



HAL
open science

Etude de l'adhésion d'ostéoblastes sur substituts apatitiques par microscopie à force atomique

Julien Combes

► **To cite this version:**

Julien Combes. Etude de l'adhésion d'ostéoblastes sur substituts apatitiques par microscopie à force atomique. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2009. Français. NNT: . tel-00445705

HAL Id: tel-00445705

<https://theses.hal.science/tel-00445705v1>

Submitted on 11 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre : 525GP

THÈSE

présentée par

Julien COMBES

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

ETUDE DE L'ADHESION D'OSTEOBLASTES SUR SUBSTITUTS APATITIQUES PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

soutenue à Saint-Etienne, le 28 avril 2009

Membres du jury

Président :	Pierre HARDOUIN	Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale
Rapporteurs :	Sylvie WENDLING-MANSUY Jérôme CHEVALIER	Maître de Conférences, Université de la Méditerranée Professeur, INSA de Lyon
Examineur(s) :	Karine ANSELME Aline RATTNER Eric CHAMPION	Chargée de recherche, Université de Mulhouse Colmar Alsace Maître de Conférences, Université de Saint-Etienne Professeur, Université de Limoges
Directeur de thèse :	Didier BERNACHE-ASSOLLANT	Professeur, ENS des Mines de Saint-Etienne

Spécialités doctorales :

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 IMAGE, VISION, SIGNAL
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables :

J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS
 A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS
 G. THOMAS Professeur – Centre SPIN
 B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN
 J. BOURGOIS Professeur – Centre SITE
 E. TOUBOUL Ingénieur – Centre G2I
 O. BOISSIER Professeur – Centre G2I
 JC. PINOLI Professeur – Centre CIS
 P. BURLAT Professeur – Centre G2I
 Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 2	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
ASSOLANT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BIGOT	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BILAL	Olivier	PR 2	Informatique	G2I
BOISSIER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUCHER	Marie-Reine	MA	Génie Industriel	DF
BOUDAREL	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BOURGOIS	Christian	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
BURLAT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COLLOT	Michel	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
COURNIL	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DAUZERE-PERES	Michel	ICM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DARRIEULAT	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DECHOMETS	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DESRAYAUD	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DELAFOSSÉ	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DOLGUI	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRAPIER	Julian	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DRIVER	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FOREST	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FORMISYN	Roland	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FORTUNIER	Anna	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FRACZKIEWICZ	Daniel	CR	Génie des Procédés	SPIN
GARCIA	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GIRARDOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GOEURIOT	Patrice	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GOEURIOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GRAILLOT	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GROSSEAU	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Bernard	DR	Génie des Procédés	CIS
GUILHOT	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUY	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
GUYONNET	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Helmut	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
KLÖCKER	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LAFORÉST	Rodolphe	CR	Mécanique et Ingénierie	SMS
LERICHE	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
LI	Henry	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LONDICHE	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MOLIMARD	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
MONTHEILLET	Laurent	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PERIER-CAMBY	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Jean-Charles	PR 1	Image, Vision, Signal	CIS
PINOLI	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
STOLARZ	Konrad	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
SZAFNICKI	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
THOMAS	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VALDIVIESO	Alain	PR 0	Mécanique & Ingénierie	SMS
VAUTRIN	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
VIRICELLE	Krzysztof	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
WOLSKI	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS
XIE				

Glossaire :

PR 0	Professeur classe exceptionnelle
PR 1	Professeur 1 ^{ère} catégorie
PR 2	Professeur 2 ^{ème} catégorie
MA(MDC)	Maître assistant
DR (DR1)	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
ICM	Ingénieur en chef des mines

Centres :

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	
SITE	Sciences des Processus Industriels et Naturels
G2I	Sciences Information et Technologies pour l'Environnement
CMP	Génie Industriel et Informatique
CIS	Centre de Microélectronique de Provence
	Centre Ingénierie et Santé

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les chercheurs et enseignants-chercheurs qui ont accepté d'évaluer ce travail :

- Sylvie Wendling et Jérôme Chevalier, les rapporteurs, qui ont lu particulièrement en détail le manuscrit et ont fait part de leurs remarques et critiques constructives.
- Pierre Hardouin pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.
- Karine Anselme, pour avoir, non seulement été membre de mon jury, mais aussi pour avoir, sans le savoir, orienté mes travaux et mes réflexions !
- Aline Rattner avec qui j'avais eu le plaisir de partager presque quotidiennement mon travail de thèse et Eric Champion qui suivi nos expériences de près grâce à la collaboration que nous entretenons avec son équipe de recherche.

C'est un grand honneur et un non moins grand plaisir de les compter parmi les membres du jury.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude à Didier Bernache-Assollant, pour avoir encadré (et pas seulement...) cette thèse. Une relation particulière entre thésard et directeur de thèse, mais au final, sa clairvoyance et sa générosité auront eu raison de certains de mes traits de caractères. D'autres ne l'auraient pas fait, merci.

Ce travail de recherche a officiellement commencé en octobre 2005 mais, comme l'on dit communément, le loup était déjà dans la bergerie. En effet, depuis février 2005, j'étais en stage au Laboratoire de Biomatériaux et Biomécanique sous la direction de M. Forest. Comment oublier cette époque où tant de choses se mirent en place ? Merci M. Forest, merci Perrine, merci Jérôme, merci Nico, merci Jean... merci le J3.02. Merci les écureuils.

En octobre, dans un souci d'organisation – je devenais thésard !-, il a fallu déménager. Au revoir J3-02, bonjour C3-21. Bonjour Laurent. Ah Laurent...Laurent...Laurent... Merci !

Peut être qu'un jour nous arriverons à oublier cette période de notre vie, nos égarements, nos dérives... mieux vaut alors ne pas en écrire plus.

Pas trop loin de nous, se trouvait le bureau d'une personne comme on en fait rarement. Cette personne, c'est Anne-Marie Danna. Nul ne peut s'imaginer combien elle fût importante pour moi pendant ces 3 années. Plus qu'un remerciement, c'est un profond respect que je te dois Anne-Marie.

Un remerciement à Mickael. Ta rencontre a été plus qu'un déclic dans ce projet de thèse. Si mes cellules ont survécu sur tes matériaux, c'est avant tout grâce au cœur que tu as mis pour produire ces petites pastilles. Heureux d'avoir partagé avec toi ma découverte des congrès (et de tout ce qui va avec), surtout heureux de t'avoir rencontré. Quelle belle ville Berlin.

Dans la même lignée limougeaude, un grand merci à David pour m'avoir accompagné en fin de thèse. Ton expérience a ralenti ma chute de cheveux. Merci.

Mes remerciements vont, bien entendu, vers ceux qui ont collaboré avec moi pendant ces trois années. Je pense à l'ensemble du personnel du LBTO et de l'école. Que ce soit des membres

du CIS, de SPIN ou de SMS. Une petite pensée aux « essais mécas », je vais regretter les moments passés en ce lieu.

Merci à mes amis, à ma famille.

Merci La Kolok,

Merci Ussac, Zonbri, Radon et Chapendu et la Youse,

Merci Sir Edwards,

Merci Pizza Pelle... « *les pizzas qu'on appelle* »,

Merci Bafé.

Panda dit: tftftftfff Panda dit: gogogogogogg Bafétimbis dit: allez go Panda dit: go

Dernier message reçu à 9h22

Merci Carole.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Rappels bibliographiques	7
1.1. Biologie du tissu osseux	8
1.1.1. Les cellules	9
1.1.1.1. Les cellules ostéoclastiques	9
1.1.1.2. Les cellules ostéoblastiques	10
1.1.2. La matrice extracellulaire	10
1.1.3. Le remodelage osseux	11
1.2. Rôle du cytosquelette dans le comportement mécanique de la cellule	12
1.2.1. Le réseau d'actine	14
1.2.1.1. Le réseau cortical d'actine	15
1.2.1.2. Le réseau profond de fibres de tension	16
1.2.2. Les microtubules	16
1.2.3. Les filaments intermédiaires	17
1.3. La mécanique cellulaire	18
1.3.1. Réseaux cytosquelettiques reconstitués	19
1.3.2. Outils pour l'étude de la mécanique cellulaire	20
1.3.2.1. Etude de la rigidité cellulaire par indentation à l'aide d'une pointe AFM	24
1.3.2.2. Discussion à propos des méthodes d'étude de la mécanique cellulaire	26
1.3.3. Les modèles viscoélastiques cellulaires	27
1.3.3.1. Les modèles comportementaux	28
1.3.3.2. Les modèles structuraux	28
1.3.3.3. Discussion à propos des modèles viscoélastiques cellulaires	29
1.4. Adhésion ostéoblastique	30
1.4.1. Les sites d'adhésion cellulaire	31
1.4.2. Les intégrines	32
1.4.3. Impact de l'adhésion cellulaire sur le cytosquelette	32
1.4.4. Influence de la chimie du substrat sur l'adhésion cellulaire	33
1.4.5. Influence de la rugosité du substrat sur l'adhésion cellulaire	34
1.5. Les biomatériaux	35
1.5.1. Les matériaux d'origine naturelle	36
1.5.2. Les métaux et alliages métalliques	36
1.5.3. Les polymères et matière molle	37
1.5.4. Les céramiques	37
1.5.4.1. Les céramiques bioinertes	37
1.5.4.2. Les céramiques bioactives	38
1.5.4.3. Les céramiques biorésorbables	38
1.6. Les apatites phosphocalciques synthétiques à usage biologiques	38

