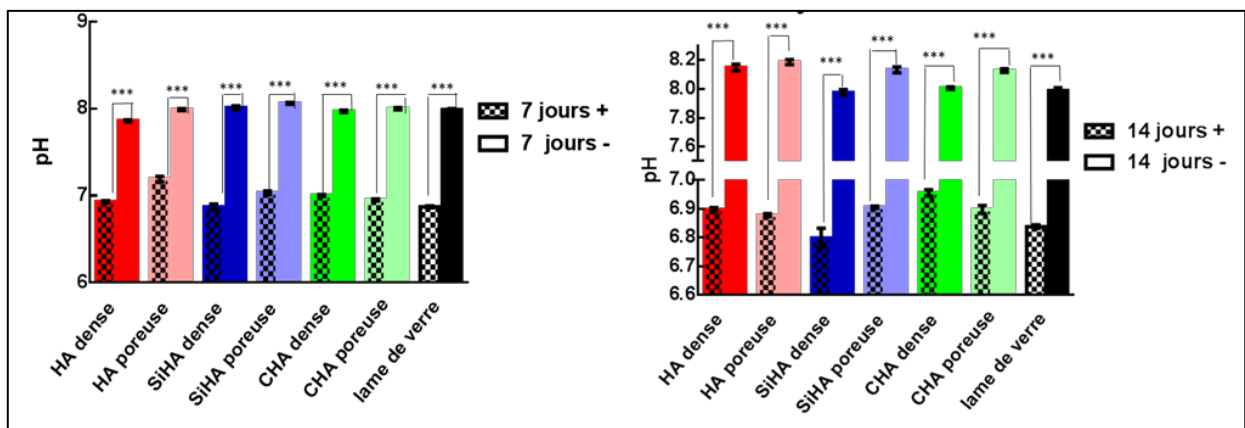
**Figure 75** : images en microscopie à épifluorescence des cellules RAW 264.7, cultivées sur les pastilles, après 14 jours de culture, dans le milieu de culture différenciant, (RANK-L et M-CSF). En rouge : l'actine ; en vert : les noyaux. a) faible grossissement, montrant la colonisation par les cellules RAW 264.7 de tous les biomatériaux. b) fort grossissement, montrant des ostéoclastes ayant adhéré sur les différents biomatériaux, pointés par la flèche blanche.

#### IV.4.4.5 Mesure du calcium et du pH du milieu de culture

L'analyse comparative de la quantité de calcium dans le milieu de culture, avec ou sans cellule, montre que lorsque les pastilles étaient en présence de cellules, la concentration du calcium dans le milieu de culture augmentait significativement, (Figure 76). Cette concentration était supérieure à celle observée pour la lame de verre. Cette concentration avec ou sans cellule n'a pas varié pour la condition qui correspond aux cellules cultivées sur HA dense (la concentration en calcium avec ou sans cellule n'était pas significative). A 7 jours, la pastille CHA dense cultivée avec les cellules, a libéré plus de calcium que tous les autres biomatériaux.



**Figure 76** : mesure des concentrations en calcium dans le milieu de culture après 7 jours et 14 jours, avec les pastilles uniquement (7 jours -) et (14 jours -), ou avec les cellules cultivées sur les pastilles (7 jours +) et (14 jours +).



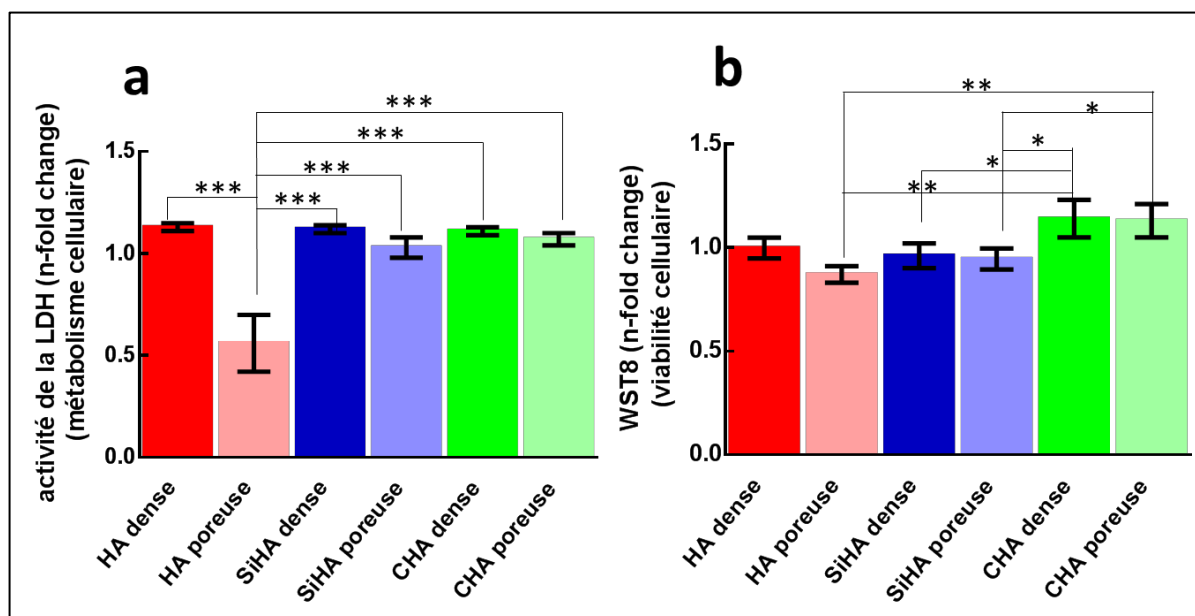
**Figure 77** : mesure du pH de ces milieux de culture. Les résultats sont la moyenne de 6 mesures indépendantes  $\pm$  SD.

De manière générale, le calcium relargué a augmenté entre 7 et 14 jours lorsque les biomatériaux étaient cultivés en présence de cellules (Figure 76). A 14 jours, le niveau de calcium était significativement plus élevé pour HA dense avec cellules, en comparaison aux autres biomatériaux. Le phénomène inverse a été observé pour les pastilles poreuses, quelle que soit la composition chimique. La différence de concentration calcique du milieu pour une pastille poreuse, quelle que soit la composition chimique, avec et sans cellule, n'était pas significative (Figure 76).

Le pH a diminué en présence de cellules comme attendu. Il a en outre diminué au cours du temps, de 7 à 14 jours, en particulier pour les pastilles poreuses (Figure 77). A 14 jours, c'est le surnageant de culture des pastilles SiHA denses en présence de cellules qui était le plus acide, en comparaison des autres valeurs de pH, alors que

celui des pastilles CHA denses, en présence des cellules, était le plus basique. Dans les autres conditions, les variations du pH ne sont pas significatives.