1.6.1.	L'hydroxyapatite stœchiométrique _____	39
1.6.2.	Les hydroxapatites silicatées _____	41
1.6.3.	Les hydroxapatites carbonatées _____	43
1.7.	Conclusion et objectifs de thèse _____	44

Chapitre 2 : Préparations et caractérisation des échantillons de biomatériaux et techniques expérimentales _____ 45

2.1.	Préparation et caractérisation des biomatériaux _____	46
2.1.1.	Montage et protocole de synthèse des poudres d'apatites _____	46
2.1.2.	Caractérisations des poudres d'apatites stœchiométriques et carbonatées ____	48
2.1.2.1.	Analyses structurales - Diffraction des rayons X _____	49
2.1.2.2.	Analyses spectroscopiques - Infrarouge _____	50
2.1.2.3.	Analyse chimique du carbone _____	53
2.1.2.4.	Morphologie et caractéristiques physiques des poudres _____	55
2.1.2.5.	Conclusion sur la synthèse des apatites stœchiométriques et carbonatées 57	
2.1.3.	Elaboration des pastilles d'apatites stœchiométriques et carbonatées par frittage 58	
2.1.3.1.	Elaboration des préformes _____	58
2.1.3.2.	Frittage des pastilles _____	59
2.1.3.3.	Caractérisations des pastilles frittées _____	61
2.1.4.	Pastilles d'apatites silicatées _____	62
2.1.5.	Préparation de la surface des pastilles d'apatites et de TA6V _____	62
2.2.	Technique de culture cellulaire _____	63
2.2.1.	Culture de la lignée cellulaire MG 63 _____	63
2.2.2.	Cultures en puits _____	64
2.3.	La microscopie à force atomique _____	65
2.3.1.	Principes et fonctionnement _____	65
2.3.1.1.	Les différents modes d'utilisation de la microscopie à force atomique _	66
2.3.1.2.	Description du matériel _____	66
2.3.1.3.	Calibration de la céramique piézoélectrique _____	67
2.3.1.4.	Calibration du microlevier _____	67
2.3.2.	Imagerie AFM de la morphologie cellulaire _____	68
2.3.3.	La spectroscopie de force _____	69
2.3.3.1.	Description de la technique et traitement des données _____	70
2.3.3.2.	Modèles de contact _____	74
2.3.3.3.	Application des modèles de contact à l'indentation à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique. _____	76
2.4.	Conclusion _____	78

Chapitre 3 : Validation de la méthode d'évaluation de la rigidité cellulaire _____ **81**

3.1. Choix des courbes de forces à exploiter	82
3.2. Indentation de cellules modèles	83
3.2.1. Méthode utilisée	84
3.2.2. Résultats	85
3.3. Discussion à propos de la dispersion de la réponse mécanique cellulaire	93
3.4. Conclusion de l'étude	98

Chapitre 4 : Etude de la rigidité et de l'adhésion cellulaires sur les hydroxyapatites substituées _____ **99**

4.1. Dynamique de la population cellulaire	100
4.1.1. Principe	100
4.1.2. Protocole	101
4.1.3. Résultats	101
4.2. Etude par marquages fluorescents de l'adhésion des ostéoblastes sur les hydroxyapatites substituées	102
4.2.1. Principe	103
4.2.2. Protocole	103
4.2.3. Résultats	104
4.3. Détermination par indentation à l'aide d'une pointe AFM de la rigidité d'ostéoblastes adhérents sur les hydroxyapatites substituées	108
4.3.1. Résultats	109
4.4. Discussion	112
4.5. Conclusion	114

Chapitre 5 : Etude de la relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents _____ **117**

5.1. Protocole expérimental	118
5.2. Acquisition des courbes de relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents	121
5.2.1. La déviation du tube piézoélectrique	124
5.2.2. Conclusion	126

5.3. Influence du lieu d'indentation sur la relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents.	127
5.3.1. Influence du lieu d'indentation sans distinction du substrat	128
5.3.2. Influence du lieu d'indentation avec distinction du substrat	129
5.3.2.1. Force d'indentation de 2nN	129
5.3.2.2. Force d'indentation de 3nN	131
5.4. Evolution de la rigidité des ostéoblastes au cours des essais de relaxation	133
5.4.1. Evolution de la rigidité après indentation du cytosquelette	133
5.4.2. Evolution de la rigidité après indentation de la membrane	134
5.5. Discussion	135
5.6. Conclusion de l'étude	137
<i>Conclusion générale</i>	139
<i>Références bibliographiques</i>	143
<i>Annexes</i>	155

Introduction générale

Les pertes de substances osseuses, liées à l'âge ou à certaines pathologies, quand elles sont conséquentes, entravent les capacités naturelles de réparation de l'os. Leur traitement repose essentiellement sur l'apport d'os autologue. Toutefois cette technique présente certaines limites. En effet, la quantité d'os prélevé est limitée et elle engendre une morbidité non négligeable. Une alternative est l'utilisation de biomatériaux pour fabriquer les prothèses, les implants et le matériel utilisé en chirurgie.

Dès 1892, Dressman utilisait le plâtre de Paris (sulfate de calcium) pour combler certains défauts osseux. Un siècle plus tard, des travaux montrent l'importance des matériaux qui influencent la repousse osseuse et la minéralisation. Pour ce faire, différentes formulations de biomatériaux ont été élaborées pour se rapprocher le plus possible de la référence qui est la greffe autologue. Actuellement, les matériaux à base de phosphate de calcium sont classiquement employés en tant que substituts osseux. Les principaux avantages des composés phosphocalciques sont, en autres, leur similarité avec la phase minérale osseuse, leur bioactivité ou leur ostéoconduction. Ils sont disponibles sous formes de granules, de blocs, d'enduits pour implants dentaires ou orthopédiques et de ciments. Le phosphate tricalcique β (β TCP), de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6$, est très largement utilisé comme comblement osseux alors que l'hydroxyapatite (HA), de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, est principalement utilisée comme revêtement ou ciment. La très faible résorbabilité de l'HA est un obstacle à son utilisation comme matériau de comblement. Des substitutions ioniques en son sein peuvent modifier ses propriétés et donc être une solution envisageable en vue de son amélioration.

L'hydroxyapatite partiellement substituée par des ions carbonates ou des ions silicates constituerait un substitut osseux aux propriétés biologiques particulièrement intéressantes. Les ions carbonates sont naturellement présents dans la phase minérale du tissu osseux. L'intérêt porté à l'apatite carbonatée tient au bon comportement biologique que l'on peut en attendre, du fait de ses similitudes chimiques et cristallographiques avec l'os minéral. Elle présente une structure très lacunaire, imposée par les substitutions ioniques, et possède une solubilité en milieu physiologique, supérieure à celle de l'HA. De son côté, l'élément silicium (Si) (environ 0,05% de la masse corporelle) joue un rôle important dans la solidité, la formation et la calcification des tissus osseux. Des études récentes montrent l'importance de cet élément sur le processus de biominéralisation ou la stimulation du métabolisme osseux.

Le lieu de l'interaction entre un biomatériau et son environnement étant l'interface matériau/tissu, la composition superficielle et l'état de surface d'un biomatériau sont déterminants dans la réussite de l'implant. La diversité des procédés de fabrication engendre

une forte variabilité des propriétés des matériaux tels que la cristallisation, le taux de densification, la porosité ouverte, la rugosité, ou la présence de phases secondaires... autant de paramètres influençant la réponse biologique du matériau. Les apatites testées dans notre travail ont été synthétisées par nous-mêmes ou à Limoges (laboratoire SPCTS), dans des conditions rigoureuses. Le but était l'obtention d'échantillons parfaitement définis en termes de chimie et d'état de surface.

La mise en évidence de l'effet de la substitution ionique sur la bioactivité de ces matériaux n'est pas une tâche aisée : elle requiert de nombreuses mises à l'épreuve du matériau traité dans des environnements biologiques variés (cultures cellulaires, expériences animales, expériences cliniques humaines). Nous avons opté pour une évaluation *in vitro* des matériaux en focalisant notre étude sur l'adhésion des ostéoblastes (cellules osseuses qui synthétisent l'os) à leur surface. L'adhésion cellulaire est en effet un processus fondamental puisque les cellules doivent être en interaction avec une surface pour survivre. Par ailleurs, les cellules forment au niveau de leur membrane plasmique, des structures allongées, les contacts focaux, véritable « joints adhésifs » entre la surface et le cytosquelette d'actine situé à l'intérieur de la cellule. Contrairement au squelette humain rigide, le cytosquelette possède une dynamique propre. En étant responsable de la mécanique des cellules, il assure à la fois la stabilité et la mobilité de celles-ci. Le lien intime entre la qualité de l'adhésion cellulaire et la rigidité du cytosquelette nous a amené à évaluer la rigidité des ostéoblastes comme information indirecte de l'adhésion.

Par ailleurs, les cellules adhérentes ont un comportement viscoélastique complexe : leurs propriétés mécaniques sont couramment décrites par deux paramètres : le module d'élasticité noté E et la viscosité notée μ . Cependant, ces paramètres ne suffisent pas à décrire leur comportement mécanique. L'un des buts de la biomécanique est d'identifier les relations entre la forme de la cellule, sa structure, ses propriétés mécaniques et sa fonctionnalité. Cette connaissance est essentielle pour permettre une meilleure compréhension de la physiologie durant la croissance cellulaire, la division, la motilité et la transduction de signaux, ainsi que pour les pathologies induisant par exemple des proliférations incontrôlées ou inversement des nécroses. Une partie de nos travaux a porté sur l'évaluation du comportement viscoélastique d'ostéoblastes adhérents sur deux biomatériaux traditionnellement utilisés : l'hydroxyapatite et un alliage titane (TA6V).

En outre, le développement rapide de la biomécanique est couplé aux avancées instrumentales de la chimie ou de la physique. Les nanotechnologies, dont la Microscopie de Force Atomique (MFA) fait partie, permettent d'explorer des domaines très divers avec une

grande précision. Elles apportent de nombreuses informations dans une grande gamme d'échelles spatiale et temporelle. C'est cet outil que nous utiliserons pour la caractérisation des propriétés mécaniques des ostéoblastes.

Ce manuscrit se décompose en 5 chapitres

Le premier est un rappel bibliographique. Il présente rapidement le « fonctionnement » du tissu osseux. Sont ensuite détaillés l'architecture cellulaire et les principaux constituants du cytosquelette, qui régit la forme et la dynamique de la structure. L'état actuel des connaissances sur l'adhésion cellulaire est brièvement présenté, ainsi que les propriétés viscoélastiques des cellules obtenues par différentes techniques expérimentales. Ceci constitue le contexte biologique et biomécanique dans lequel s'inscrit notre étude. D'autre part, notre étude bibliographique rappelle les principaux biomatériaux utilisés en chirurgie réparatrice, les apatites en particulier. Elle s'attache également à présenter l'influence des substitutions ioniques au sein de l'hydroxyapatite sur la réponse biologique.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons la préparation des échantillons denses des hydroxyapatites stoechiométriques, carbonatées et silicatées. Nous détaillons ensuite les protocoles de culture cellulaire utilisés. Le dispositif expérimental que nous avons mis en œuvre pour cette étude : le microscope à force atomique, et la méthode utilisée pour déterminer le module élastique des ostéoblastes adhérents sont présentés.

Dans le troisième chapitre, nous exposons la validation de la méthode d'évaluation de la rigidité cellulaire par indentation à l'aide d'une pointe AFM. Trois conditions ont été testées : cellules peu adhérentes, cellules adhérentes et cellules dont le cytosquelette a été surdéveloppé. Ce chapitre permet de discuter de la non-uniformité de la réponse mécanique suivant le lieu d'indentation.

Dans le quatrième chapitre, nous exposons les résultats obtenus lors de l'évaluation biologique des hydroxyapatites carbonatées et silicatées. L'adhésion des ostéoblastes a été choisie comme critère d'évaluation par l'observation du cytosquelette d'actine et des contacts focaux et l'évaluation des rigidités des cellules.

Le dernier chapitre présente les propriétés de viscoélastiques des cellulesensemencées sur l'hydroxyapatite stoechiométrique et TA6V. Une méthode originale a été mise en place, utilisant d'une façon particulière l'indentation à l'aide d'une pointe d'un microscope à force atomique. Cette méthode nous à permis d'évaluer la relaxation des cellules entre 2 et 200 secondes avec la possibilité de distinguer la relaxation des fibres d'actine ou de la membrane.

Chapitre 1 : Rappels bibliographiques

1.1. Biologie du tissu osseux

Il est acquis aujourd'hui que le squelette humain joue deux rôles essentiels dans l'organisme. D'une part, il doit, pour assurer ses fonctions mécaniques, constituer une structure rigide et mobile sur laquelle reposent organes vitaux et autres tissus mous. D'autre part, il est une source de minéraux solubles pour l'organisme et notamment de calcium. On retrouve trois grandes familles d'os dans le squelette humain : os longs (os des membres), os courts (vertèbres, os du carpe ou du tarse) et os plats (os du crâne, omoplates, sternum, côtes).

Deux types de structures osseuses sont à la base de tous les os : l'os compact (ou os cortical), qui représente, en volume, environ 85 % du squelette, et l'os spongieux (ou os trabéculaire) qui représente les 15 % restant. La résistance mécanique de l'os est assurée principalement par l'os cortical.

D'un point de vue ultrastructural, l'os peut être considéré comme un arrangement de fibrilles de collagène sur lesquelles et entre lesquelles sont déposés des cristaux d'apatite. Ces fibrilles sont regroupées parallèlement entre elles sous la forme de faisceaux formant ainsi des fibres, dont l'accolement constitue des lamelles de collagène. L'empilement compact de ces lamelles forme des unités de construction, appelées ostéons (figure 1.1) Ces ostéons sont séparés entre eux par d'autres zones lamellaires désorganisées, celles-ci correspondant en fait à des résidus d'anciens ostéons détruits lors du remodelage osseux. Nous reviendrons sur ce dernier point ultérieurement

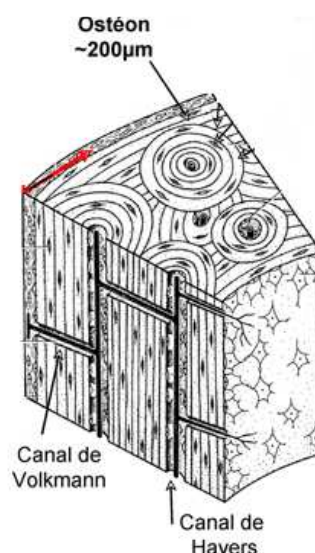


Fig. 1.1: Structure de l'os cortical. [D'après www.mssmat.ecp.fr]

La composition du tissu osseux est extrêmement variable selon le type d'os considéré. De plus, elle dépend de plusieurs facteurs propres à chaque individu, comme l'âge, le sexe,

l'hygiène de vie et l'histoire pathologique. Le tissu osseux est constitué de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire.