#### IV.4.4.6 viabilité des cellules RAW 264.7



**Figure 78** : viabilité cellulaire

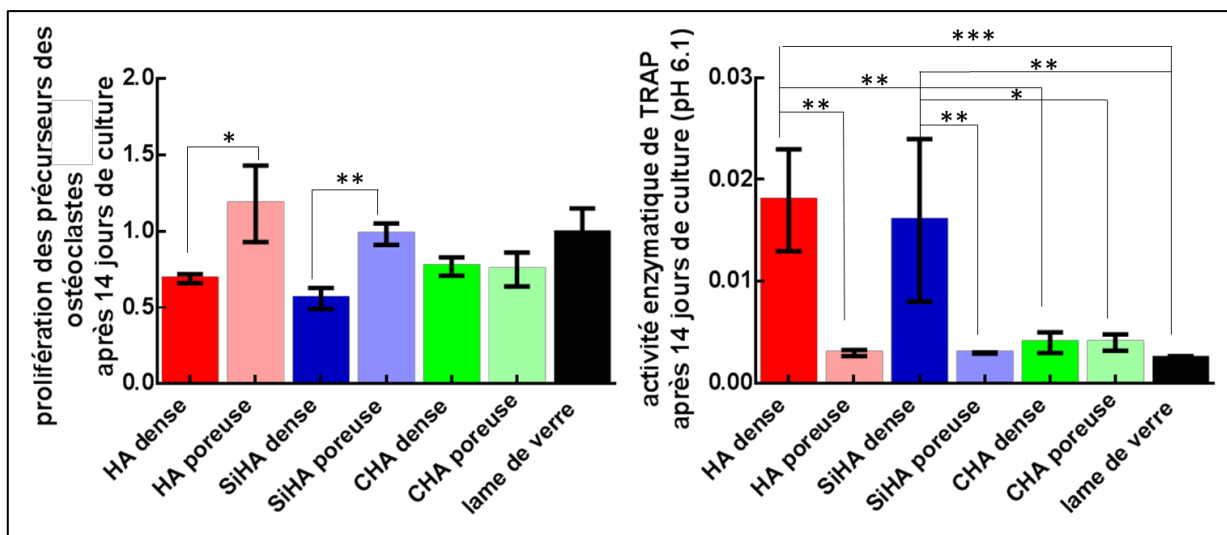
a) activité de la lactate déshydrogénase (LDH). L'absorbance est mesurée à (490-690 nm). 6 mesures sont réalisées par condition. Les résultats obtenus sont normalisés par ceux de la lame de verre. (La légende sur l'axe des ordonnées exprimée en *n-fold change* correspond aux résultats normalisés par rapport à la lame de verre). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. b) viabilité cellulaire mesurée par la réaction colorimétrique de la réduction de la molécule WST-8 par les NADH. L'absorbance est mesurée à 450 nm. Les résultats sont normalisés par ceux obtenus pour la lame de verre (la légende sur l'axe des ordonnées exprimée en *n-fold change* correspond aux résultats normalisés par rapport à la lame de verre). Le résultat est la moyenne de 18 mesures  $\pm$  SD.

Deux tests de viabilité ont été réalisés : le test WST-8 et le test LDH. WST-8 est un test analogue plus sensible et plus pratique que le test MTT, très couramment utilisé et qui reflète la viabilité cellulaire, en estimant la cytotoxicité. Le test LDH, réalisé sur les cellules vivantes, mesure l'activité enzymatique de la LDH et évalue la viabilité cellulaire. Les résultats montrent une activité de la LDH deux fois plus faible pour les cellules cultivées sur la pastille HA poreuse par rapport à la lame de verre. Toutes les

autres conditions présentaient un taux d'activité de la LDH similaire à celui de la lame de verre (de l'ordre de 1), sans différence significative.

Par contre, une plus grande viabilité cellulaire et moins de cytotoxicité ont été observées sur les biomatériaux CHA denses et poreux. Les cellules cultivées sur HA poreuse étaient viables, (la viabilité est similaire à celle de la lame de verre : d'environ 1), mais, métaboliquement moins actives, (taux deux fois moins important que celui de la lame de verre : d'environ 0.5 pour l'activité enzymatique de la LDH), comparées aux autres cellules. Seules les cellules cultivées sur le biomatériau CHA dense et poreux possédaient un taux de viabilité supérieur à celui de la lame de verre : à 1, donc, supérieur au contrôle interne (Figure 78).

#### IV.4.4.7 Etude de la prolifération et de la différenciation des cellules RAW 264.7, en fonction de la nature des biomatériaux



**Figure 79** : activité proliférative et différenciation des cellules RAW 264.7, après 14 jours de culture.

**Prolifération des précurseurs ostéoclastiques, mesurée par réplication de l'ADN (test BrdU) et différenciation des ostéoclastes, évaluée par l'activité enzymatique de TRAP. Les résultats des tests représentent la moyenne de 6 mesures indépendantes  $\pm$  SD.**

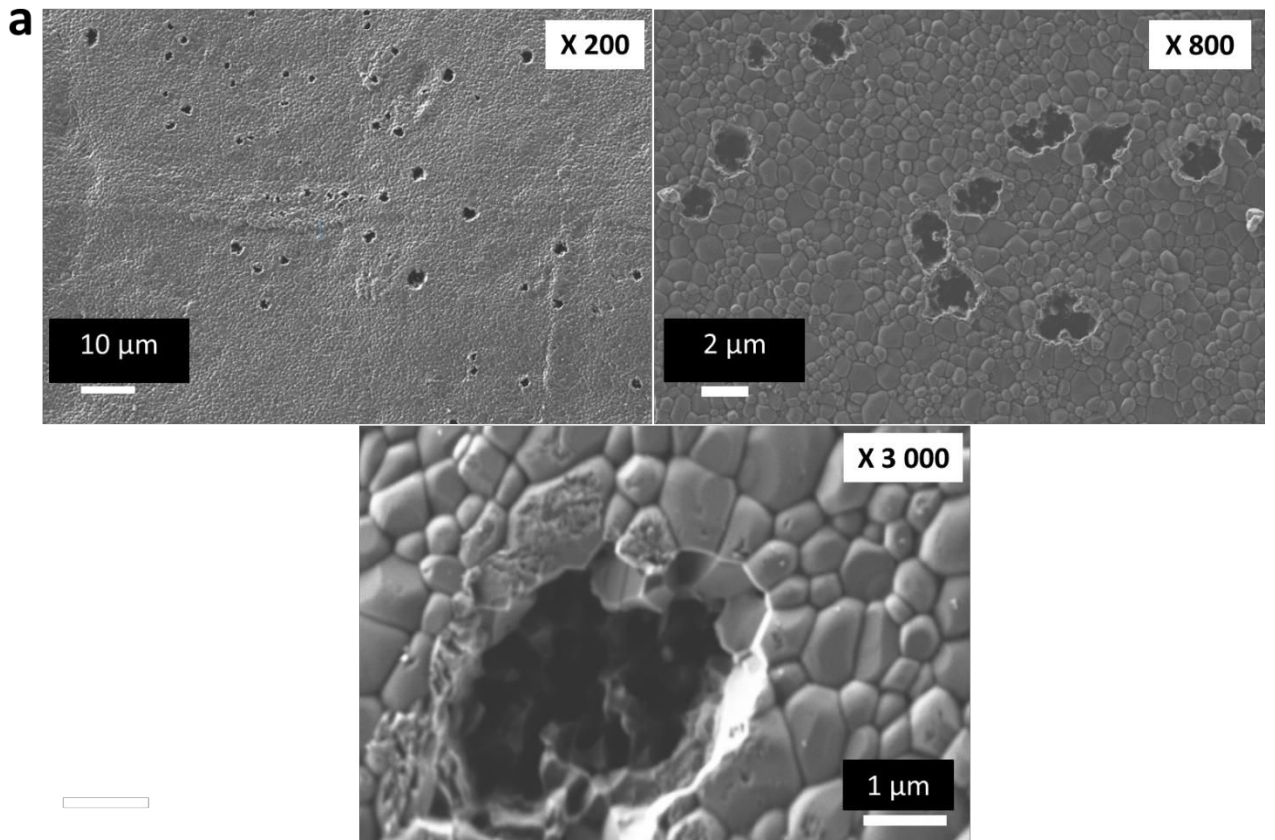
Le taux de prolifération sur SiHA dense et HA dense est significativement moins important, comparé au taux sur SiHA poreuse et HA poreuse respectivement. Concernant l'activité de TRAP 5b, c'est l'inverse qui est observé, avec plus d'activité mesurée sur SiHA et HA dense, comparée à SiHA poreuse et HA poreuse. Plus de prolifération est également observée sur la lame de verre. Un taux de prolifération

intermédiaire et identique est observé pour les biomatériaux CHA denses et poreux, par rapport au taux des autres conditions. L'activité enzymatique de TRAP 5b était également à un niveau intermédiaire et identique pour CHA, quelle que soit sa microstructure, comparée à l'activité des autres conditions (Figure 79).