1.1.1. Les cellules

Il existe deux types de cellules osseuses : les cellules ostéoclastiques responsables de la résorption osseuse et les cellules ostéoblastiques (préostéoblastes, ostéoblastes matures, ostéocytes et cellules bordantes) responsables de la formation osseuse. Ces cellules sont les acteurs du cycle du remodelage osseux. Comme toutes les cellules elles sont délimitées par la membrane plasmique, une bicouche lipidique qui, tout en isolant la cellule du milieu extracellulaire, permet par sa perméabilité des échanges contrôlés. Enfermé par la membrane plasmique, le cytoplasme est constitué d'un fluide visqueux (cytosol) dans lequel se trouvent différents organites tels que le noyau, les mitochondries, les vacuoles, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (figure 1. 2)

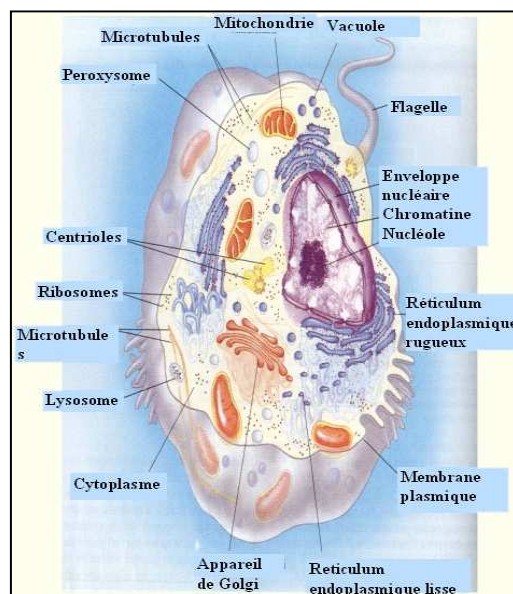


Fig. 1.2: Structure et organisation d'une cellule et de ses différents organites. [D'après <http://www.fundp.ac.be/>]

1.1.1.1. Les cellules ostéoclastiques

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (jusqu'à 100µm), hautement mobiles, plurinucléées (issues de la fusion de préostéoclastes mononucléées) dérivant des monocytes sanguins. La zone en contact avec la matrice osseuse développe des dendrites, ce qui d'une

part, augmente la surface de contact entre la cellule et le tissu et d'autre part, confine le changement de pH à une zone bien précise : les lacunes de Howship. Ils assurent respectivement la dissolution des minéraux osseux et la digestion de la matrice organique. L'action combinée de ces deux effets contribue à la résorption du tissu osseux.

1.1.1.2. Les cellules ostéoblastiques

Les ostéoblastes synthétisent la trame osseuse (ou tissu ostéoïde). L'ostéogénèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules *ostéoprogénitrices* qui, après arrêt de la multiplication cellulaire, se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées, cuboïdales polarisées dont le noyau est excentré. Au fur et à mesure que la matrice est synthétisée et minéralisée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et s'aplatissent. Certains ostéoblastes s'incorporent à l'ostéoïde et deviennent des ostéocytes. D'autres deviennent des cellules bordantes (lining cells).

1.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 % du volume) et inorganique (69 % du volume). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation [TOP 04].

La matrice organique forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance préosseuse. Les principales classes de macromolécules qui la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %).

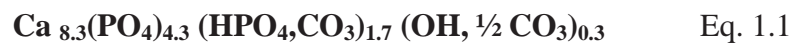
La matrice inorganique de l'os est un réservoir métabolique de sels minéraux. Durant la croissance, ils prendront progressivement la place de l'eau au cours de la minéralisation de l'ostéoïde néo-formé. Le tableau 1.1 présente la composition chimique élémentaire de la phase minérale de l'os. Nous constatons que les éléments les plus abondants sont le calcium et le phosphore dans un ratio égal à 1.66 sous formes d'ions.

Elément	Ca	P	CO ₂	Na	K	Mg	Sr	Cl	F
% massique	36.6	17.1	4.8	1	0.07	0.6	0.05	0.1	0.1

Tabl. 1.1 : composition chimique de la phase minérale de l'os

Ces ions se combinent pour former un grand nombre de sels relativement instables au cours de la minéralisation du tissu osseux. La minéralisation de l'ostéoïde est assurée par une hydroxyapatite.

Une composition chimique représentative du minéral osseux mature a été proposée par Legros en 1986 [LEG 86]:



Après la précipitation des premiers cristaux apatitiques, leur taille augmente rapidement par accrétion et ils confluent vers d'autres foyers de cristaux. De cette façon, une vague de minéralisation se propage dans l'ostéoïde nouvellement formé. Ces premiers dépôts évoluent vers la formation d'une apatite de plus en plus carbonatée et de mieux en mieux cristallisée.

1.1.3. Le remodelage osseux

L'ensemble des cellules présentes dans le tissu osseux permet la formation et la résorption de la matrice minérale (Figure 1.3). Leur activité est couplée lors du processus de remodelage qui consiste au renouvellement du tissu osseux pour assurer le maintien de la masse osseuse au cours de la vie adulte normale. Le résultat du travail d'une unité fonctionnelle de remodelage, comprenant un sous groupe ostéoclastique et un sous groupe ostéoblastique (résorption puis formation), est un ostéon (§ 1.1.1).

Le cycle du remodelage débute par une phase d'activation, caractérisée par la différenciation des ostéoclastes. L'ostéoclaste adhère à la surface osseuse avec constitution d'une zone de scellement conduisant à la constitution de la membrane plissée. Cette zone délimite ainsi l'espace de résorption où le pH est bas. L'acidité ainsi obtenue favorise la dissolution du cristal d'hydroxyapatite libérant des minéraux (calcium et phosphore) et permet la mise à nu de la matrice. Quand les ostéoclastes ont achevé une lacune ils meurent par apoptose. Le fond de la lacune est alors lissé par des cellules mononucléées de type macrophagique. Après la résorption et le « nettoyage » de la lacune, des ostéoblastes sont recrutés au fond de la lacune et combinent celle-ci en apposant une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice non minéralisée ou ostéoïde sera secondairement minéralisée ce qui lui confèrera sa solidité. On comprend alors qu'une maladie comme l'ostéoporose provienne d'un dérèglement de ce processus. En effet cette pathologie, reliée à une perte de

masse osseuse, est provoquée par un déséquilibre en faveur de la résorption. Celle-ci s'accroît avec le vieillissement. Découlant de la perte de masse osseuse, la diminution des propriétés mécaniques de l'os induit sa fragilisation. De nombreux traitements et de nombreuses préventions ont été développés dans le but de diminuer l'impact de cette maladie. Par exemple l'activité physique est une méthode pouvant positivement influencer le maintien ou l'augmentation de la masse osseuse.

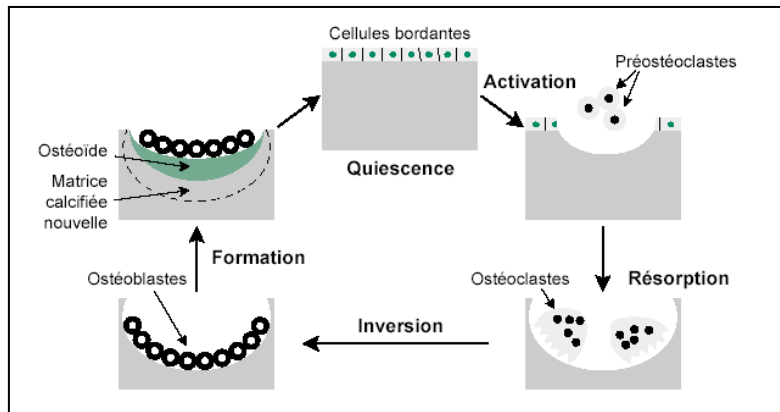


Fig. 1.3 : Les différentes phases du remodelage osseux

1.2. Rôle du cytosquelette dans le comportement mécanique de la cellule

La stabilité et la forme cellulaires sont déterminées par la microarchitecture développée par le cytosquelette, un réseau dynamique de 3 biopolymères semidilués aux rigidités sensiblement différentes : les filaments d'actine (actine F), les filaments intermédiaires et les microtubules [ARE 91] (figure 1.4). Chacun de ces polymères est respectivement constitué d'actine, de vimentine et de tubuline. Les cellules adhérentes présentent un cytosquelette très structuré. Les trois sous réseaux filamenteux s'organisent en interagissant et en générant une tension interne au cytosquelette.

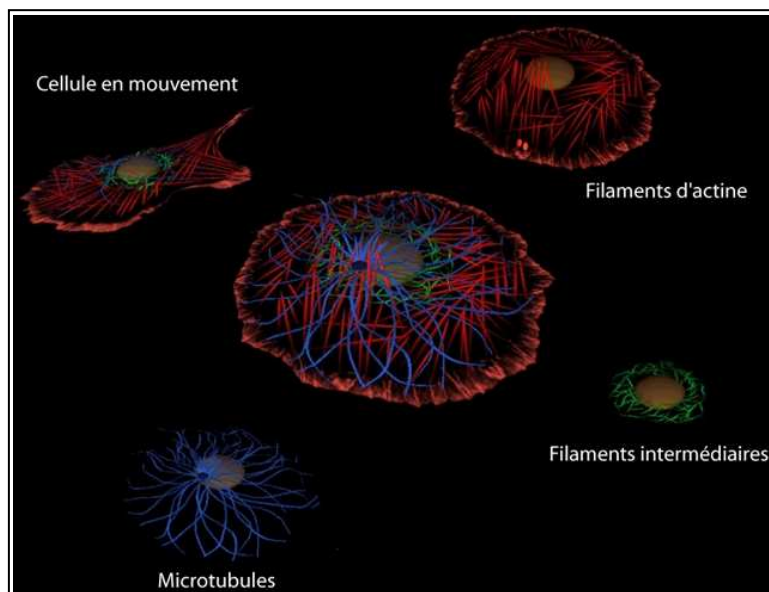


Fig. 1.4 : Positionnement des 3 cytosquelettes dans la cellule. Les filaments d'actine sont indiqués en rouge, les microtubules en bleu et les filaments intermédiaires en vert [MUL 06]

Harris [HAR 80] cultiva des fibroblastes sur un substrat déformable (silicone) et observa que celui-ci se plissait au niveau des zones d'adhésion des cellules, indiquant l'existence d'une tension interne aux cellules qui s'exerce sur le substrat (figure 1.5). Cette tension précontraint la cellule et lui confère des propriétés mécaniques particulières qui font l'objet de nombreuses études actuelles. En effet, les propriétés mécaniques des cellules ont une importance capitale pour l'ensemble de leurs fonctions : division, migration, différenciation, etc... Ces fonctions ne pourraient avoir lieu correctement si la cellule était trop ou pas assez rigide.

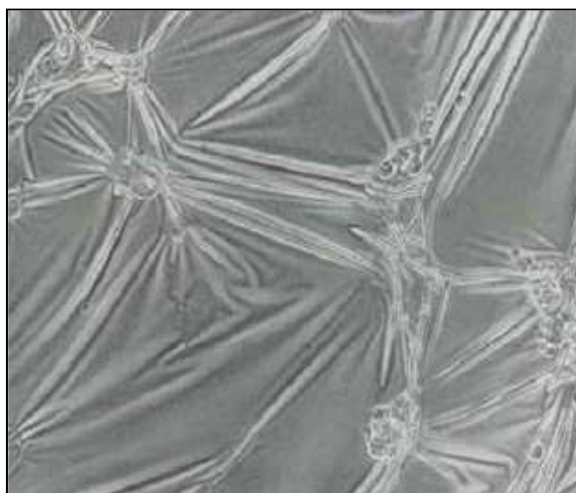


Fig. 1.5 : Visualisation des forces de tension générées par les cellules sur un substrat en silicone [HAR 80]

Par exemple, lors de la migration, les cellules sont capables de modifier leurs propriétés rhéologiques pour adopter un comportement physique observé lors de la transition solide-liquide [FEL 90]. D'ailleurs, les modifications anormales de rigidité cellulaire et tissulaire sont souvent associées à des pathologies. Les cellules tumorales par exemple, présentent des rigidités beaucoup plus élevées que les cellules saines du même tissu. Ceci est en lien avec leur prolifération excessive, même si les relations moléculaires précises entre rigidité et prolifération ne sont pas encore clairement établies [PAS 05].

1.2.1. Le réseau d'actine

Les filaments d'actine sont les principaux responsables de la mécanique cellulaire et en particulier de son caractère viscoélastique [WAN 94] [ZAN 89]. Ces filaments sont les plus fins des 3 biopolymères constituant le cytosquelette : ce sont des doubles hélices de diamètre 7 à 9 nm, formées par la polymérisation du monomère d'actine globulaire (G-actine, figure 1.6). Environ 50% de l'actine présente dans les cellules est sous la forme libre globulaire, le reste étant engagé dans les filaments (F-actine, figure 1.8). Via la polymérisation/dépolymérisation, le réseau d'actine est en constante réorganisation.

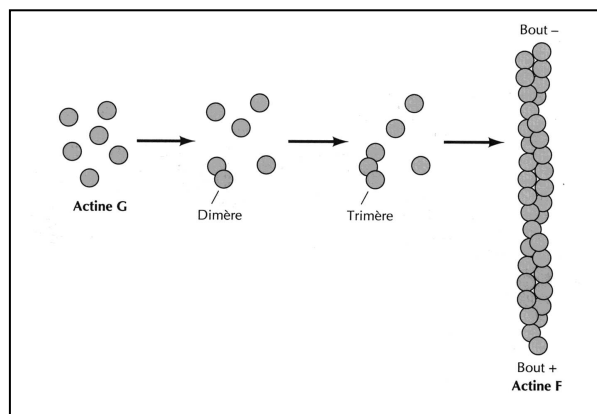


Fig. 1.6 : La nucléation et la polymérisation d'un filament d'actine, les monomères sont incorporés au bout "+", et sont libérés du bout "-", ce qui cause un déplacement global du filament (ici vers le bas)

Le module d'Young de 0,5 GPa de ces filaments est du même ordre que celui des microtubules (mesures réalisées sur des gels). Cependant, contrairement aux microtubules, l'actine n'est pas seulement présente dans la cellule sous forme de filaments isolés. Elle l'est aussi sous forme de réseaux. Le passage d'un filament unique à celle d'un réseau de filaments enchevêtrés, réticulés et pouvant même coulisser les uns par rapport aux autres n'est pas

simple. En effet, une myriade d'agents de réticulation, de moteurs protéiques ou de protéines régulatrices joue un rôle crucial dans la structure et la dynamique cytosquelettique, et influence les propriétés mécaniques du cytosquelette. Les petites protéines de réticulation (α -actinine, fimbrine) arrimeront les filaments d'actine, forçant ceux-ci à adopter un arrangement parallèle, c'est-à-dire en faisceau. Par contre, les protéines de réticulation longues et flexibles (filamine, spectrine, dystrophine) permettent aux filaments le choix de leur disposition et leur maintien en réseau. Les filaments d'actine s'organisent en deux sous réseaux qui possèdent des spécificités biologiques et mécaniques. Il s'agit du réseau cortical (ou cortex), un entrelacement fin de filaments d'actine situé sous la membrane plasmique, et du réseau formé de fibres de tension qui sont des arrangements en faisceaux hautement réticulés et contractiles.

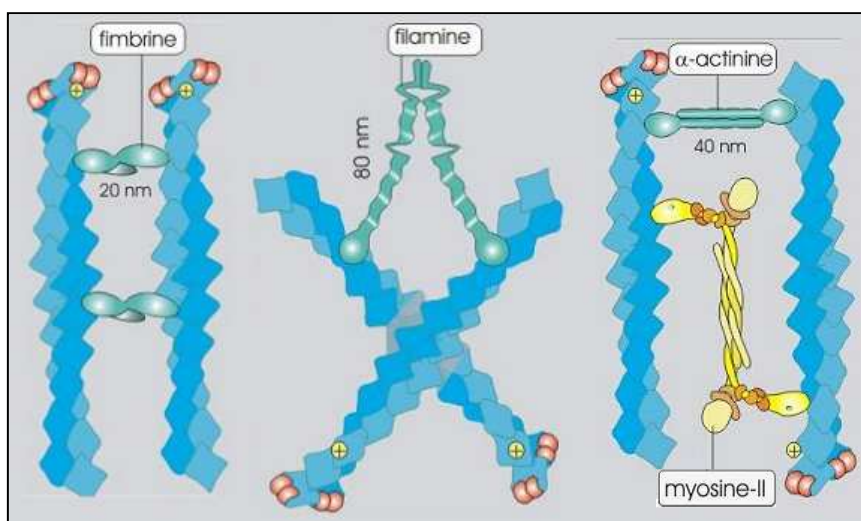


Fig. 1.7 : Rôle des protéines associées aux filaments d'actine (filamine, α -actinine, fimbrine et myosine-II) [D'après www.ulyse.u-bordeaux.fr/]

1.2.1.1. Le réseau cortical d'actine

Le réseau cortical d'actine est composé de très nombreux filaments courts d'une longueur moyenne d'une centaine de nanomètres, pour un diamètre de 10 nm. Ce réseau est positionné sous la membrane apicale de la cellule. Il donne à la membrane cellulaire sa topologie et pourrait être impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'endocytose, l'exocytose ou l'ouverture de canaux ioniques [BRE 91]. On retrouve aussi ce réseau autour des fibres de tension [KAT 00].

1.2.1.2. Le réseau profond de fibres de tension

Contrairement au cortex d'actine, ce réseau est beaucoup moins diffus. Il est constitué de filaments d'actine couplés à des protéines de myosine et possède une contractilité élevée. D'une longueur pouvant varier de $2.5\mu\text{m}$ à plus de $100\mu\text{m}$ *in vitro*, ces fibres sont le support de toute la traction que la cellule développe sur le substrat. On retrouve principalement ces fibres en périphérie de la cellule et sur la face basale de la cellule où elles la traversent de part en part. Aussi, et d'une manière beaucoup moins décrite dans la littérature, on les retrouve sur la face apicale de la cellule [HOT 06]. Les travaux de Katoh et Kano montrent l'existence de fibres de stress reliant la face apicale à la face basale de la cellule [KAT 95] [KAN 96]. Certaines présentent la forme d'arches. D'autres auteurs montrent l'existence de fibres dorsales qui aident au maintien de la morphologie cellulaire [HEA 83][SMA 98]. Plus récemment, Pellegrin apporte des informations sur la structure et l'organisation de ces arches qui seraient formées grâce à la rencontre de filaments dorsaux avec des filaments apicaux [PEL 07].