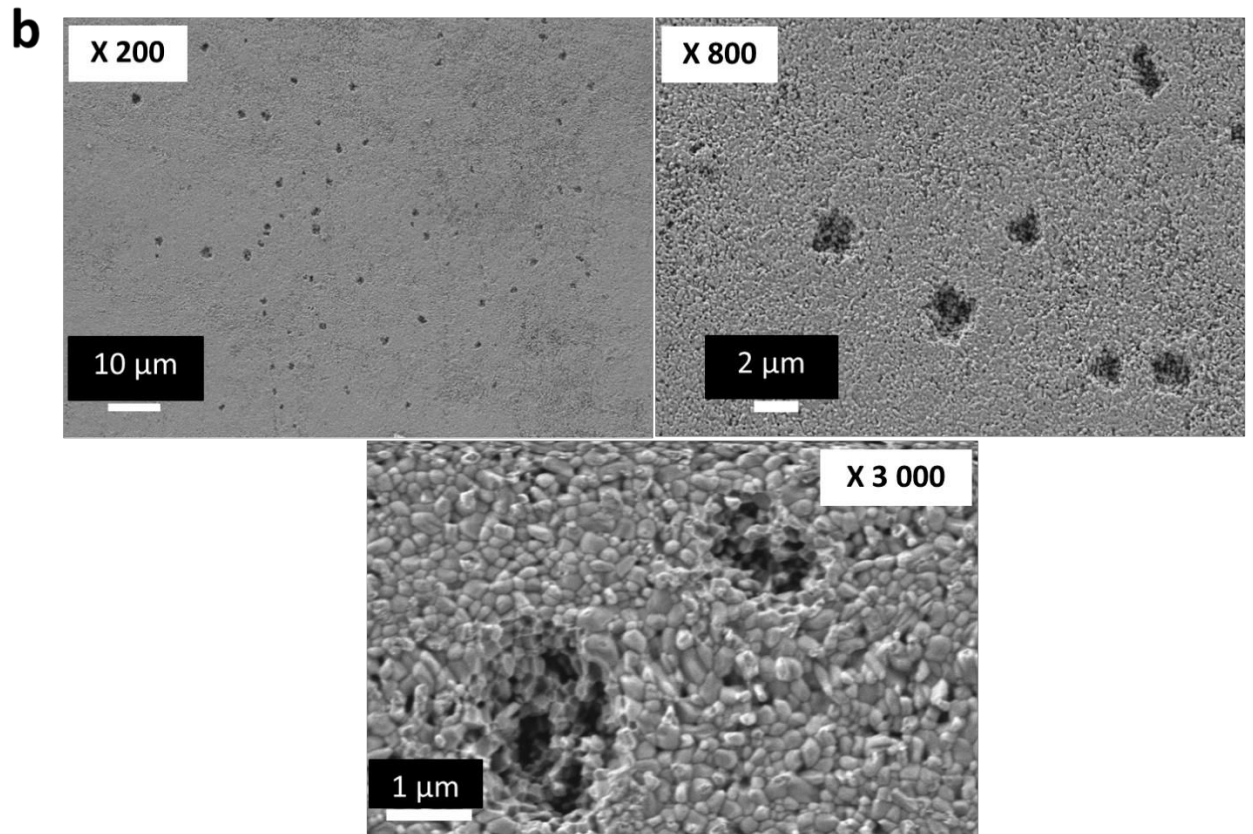
#### **IV.4.4.8 Lacunes de résorption**

Des lacunes de biorésorption ont été formées sur toutes les variantes de biomatériaux testées, après 14 jours de culture. Pour une même composition chimique, le profil de résorption des lacunes était similaire sur le biomatériau dense et poreux, mais, différait en fonction de la composition chimique. Des lacunes de résorption à la forme et aux contours bien définis et délimités ont pu être observées sur les biomatériaux HA et SiHA, qu'ils soient denses ou poreux. Par contre, en comparant HA avec SiHA, on constate une nette différence de la taille des lacunes de résorption. Les lacunes étaient beaucoup plus importantes sur SiHA dense et poreuse, comparées aux lacunes sur HA dense ou poreuse. Si les lacunes sont plus larges sur SiHA et correspondent à la taille d'une zone de scellement délimitée par une cellule (80-100  $\mu\text{m}$  de périmètre environ (Figure 74 c), les lacunes sur HA ont une taille beaucoup plus petite que celle observée des cellules. En plus des lacunes de résorption à la surface des biomatériaux SiHA poreux, certaines zones présentent des signes d'érosion, susceptibles d'être la conséquence du processus de dissolution physico-chimique, courant sur ce type de matériau poreux (Figure 80 d : première ligne). Ce phénomène de dissolution est aussi observé sur la totalité de la surface des biomatériaux CHA denses et poreux. Il s'agit bien d'une dissolution et non de l'activité de biorésorption des cellules, puisque, avant d'enlever les cellules sur le biomatériau CHA dense, ce phénomène d'érosion de la surface a pu être observé (Figure 80 e : première image grossissement 200). Cette dissolution s'est produite en priorité au niveau des joints de grains. Une image de microscopie électronique en contraste a permis de voir une dislocation des grains (Figure 80 e : image en contraste grossissement 2000). Au niveau des lacunes de résorption, un grossissement sur la surface des grains a montré une altération de celle-ci, prouvant une biorésorption par acidité (Figure 80 e : dernière ligne, grossissement 10 000 et d) dernière ligne, grossissement 10 000 et 4 000).