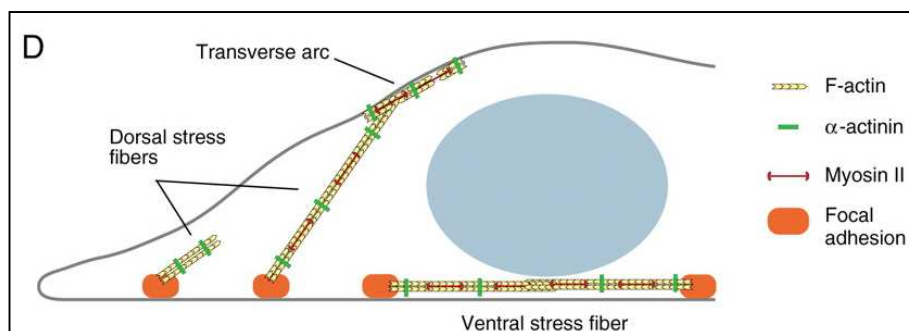


Fig. 1.8 : Différents types de fibres de stress présentes dans une cellule, leurs liens avec les contacts focaux et leurs protéines associées [PEL 07].

1.2.2. Les microtubules

Les microtubules sont composés de tubuline, une protéine comprenant deux sous unités α et β s'associant en dimères. Les dimères de tubuline polymérisent en tube cylindrique creux de 24 nm de diamètre (Figure 1. 9). Dans la cellule, les microtubules croissent généralement à partir d'un complexe protéique appelé centrosome situé près du noyau et sont organisés en aster. Les microtubules sont les entités les plus rigides du cytosquelette. Ils ne présentent pas un module d'Young beaucoup plus élevé que celui des filaments d'actine (1 à 2

GPa). Leur résistance à la flexion et à la torsion sont respectivement 1000 fois et 300 fois plus grande que celle des filaments d'actine (mesures réalisées sur des gels) [MIT 92].

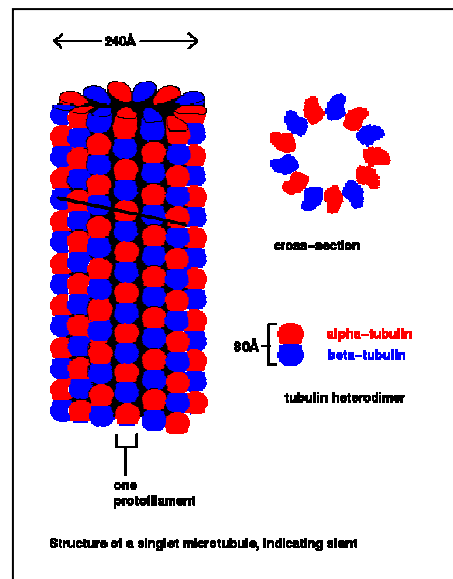


Fig. 1.9 : Schéma de la structure et de la polymérisation d'un microtubule. [D'après : <http://www.med.unibs.it/>]

Stamenovic a proposé que les microtubules avaient pour rôle de contrebalancer la tension générée par le réseau d'actine [STA 02]. Brangwynne montra effectivement que les microtubules supportaient des efforts de compression provoqués par la contraction du réseau d'actine [BRA 06]. De plus, les microtubules sont impliqués indirectement dans la régulation de la contractilité cellulaire. En effet, la dépolymérisation des microtubules conduit à la formation de fibres de tension [LIU 98].

1.2.3. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont composés de protéines d'une famille comptant plus de 50 membres qui s'assemblent, individuellement ou par groupes de deux ou trois, pour former des filaments d'environ 10 nanomètres de diamètre. Selon le type cellulaire, ces filaments se déclinent en 6 groupes de protéines comme la kératine, la vimentine, la lamine ou encore la nestine. Une des fonctions principales des filaments intermédiaires est de fournir aux cellules et aux tissus leur résistance mécanique mais leur rôle n'est pas encore connu précisément [BEI 03] [KER 07]. On trouve souvent un réseau de kératine entourant le noyau et s'étendant jusqu'à la membrane plasmique. Leur module d'Young est variable suivant la contrainte imposée mais peut être évalué à quelque dizaines de MégaPascals ce qui est très

inférieur à ceux des autres constituants du cytosquelette [FUD 03]. Cela leur confère une flexibilité importante contribuant à la souplesse et la déformabilité de la cellule.

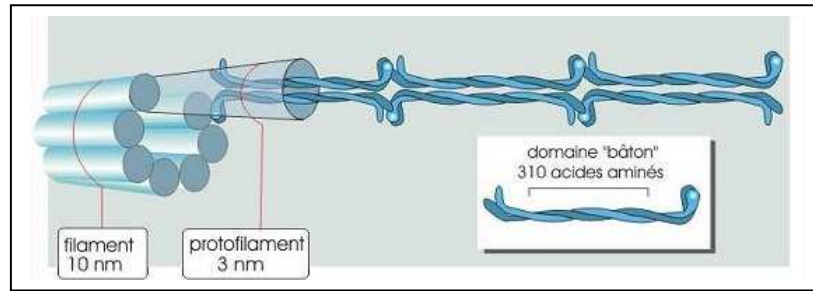


Fig. 1.10 : Schéma de la structure d'un filaments intermédiaire. [D'après : http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.104.b3/content/access.htm]

1.3. La mécanique cellulaire

Une compréhension globale de la structure et de la mécanique cellulaire est essentielle pour expliquer des aspects fondamentaux du comportement cellulaire (de la motilité à la différenciation en passant par la prolifération). Différentes techniques expérimentales ont montré qu'une cellule avait des caractéristiques élastiques et visqueuses, tantôt considérée comme un fluide (en particulier pour les cellules en suspension testées par micropipette), tantôt comme un solide lorsqu'elle adhère à une matrice extracellulaire. Contrairement à la plupart des matériaux conventionnels, les cellules ont un comportement mécanique fortement non linéaire ; leurs modules élastiques dépendent de l'intensité de la force appliquée. Une étude récente sur des fibroblastes déformés par un système de microplaque a été la première à montrer ce comportement (figure 1. 11) [FER 06]. Cette technique est détaillée plus loin. Sous de petites déformations, l'effort est proportionnel à la contrainte, la réponse mécanique du matériau est dans le régime linéaire. Sous de plus grandes déformations, l'effort augmente plus rapidement avec la contrainte appliquée. Ici le matériau est dans le régime non linéaire. La stabilité et l'intégrité mécaniques des cellules biologiques sont fournies par le cytosquelette. Des modèles théoriques [MAC 95] ainsi que des expériences d'assemblage de gels d'actine *in vitro* [THA 07] [GAR 04a] [GR 06a] [GAR 06b], visant à comprendre les propriétés mécaniques de tels gels sont en plein développement. Une revue publiée en 2006 résume l'état actuel des connaissances et la façon dont ces systèmes modèles peuvent aider à mieux comprendre le rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques des cellules [BAU 06].