HA dense

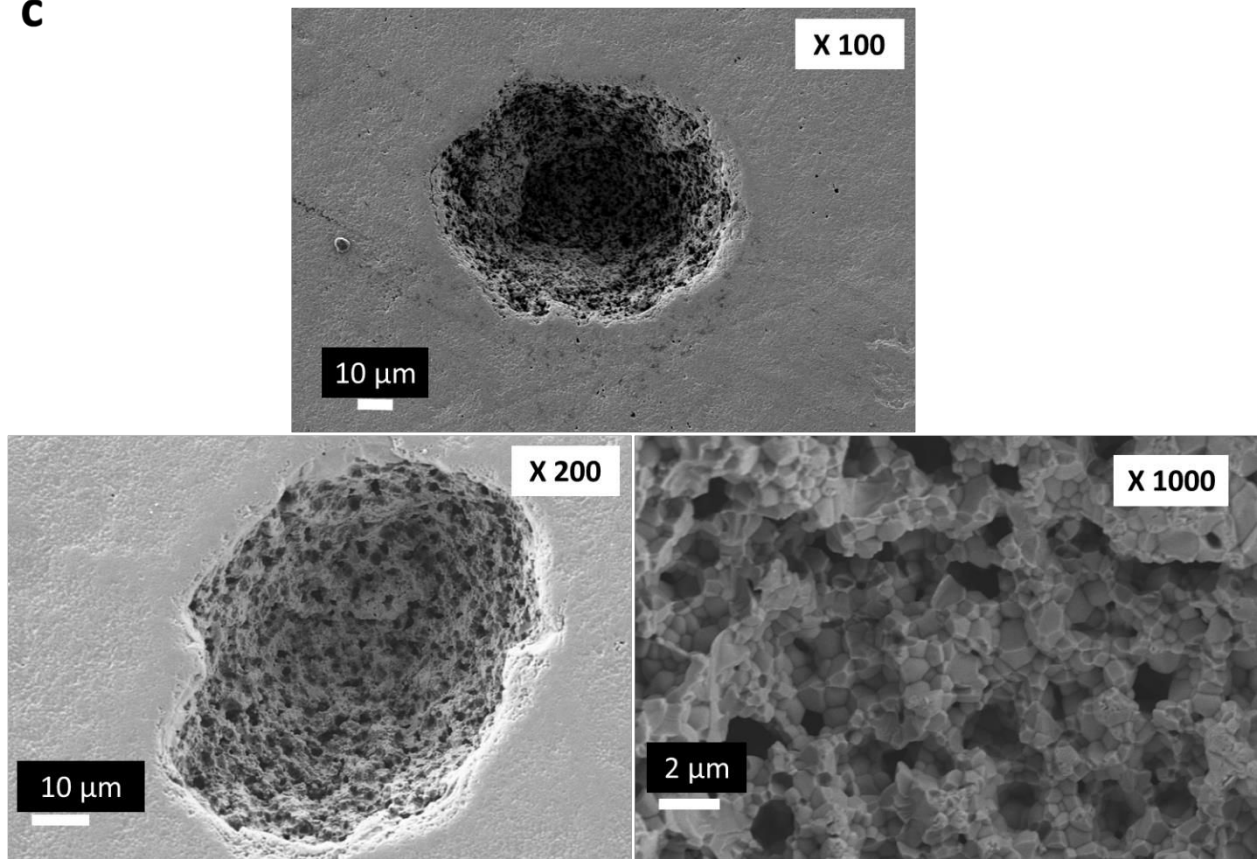


HA poreuse



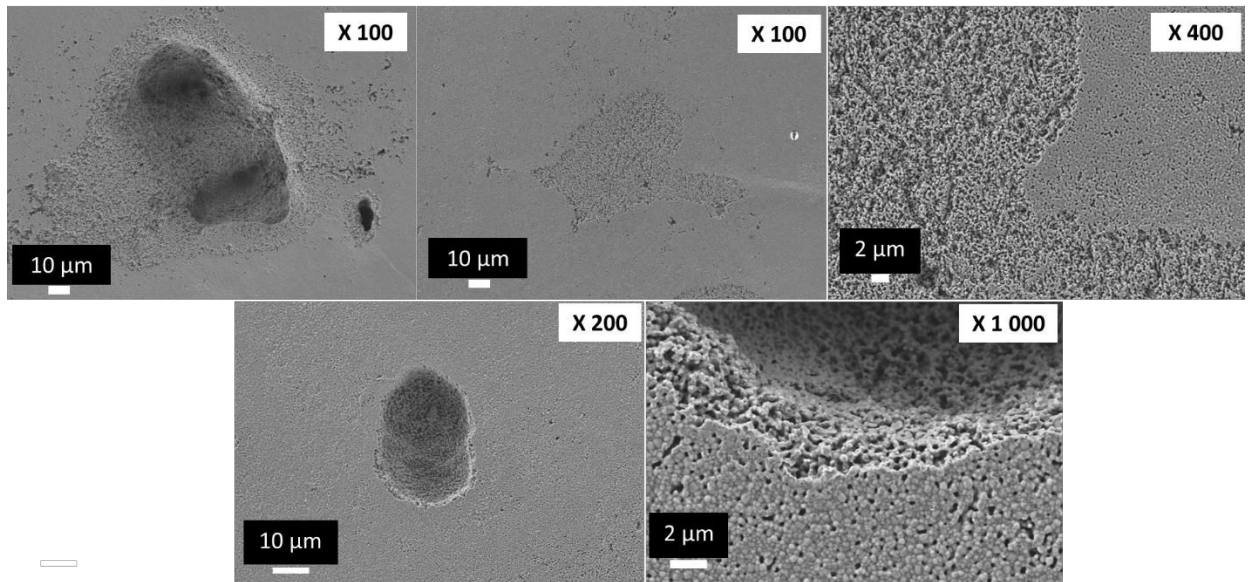
SiHA dense

C



SiHA poreuse

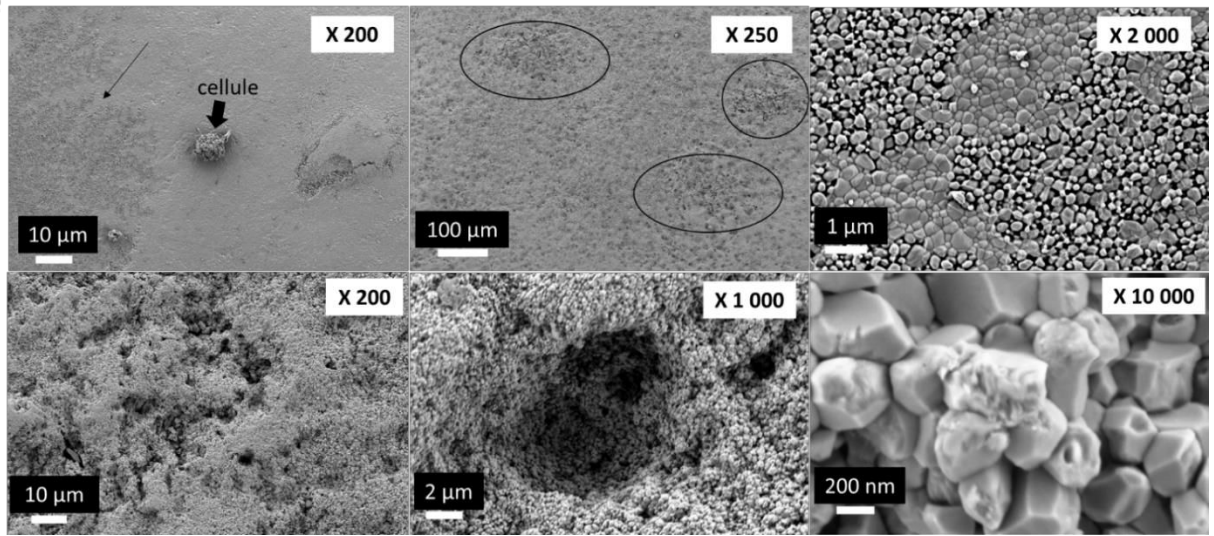
d





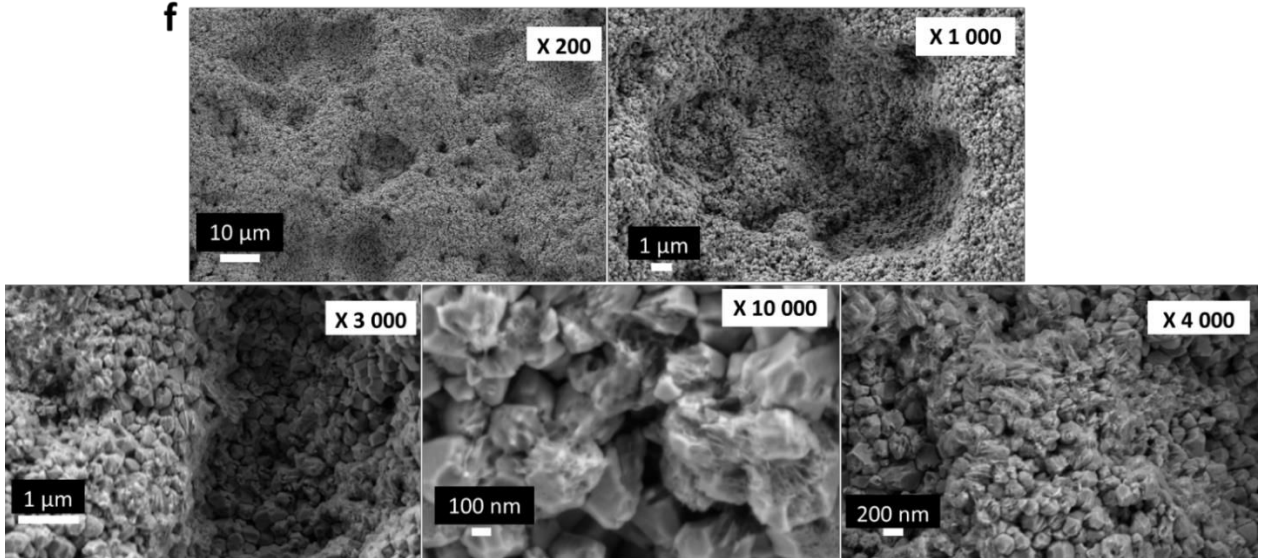
CHA dense

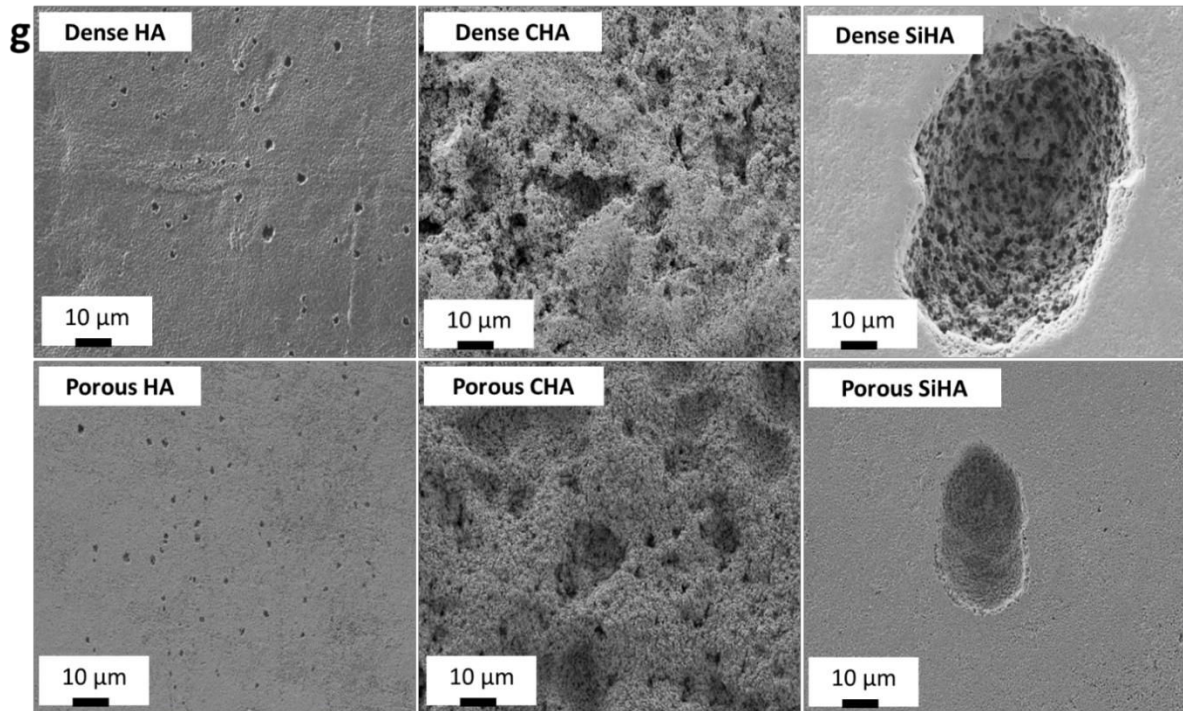
e



CHA poreuse

f

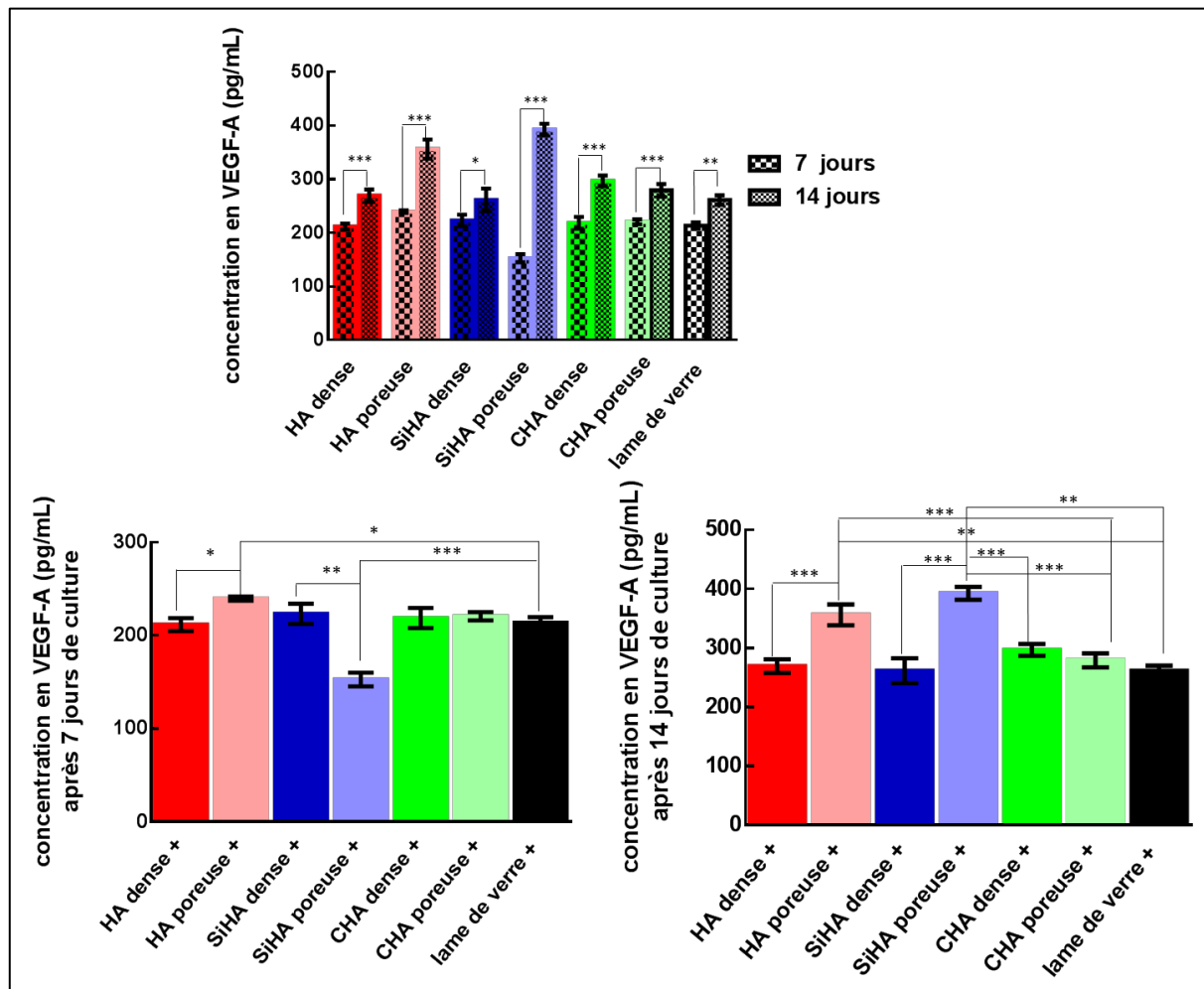




**Figure 80** : images MEB des lacunes de résorption des six différents biomatériaux, après 14 jours de culture.

a) HA dense ; b) HA poreux ; c) SiHA dense ; d) SiHA poreux ; e) CHA dense ; La flèche et les cercles délimitent des zones d'érosion à la surface des biomatériaux ayant subi le phénomène de dissolution physico-chimique. f) CHA poreux ; g) images récapitulant la description des lacunes sur les biomatériaux à même grossissement

#### IV.4.4.9 Etude de la variation de la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes en fonction de la nature du biomatériau



**Figure 81** : concentration en VEGF-A, libéré dans le milieu de culture, par les cellules ostéoclastiques cultivées sur les six différents biomatériaux et la lame de verre, utilisée comme contrôle interne.

La concentration est mesurée par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de 6 mesures indépendantes  $\pm$  SD. (\* $p < 0.05$  ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Les cellules RAW 264.7, cultivées en milieu différenciant, sécrètent du VEGF-A, à des concentrations variant entre 200-400 pg/mL. Quelles que soient la composition chimique et la microstructure des biomatériaux analysés, il a pu être constaté une augmentation significative de la sécrétion en VEGF-A, au cours du temps de culture de 7 à 14 jours. A 7 jours, les biomatériaux HA poreux ont sécrété significativement plus de VEGF-A que les biomatériaux HA dense. Le phénomène inverse est constaté pour les biomatériaux SiHA poreux, puisque ceux-ci ont sécrété significativement moins de VEGF-A que les denses. A 14 jours, la tendance s'est inversée pour SiHA

poreux qui a sécrété significativement plus de VEGF-A que SiHA dense. Concernant HA denses et poreux, la même tendance a été observée, la sécrétion de VEGF-A est significativement plus élevée sur HA poreuse, comparée à HA dense. Cette observation ne s'applique pas aux biomatériaux CHA denses et poreux à 7 et 14 jours puisque la sécrétion de VEGF-A est similaire quelque soit la microstructure du biomatériau. A 14 jours, la concentration sur les biomatériaux HA et SiHA poreux était significativement plus importante (Figure 81).