Une autre approche consiste à étudier les propriétés mécaniques de la cellule elle-même. Dans la littérature, une forte diversité de résultats expérimentaux est observable. Elle peut être expliquée par les différentes méthodes utilisées, le taux de contrainte ou de déformation appliquée, ainsi que la taille de la sonde utilisée. Nous y reviendrons ultérieurement

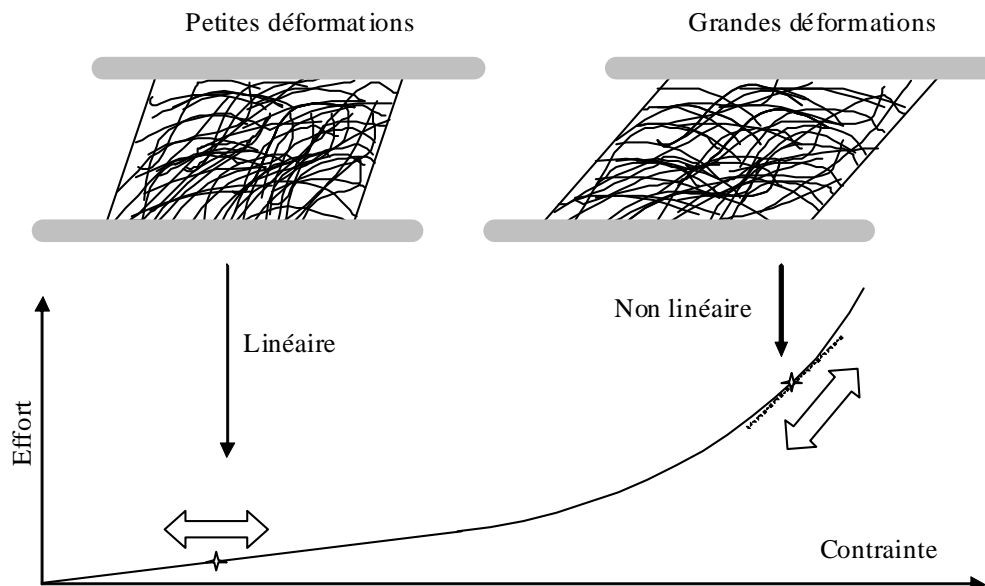


Fig 1.11 : Evolution de la contrainte appliquée à un matériau biologique en fonction de la déformation imposée. Observation du comportement linéaire du matériau pour les petites déformations, et du comportement non linéaire du matériau pour les fortes déformations.

1.3.1. Réseaux cytosquelettiques reconstitués

La possibilité d'étudier leurs propriétés viscoélastiques par des approches technologiques traditionnelles aussi bien que par des méthodes optiques plus sophistiquées est le principal avantage des réseaux reconstitués. En mesurant la dépendance au temps de la réponse à une contrainte imposée, les propriétés élastiques et visqueuses peuvent être déterminées. De plus, la concentration en actine, en agents réticulants (*cross-linkers*) et en moteurs moléculaires peut être contrôlée de façon à isoler la contribution de chaque type de molécules à la viscoélasticité. Les réseaux d'actine-F sont les systèmes reconstitués les plus largement étudiés. Des mesures récentes sur ces réseaux d'actine-F démontrent le rôle de la longueur des filaments [LIU 06] et des mécanismes additionnels de relaxation spécifiques à ces filaments semi-flexibles [GAR 03]. Tandis que les études préliminaires élucidaient le

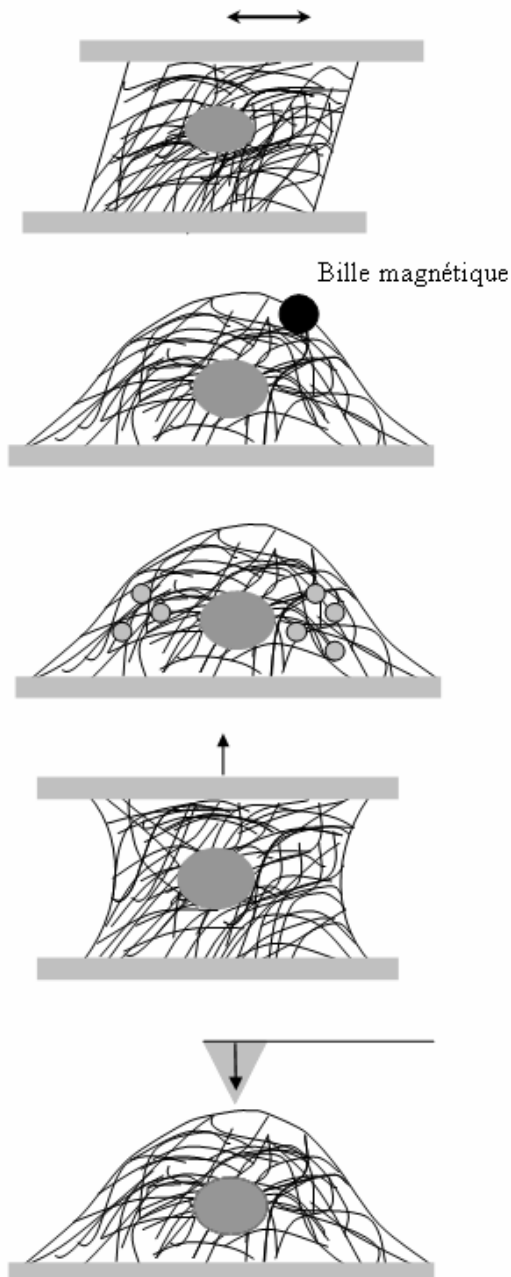
comportement des solutions d'actine-F seulement enchevêtrée, actuellement, les efforts se concentrent sur les effets de protéines réticulantes. L'élasticité des réseaux réticulés a des origines physiques diverses, et dépend de la concentration en actine et en agent de réticulation ainsi que de la nature de ce dernier [GAR 04a] [GAR 04b] [WAG 06]. L'étude rhéologique *in vitro* de réseaux d'actine réticulés par de la filamine par Gardel apporte une conclusion fondamentale : une augmentation de la rigidité avec l'application d'une précontrainte. Il en résulte des valeurs de rigidités comparables à celles observées sur des cellules. C'est la rigidification du réseau. Cela suggère que la précontrainte typiquement observée dans les cellules adhérentes joue un rôle important lors de la détermination de leurs propriétés mécaniques, et qu'en particulier l'élasticité cellulaire est toujours mesurée dans le régime non-linéaire [GAR 06a] [GAR 06b]. La modification de la rigidité des gels d'actine réticulés après application d'une précontrainte semble avoir le même effet que la présence de moteurs de type myosine. En raison de cette précontrainte, le cytosquelette peut activement réguler la contraction locale du réseau en utilisant ses moteurs protéiniques [STO 05]. Par exemple, des faibles contraintes exercées par la myosine dans un réseau composé de F-actine réticulée et de filaments intermédiaires ont pu augmenter réversiblement la rigidité d'un facteur 10, sans que le degré de polymérisation ou de réticulation ne soit changé [HUM 02]. La plupart des études expérimentales se sont jusqu'ici concentrées sur l'effet d'un seul type d'agent de réticulation alors que les cellules vivantes en présentent un grand nombre, qui peuvent interagir et/ou se concurrencer.

1.3.2. Outils pour l'étude de la mécanique cellulaire

La littérature concernant les propriétés mécaniques de la cellule est incroyablement riche. De multiples techniques expérimentales ont été utilisées pour sonder différentes parties de la cellule et apportent des réponses variées. L'hétérogénéité structurale de la cellule qui se traduit par la variation de ses propriétés mécaniques suivant la région étudiée rend essentielle l'utilisation de méthodes d'expertises locales. La figure 1.12 reporte le principe des méthodes d'étude de la mécanique cellulaire utilisées traditionnellement. Chaque méthode inspecte un aspect différent de la mécanique cellulaire ; leur mise en commun commence à fournir une compréhension plus globale.

La diversité de ces techniques expérimentales rend difficile leur classement. Il est possible de solliciter une cellule unique ou une population cellulaire. Si une cellule unique est

étudiée, la sollicitation peut être soit externe (locale ou globale), soit interne (directement dans le volume cellulaire).



Macrorhéologie par microplaques

Une cellule est contrainte entre 2 plaques en utilisant un cisaillement oscillatoire dans le but d'obtenir son module élastique G' et visqueux G'' .

Magnétocytométrie

Un champ magnétique externe applique une contrainte à une bille magnétique. La position de la bille est suivie afin de déterminer la réponse.

Microrhéologie

Le mouvement de particules sondes est mesuré en utilisant un système vidéo ou un laser. L'interprétation du mouvement des particules permet l'évaluation du module viscoélastique.

Etirement cellulaire par microplaques

La cellule est attachée aux 2 surfaces. Une force est appliquée à l'une des surfaces et la distance entre plaque est mesurée.

Microscopie à force atomique

Un microlevier applique une contrainte à la cellule. La déflexion du microlevier est mesurée par réflexion laser.

Fig. 1.12 : Techniques permettant l'étude la viscoélasticité cellulaire. Liste non exhaustive

La **magnétocytométrie par rotation** (MCR) permet d'évaluer les propriétés mécaniques d'une population de cellules en culture. Le cytosquelette est sollicité mécaniquement par l'intermédiaire de microbilles ferromagnétiques, liées à des récepteurs transmembranaires (intégrines). On applique un couple sur les billes en leur imposant un champ magnétique H de faible intensité (\sim qq mT) perpendiculaire à la surface. En faisant

osciller le champ d'excitation, on obtient une réponse dynamique de la cellule qui conduit à une détermination des constantes viscoélastiques sur une gamme de fréquences allant de 10^{-2} Hz à 1 kHz. Bien que cette technique sonde localement la cellule, il reste quelques incertitudes dans la prise en compte de l'adhésion entre la cellule et la bille, ce qui rend difficile la détermination des modules élastique et visqueux réels.