## **IV.4.5. Discussions**

### **IV.4.5.1 La différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclaste pourrait dépendre de la nature dense du biomatériau**

Les étapes précoces de la différenciation des macrophages en ostéoclastes sont régulées par des facteurs de croissance, comme M-CSF (*Macrophages Colony Stimulating Factor*). Par la suite, la différenciation des précurseurs des ostéoclastes issus de la moelle osseuse, (CFU-M : *Colony Forming Units – Macrophages*) en ostéoclastes, dépend de la signalisation activée par l'interaction de RANK-L sécrété par les ostéoblastes avec son récepteur RANK sur les ostéoclastes. L'équilibre physiologique entre résorption et accrétion osseuse dépend du contrôle précis de la différenciation ostéoclastique qui est étroitement liée à l'équilibre du rapport RANK-L/Ostéoprotégérine (OPG). Cette dernière protéine inhibe, en effet, la différenciation des ostéoclastes, en neutralisant RANK-L ce qui permet de réguler l'ostéoclastogénèse, (Lerner, 2000). L'addition de M-CSF et RANK-L dans le milieu de culture des RAW 267.4, permet de mimer l'action des ostéoblastes sur l'induction de la différenciation des macrophages. Cette différenciation semble active à 14 jours sur les 6 biocéramiques, même si certaines cellules présentent encore un noyau unique, suggérant ainsi que l'étape de fusion des cellules mononucléées n'est pas encore terminée, sur l'ensemble des cellules, malgré son induction par des facteurs de différenciation, (M-CSF et RANK-L), ajoutés dans le milieu de culture. Lorsque cette étape de fusion des macrophages indispensable à leur différenciation en ostéoclastes multinucléés a bien été effective, des cellules possédant un maximum de 4 noyaux ont été observées sur les différents biomatériaux, ce qui prouve que la nature chimique des biomatériaux n'influence pas la fusion des cellules. La taille des cellules

multinucléées est relativement normale et aucune cellule géante n'est observée, ce qui signifie que les biomatériaux utilisés n'induisent pas la formation de cellules multinucléées présentant plus de 10 noyaux. Ce type de cellules est généralement associé à des conditions pathologiques telles que l'ostéoporose et les maladies inflammatoires chroniques. Trebec *et al* ont ainsi constaté que ces gros ostéoclastes prédominent dans la polyarthrite rhumatoïde et la maladie parodontale. Leur activité de résorption est plus importante que celle des petits ostéoclastes, (2-5 noyaux), en raison de la forte production de protéases et de l'expression de récepteurs activateurs de la biorésorption, (Trebec et al., 2007). Ces différents ostéoblastes activent des voies de signalisation différentes et ne possèdent pas la même capacité à sécréter du VEGF-A, (Trebec et al., 2007), (Trebec-Reynolds et al., 2010). Afin de préciser le statut de différenciation des ostéoclastes et de déterminer si il existe des différences liées à la nature, ou la microstructure des différents matériaux, plusieurs paramètres ont été évalués.

#### **IV.4.5.2 Dissolution physico-chimique et biorésorption par les ostéoclastes**

Deux hypothèses peuvent être émises en ce qui concerne l'origine du calcium relargué dans le milieu : Le calcium provient soit de la dissolution physico-chimique du biomatériau, soit de la biorésorption de ce dernier par les ostéoclastes. Il a été cependant constaté que, quels que soient les biomatériaux considérés, la concentration de calcium dans le milieu de culture augmente toujours en présence des cellules, suggérant ainsi, que les ostéoclastes ont entamé leur processus de différenciation et exercent leur activité de biorésorption des pastilles. Ce phénomène a été confirmé par les observations en MEB qui montrent des lacunes de résorption plus ou moins importantes et nombreuses en fonction des différents matériaux. De plus, la diminution des valeurs du pH vient étayer l'hypothèse d'une activité de résorption, due aux cellules sur tous les biomatériaux, quelles que soient la composition et la microstructure. Les cellules en biorésorption créent en effet un compartiment acide étroitement délimité par la zone de scellement entre la cellule et le biomatériau. Dans cette zone, le pH atteint des valeurs de l'ordre de 3 - 4 (Detsch and Boccaccini, 2014). Bien que le pH mesuré dans le milieu de culture soit plus élevé que 3 ou 4, le milieu est toujours significativement plus acide en présence des cellules

que dans un milieu sans cellule, laissant suggérer l'activité de résorption des cellules. L'activité métabolique des cellules pourrait également expliquer la diminution du pH.

L'autre élément permettant de préciser l'effet des biomatériaux sur le comportement cellulaire et notamment sur la cinétique de différenciation des ostéoclastes, est le calcium libéré dans le milieu, entre 7 et 14 jours. A 7 j, les concentrations de calcium sont similaires, avec ou sans cellules sur le biomatériau HA dense démontrant que l'activité de résorption n'a pas commencé sur ce type de biomatériau dense ce qui pourrait refléter un retard dans la maturation des ostéoclastes. Retard rapidement comblé, puisqu'à 14 j, les concentrations de calcium sont significativement supérieures en présence des cellules RAW 267.4, sur ce même biomatériau. L'augmentation des concentrations en calcium, entre 7 et 14 jours, sur tous les biomatériaux denses, quelle que soit la composition chimique, confirme la progression de l'activité de résorption des ostéoclastes et une différenciation accrue des cellules RAW 267.4. Par contre, un phénomène de précipitation a probablement commencé à 14 jours pour les biomatériaux SiHA denses et CHA denses, car, l'augmentation du calcium était significativement plus faible comparée à celle de HA dense qui commençait à 14 jours son activité de résorption. On peut également se demander si la cinétique de dissolution varie en fonction de la microstructure de façon indépendante de la composition chimique. En effet, les pastilles poreuses présentent le plus faible taux de calcium dans le milieu de culture, quelle que soit la composition chimique considérée. L'hypothèse selon laquelle la précipitation de calcium sur les pastilles poreuses serait supérieure à celle des pastilles denses a été émise. Le calcium libéré par les pastilles poreuses atteindrait un niveau de saturation plus rapidement et provoquerait la précipitation d'apatite phospho-calcique en surface du biomatériau. Un fort taux de calcium libéré rapidement dans le milieu pourrait inhiber l'activité des ostéoclastes (Yamada et al., 1997), (Nielsen et al., 2007), (Zaidi et al., 1989), (Detsch et al., 2010). La précipitation du calcium responsable de l'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes pourraient expliquer en partie l'absence de différences observée pour la concentration calcique dans le milieu des biomatériaux poreux avec ou sans cellules, à 14 j.

Afin de déterminer si le processus de différenciation des RAW 264.7 en ostéoclastes et l'activité de résorption de ceux-ci étaient altérés, l'expression du

marqueur TRAP a été recherché et la configuration de surface des pastilles a été analysée.

#### **IV.4.5.3 Viabilité cellulaire**

L'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes sur les biomatériaux HA poreux pourrait comme nous l'avons démontré précédemment dépendre du relargage du calcium dans le milieu. Les résultats concernant le métabolisme cellulaire, mesuré par l'activité de la LDH, semble confirmer ce phénomène. Il a pu en effet être montré qu'il existe une relation entre l'expression de la LDH et l'activité de résorption des ostéoclastes. L'activité enzymatique de la LDH permet de produire la lactate, source d'énergie pour l'activité de résorption (Coleman et al., 1976). Par conséquent, le faible taux d'activité de la LDH dans ces biomatériaux pourrait être corrélé à une faible activité de résorption. La microstructure poreuse semblerait donc moins favorable. Cependant, cet effet n'a pas été observé sur les matériaux poreux de compositions chimiques différentes : SiHA et CHA. La substitution en ions silicates et carbonate compensant les effets induits sur l'activation du métabolisme cellulaire et la viabilité cellulaire, par une microstructure poreuse. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la libération de silicium et de carbonates dans le milieu permet d'atténuer les effets inhibiteurs du calcium sur l'activité ostéoclastique.

Il est cependant complexe d'affirmer que des cellules différenciées sont actives. Elles doivent être activées par des signaux émis par leur environnement (signaux paracrines libérés par les ostéoblastes : cytokines, hormones, signaux autocrines libérés par les ostéoclastes, calcium), (Cappariello et al., 2014). Il faut ainsi distinguer selon Lerner, des « ostéoclastes latents » et des « ostéoclastes actifs » (Lerner, 2000). C'est aussi la différence qu'à soulignée Kreja en parlant d'« ostéoclaste non résorbant », (Kreja et al., 2010).

C'est la raison pour laquelle après avoir vérifié l'expression de TRAP 5b dans les cellules par un marquage et analyser le nombre de cellules multinucléées, une étude de l'activité enzymatique de TRAP 5b et des signes physiques de biorésorption a été menée.

#### **IV.4.5.4 L'activité enzymatique de TRAP 5b et VEGF-A confirme le processus de résorption osseuse**

##### **IV.4.5.4.1. L'activité enzymatique de TRAP 5b**

TRAP 5b est considéré comme un marqueur de l'activité ostéoclastique. Son expression est proportionnelle au taux de résorption, (Kirstein et al., 2006). La quantité de TRAP circulant est corrélée à la quantité d'os résorbé et reflète ainsi le taux de résorption osseuse, (Halleen et al., 2000).

Par contre, en comparant des cellules non-résorbantes et des cellules résorbantes, il a été montré que TRAP est moins exprimé dans les cellules résorbantes que dans les non-résorbantes, (Moonga et al., 1990). Cette étude pourrait donc laisser supposer que les cellules dont l'activité était plus importante étaient en fait des cellules non-résorbantes. Yamada a montré que l'activité de résorption dépend du degré de solubilité des biomatériaux. Une solubilité élevée se traduisant par une libération importante de calcium extracellulaire, diminue la résorption des biomatériaux, (Yamada et al., 1997).

Moonga a également observé qu'une concentration de calcium à 20 mM, diminue de façon significative, la sécrétion d'enzymes par les ostéoclastes résorbants par rapport aux ostéoclastes non-résorbants, (Moonga et al., 1990). Zaidi a montré que des récepteurs isoformes de la ryanodine de type II sont responsables de la détection du niveau de calcium dans le milieu extracellulaire, et que leur augmentation inhibe l'activité de résorption des ostéoclastes, (Zaidi et al., 1999).

Le fait qu'il y ait un effet de microstructure observé sur l'activité enzymatique de TRAP, pour les matériaux de même composition chimique, SiHA et HA, laisse supposer que les cellules ont été influencées par la quantité de calcium libérée dans le milieu par les biomatériaux. En effet, la dissolution est aussi dépendante de la microstructure. On peut émettre l'hypothèse que des biomatériaux poreux se dissolvent plus rapidement.

Concernant le biomatériau SiHA poreux, on peut également émettre l'hypothèse que la quantité plus importante de silicium libéré dans le milieu, comparé à la pastille dense, a contribué à inhiber l'activité de biorésorption. Plusieurs études ont en effet démontré que le silicium avait des effets négatifs sur l'activité ostéoclastique (Schütze et al., 1995), (Mladenović et al., 2014), (Schröder et al., 2012). L'activité ostéoclastique



ne serait pas la seule ciblée par l'action directe du silicium sur les cellules. Ainsi, la prolifération a augmenté sur SiHA poreux alors que l'activité de TRAP 5b était réduite à son minimum suggérant que l'augmentation de la libération du silicium favorise la prolifération des précurseurs ostéoclastiques au détriment de la différenciation des cellules RAW 267.4. Au contraire, la substitution en carbonate de 4,4 % massique maintiendrait un équilibre entre prolifération et différenciation.

Concernant les biomatériaux CHA, comme démontré dans la littérature, la présence de carbonate augmente la dissolution, (Barralet et al., 2000). Ces biomatériaux libèrent une quantité de calcium importante dans le milieu, (Monchau et al., 2002), (Spence et al., 2009). En plus du phénomène de dissolution, certaines études ont montré que la substitution en carbonate augmente l'activité de biorésorption des ostéoclastes, (Doi et al., 1998), (Hasegawa et al., 2003), (Kanayama et al., 2011). L'hypothèse du fort taux de calcium libéré dans le milieu du fait de ces deux phénomènes aurait contribué à limiter l'activité enzymatique de TRAP 5b à posteriori. En effet, comme énoncé précédemment, une importante concentration calcique rétro-régule l'activité de TRAP 5b en la diminuant : c'est le mécanisme d'auto-régulation dont parle Moonga dans sa publication, (Moonga et al., 1990).

Ainsi, la plus faible activité enzymatique retrouvée sur CHA, quelle que soit sa microstructure, est le reflet d'une importante dégradation de ces matériaux en amont. En revanche, la faible activité enzymatique de TRAP 5b retrouvée pour les biomatériaux poreux HA et SiHA poreux, comparée aux biomatériaux denses de même composition chimique, est le signe d'une faible activité de résorption sur les biomatériaux poreux, comparée aux biomatériaux denses. En effet, la prolifération des précurseurs ostéoclastiques est privilégiée au détriment de la différenciation et donc de l'activation des ostéoclastes.

L'analyse de la surface des biomatériaux en MEB, après élimination des cellules, a prouvé que tous les biomatériaux ont été résorbés par les ostéoclastes. Cependant, le profil de biorésorption était différent selon les différents biomatériaux. L'érosion de surface observée avant le retrait des cellules a prouvé qu'un phénomène de dissolution des pastilles avait également commencé et particulièrement sur les pastilles poreuses. Cela conforte l'hypothèse émise précédemment selon laquelle plus la libération de calcium par les pastilles est importante, plus la différenciation et l'activité de résorption est diminuée voire inhibée.

Les plus grosses lacunes observées sur SiHA, quelle que soit la microstructure, laissent supposer que les cellules ont mieux adhéré sur SiHA pour réorganiser leur cytosquelette et la formation d'anneaux d'actine, pour délimiter la zone de scellement des cellules aux biomatériaux. Cela pourrait s'expliquer par la présence de groupement Si-OH en surface des biomatériaux qui ont plus d'affinité pour des protéines de la membrane cellulaire (Schwarz, 1973). Une étude quantitative du volume des lacunes et du nombre de lacunes par unité de surface pourrait être complémentaire à l'analyse qualitative pour renforcer l'hypothèse d'une plus grande résorption sur CHA quelle que soit la microstructure suivie des biomatériaux denses HA et SiHA comparés aux biomatériaux poreux HA et SiHA.

#### IV.4.5.4.2. **Sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes**

Dans la littérature, très peu d'études ont montré que le VEGF-A est sécrété directement par les ostéoclastes. Cette étude a prouvé que les ostéoclastes sécrètent du VEGF-A, au contact de biomatériaux HA, SiHA et CHA, quelle que soit leur microstructure.

A 14 jours, en comparant le profil d'expression de l'activité enzymatique de TRAP 5b et la sécrétion du VEGF-A ([Figure 79](#) et [Figure 81](#)), une corrélation a pu être établie. Concernant HA et SiHA, lorsque l'activité enzymatique de TRAP 5b était élevée, sur les biomatériaux denses, il y a eu peu de VEGF-A sécrété. Au contraire, lorsque l'activité enzymatique de TRAP 5b diminue, dans les biomatériaux poreux, la sécrétion de VEGF-A augmente. Le comportement cellulaire était différent sur CHA. Il n'y a pas eu d'influence de la microstructure. La concentration de VEGF-A sécrétée par les cellules sur CHA, quelle que soit la microstructure, est d'un niveau intermédiaire entre les concentrations élevées sécrétées par les cellules sur SiHA et HA poreuse et plus faibles sécrétées par les cellules sur HA dense et SiHA dense. L'influence sur l'activité cellulaire viendrait donc de la substitution en ions carbonates et non de la microstructure.

Les cellulesensemencées sur CHA ont un métabolisme et une activité de résorption importante du fait de la substitution en ions carbonates. La résorption des céramiques phosphocalciques carbonatées CHA s'est traduite par la libération d'une quantité importante de calcium dans le milieu qui a eu pour conséquence l'auto-régulation de l'activité de TRAP 5b, donc une diminution de l'activité de TRAP 5b.

L'expression du VEGF-A par les ostéoclastes est généralement plus importante dans les ostéoclastes larges retrouvés dans des conditions pathologiques en comparaison des petits ostéoclastes, (Trebec et al., 2007). Le VEGF-A apparait comme l'un des possibles facteurs sécrétés par les ostéoclastes, susceptible de promouvoir l'activité de résorption des ostéoblastes, (Gerber et al., 1999), (HaDuong et al., 2015), (Hu and Olsen, 2016), (Huang et al., 2016). Les cellules ostéoclastiques non résorbantes (qui ne résorbent pas l'os mais qui régulent l'activité des cellules osseuses), ont un effet anabolique sur la migration et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules sécrètent le facteur PDGF qui a été identifié comme responsable de la migration, (Kreja et al., 2010). Le VEGF-A stimulerait la différenciation de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse vers une différenciation ostéoblastique au détriment d'une différenciation adipocytaire (Liu and Olsen, 2014).

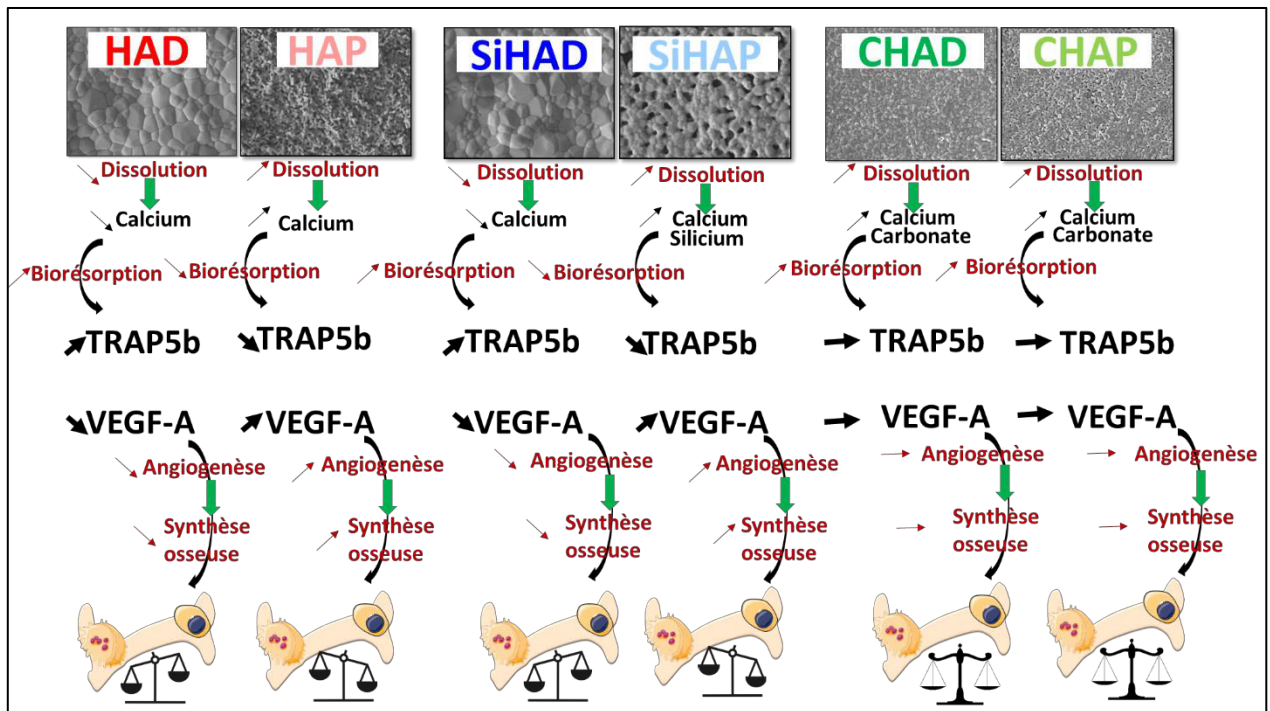
#### **IV.4.1. Conclusion de l'étude**

L'ensemble des évaluations biologiques et particulièrement l'activité enzymatique de la LDH, l'activité enzymatique de TRAP 5b, la sécrétion de VEGF-A et l'analyse de la surface des pastilles après élimination des cellules, a permis de corrélérer l'activité de biorésorption des ostéoclastes, avec la sécrétion de VEGF-A. Les caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux HA et SiHA, via la cinétique de dissolution des biomatériaux, donc, une libération de calcium et de silicium, a influencé l'activité de biorésorption des ostéoclastes. Les cellules sur les biomatériaux poreux présentaient une activité de TRAP 5b significativement plus faible, mais, une sécrétion de VEGF-A significativement plus élevée, par rapport aux cellules sur les biomatériaux denses, de même composition chimique, qui eux, présentaient une activité de résorption plus élevée. Les biomatériaux de microstructures poreuses favoriseraient par conséquent, une activité angiogénique et donc une formation osseuse prépondérante à l'activité de biorésorption. L'effet inverse serait observé pour les biomatériaux denses, qui favoriseraient la biorésorption, par rapport à la formation osseuse. Le biomatériau CHA indépendamment de la microstructure aurait une activité de résorption élevée mais favoriserait également une formation osseuse élevée. En effet, le niveau de sécrétion de VEGF-A par les cellules sur CHA, quelle que soit la microstructure, était du même

ordre que celui des cellules sur les biomatériaux denses HA et SiHA. La figure 82, (Figure 82), résume les tendances relevées pour les différents matériaux.

TRAP 5b est identifié comme étant un marqueur de la résorption osseuse. Une activité de sécrétion élevée de TRAP 5b est associée à une résorption importante. Cependant, récemment, des études *in vitro* ont montré que le niveau d'activité de TRAP 5b est auto-régulé par les concentrations élevées en calcium. Ainsi, une faible activité de TRAP 5b peut être soit la résultante d'une faible activité de résorption ou bien la conséquence d'une auto-régulation par des concentrations élevées en calcium libérée dans le milieu, du fait d'une activité de résorption importante. Cette étude a permis de comprendre la relation existant entre les deux molécules : VEGF-A et TRAP 5b, pouvant servir comme de possibles marqueurs de la résorption osseuse. L'analyse combinée des deux marqueurs simultanément permettrait un diagnostic plus fiable. Dans ce modèle d'étude, après 14 jours de culture, une gamme de  $[279 \pm 12 - 297 \pm 10]$  pg / mL de VEGF-A sécrétée par des ostéoclastes et une faible activité enzymatique de TRAP 5b ont été identifiées comme une combinaison de marqueurs associés à une bonne activité de bioresorption. Néanmoins, lorsque la concentration de VEGF-A atteint plus de 300 pg / mL et est associée à une faible activité enzymatique de TRAP 5b, l'activité de résorption diminue.

L'expression inversement corrélée de ces deux protéines pourrait servir pour le diagnostic des maladies métaboliques osseuses. Le diagnostic non invasif de maladies osseuses telles que l'ostéoporose étant un challenge, des études plus poussées sur le fonctionnement de ces deux molécules mériteraient d'être entreprises.



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

Ce schéma est issu de l'ensemble des résultats des évaluations biologiques obtenues. Des expériences supplémentaires telles qu'une co-culture, voire une tri-culture (ostéoblastes, ostéoclastes, cellules endothéliales) permettraient de mieux apprécier le rôle de la sécrétion de VEGF-A par les ostéoclastes et de confirmer les hypothèses émises