La technique des **microplaques** de verre est utilisée pour sonder les propriétés mécaniques globales d'une cellule. La cellule est mise en contact adhésif entre deux plaques, une rigide et une beaucoup plus souple. Une des plaques est alors maintenue fixe pendant que l'autre est déplacée par l'intermédiaire d'un micromanipulateur piézoélectrique. Les forces appliquées par ce dispositif sont plus grandes que dans les expériences locales : de 1 à 10 nN environ, car il faut déformer l'ensemble de la cellule. Pour des temps courts, ce dispositif est particulièrement bien adapté à l'étude du fluage des cellules [DES 05]. Cette technique est complémentaire à la magnétocytométrie qui utilise une sollicitation alternative et de faible amplitude. En effet, les mesures ainsi obtenues donnent, pour la fonction de fluage des lois de puissance du temps entre 0,1 s et 100 s, avec un exposant du même ordre de grandeur que celui mesuré localement en régime sinusoïdal (0,2 environ).

Le principe des **pincés optiques** repose sur le piégeage de billes d'un matériau diélectrique dans un faisceau laser. Le piégeage provient des inhomogénéités spatiales de l'intensité lumineuse. Dans un faisceau lumineux, fortement focalisé, l'intensité est maximale au foyer. Il s'exerce alors sur la particule une force proportionnelle au gradient de l'intensité du champ électrique porté par l'onde lumineuse. Cette force, qui peut aller jusqu'à 100 pN, tend à ramener vers cette position tout objet qui voudrait s'en écarter, aussi bien dans la direction du faisceau, que dans son plan perpendiculaire. La position d'une bille est alors mesurée en microscopie optique à l'aide d'une caméra, la force est étalonnée en fonction de la position de la bille par rapport à la pince optique, et la déformation induite sur la cellule sondée est tirée du déplacement de la bille par rapport à la cellule. Ces billes peuvent être utilisées pour sonder les propriétés de surface des cellules à la manière des billes magnétiques mentionnées plus haut. On peut également les injecter dans la cellule pour sonder directement les propriétés rhéologiques du cytosol. Par application d'une force oscillante à différentes fréquences successives, on en déduit le module viscoélastique $G(f)$, dont les parties réelles (G') et imaginaires (G'') varient ensemble en loi de puissance de la fréquence avec un exposant proche de 0.2 [BAL 04] [ICA 07].

Les mesures de **microrhéologie** consistent à placer des microsondes au sein du cytosol des cellules. Le déplacement des microsondes est provoqué par les fluctuations thermiques du milieu, la microsonde effectuant un mouvement Brownien, on parle alors de **microrhéologie passive**. Des nanoparticules sont injectées dans la cellule et leurs trajectoires aléatoires sont suivies. Cette méthode utilisant des particules à l'intérieur de la cellule, les propriétés mécaniques sont estimées directement sans passer par un intermédiaire (la membrane), comme dans les techniques précédentes. Cependant, pour déterminer la constante élastique, le mouvement des particules est supposé provenir uniquement des fluctuations thermiques. Malheureusement, l'activité des moteurs moléculaires et des phénomènes dissipatifs contribue au mouvement [HOF 06]. Ne pas considérer ces effets peut produire des erreurs énormes. En effet, il a été montré que, pour une même organisation cytosquelettique, la mécanique cellulaire pouvait être totalement différente suivant les contraintes extérieures [LEE 06], ou lors de l'incorporation de plusieurs agents de réticulations (α -actinine et fascine) [TSE 05]. Enfin, la difficulté de placer une sonde, de façon non invasive, à l'intérieur d'une cellule vivante limite beaucoup ce genre d'étude.

L'intérêt des mesures par **microscopie à force atomique** (noté **AFM** pour faciliter la lecture) réside dans l'absence d'ancrage entre la pointe et la cellule. L'instrument consiste en une pointe très effilée située à l'extrémité d'un microlevier agissant comme un ressort dont la déflexion est directement proportionnelle à la force. La pointe est utilisée pour indenter localement la cellule. La gamme de forces applicables par cette technique va de la dizaine de pN à quelques centaines de nN. Pour la mesure des propriétés viscoélastiques des cellules en régime fréquentiel, les forces appliquées restent faibles (typiquement quelques centaines de pN) ; la pointe n'est alors que posée sur la cellule. On mesure la force appliquée à la cellule ainsi que la déformation de celle-ci, et leur rapport est proportionnel au module viscoélastique. Des mesures ont été réalisées sur plusieurs types cellulaires dont les propriétés internes ont été modifiées par différentes drogues : les évolutions de G' et G'' obéissent à des lois puissance de la fréquence qui semblent très robustes, avec une nette dépendance de l'exposant de la loi en fonction des propriétés contractiles du cytosquelette [TRE 05]. Outre les propriétés viscoélastiques, les nanoindentations AFM sont utilisées pour évaluer la rigidité de la cellule. C'est cette méthode que nous utiliserons tout au long de notre étude.

1.3.2.1. Etude de la rigidité cellulaire par indentation à l'aide d'une pointe AFM

Les mesures de forces par microscopie à force atomique peuvent être assimilées à de la nanoindentation. Le principe de fonctionnement, les détails de la technique d'indentation seront détaillés au chapitre II. Ici nous regroupons les résultats obtenus par différents auteurs. A partir des courbes d'indentation, le module d'élasticité est obtenu en utilisant la théorie de Hertz et de Sneddon [HER 82] [SNE 65]. De nombreux auteurs ont travaillé sur le lien entre l'adhésion cellulaire et la rigidité cellulaire. Bacabac a montré récemment que des cellules osseuses adhérentes avaient une rigidité beaucoup plus élevée (plusieurs dizaines de kilo pascals) que ces mêmes cellules non adhérentes (100 fois plus faible, environ 300 Pa) [BAC 08]. De nombreuses études ont porté sur la modulation de la rigidité cellulaire grâce à l'utilisation de drogues permettant, soit de désorganiser le cytosquelette d'actine, soit de le renforcer. La cytochalasine (B et D) ainsi que la latrunculine A sont les principales molécules utilisées pour la désorganisation du cytosquelette d'actine [COS 04] [COS 06] [ROT 00]. Ces drogues empêchent la polymérisation des fibres d'actine et par voie de conséquence induisent leur dépolymérisation. La disparition des fibres d'actine entraîne une diminution significative de la rigidité cellulaire [ROT 00] [TAK 05]. Sur des fibroblastes, Rotsch observe une diminution d'un facteur 2 à 3 de la rigidité cellulaire après traitement à la latrunculine A et à la cytochalsine B et D. Il observe aussi que cette diminution est d'autant plus importante que le temps de traitement est long. Des images de fluorescence complètent l'étude et montrent la disparition des fibres d'actine au cours du temps [ROT 00]. Dans la même étude, il est montré que l'éclatement des microtubules n'affecte pas la rigidité cellulaire. La rigidité cellulaire est donc bien dépendante du réseau des fibres d'actine.

De son côté Takai rapporte aussi une diminution de la rigidité d'ostéoblastes traités à la cytochalasine D [TAK 05]. Cette étude est particulièrement intéressante, car elle montre également que la rigidité cellulaire est dépendante du substrat sur lequel la cellule est déposée. Sur un tapis de fibronectine, des ostéoblastes ont une rigidité 2 fois plus élevée que sur plastique. Les cellules déposées sur fibronectine présentent un réseau de fibres de stress. La fibronectine étant un agent favorisant l'adhésion cellulaire, il est confirmé ici le lien étroit entre l'adhésion, la rigidité cellulaire et l'organisation du réseau d'actine. Simon avait aussi attesté du lien étroit entre le substrat et la rigidité cellulaire en montrant des rigidités comprises entre 0.3 et 30 kPa pour des cellules déposées sur du verre, et des rigidités comprises entre 4 et 200 kPa pour des cellule déposées sur une silice greffée au 3-

aminopropyltriéthoxysilane [SIM 03]. Domke étudie la rigidité d'ostéoblastes déposés sur différents métaux, du verre et du polystyrène (PS). Il estime respectivement à 9 kPa, 7.5 kPa et 5.5 kPa le module élastique des cellules déposées sur titane, PS et verre. Les cellules déposées sur TA6V, un alliage de titane et vanadium, présentent un module élastique proche de 2 kPa, soit 4 fois plus faible que celui de cellules déposées sur titane pur. Cette étude montre que la chimie du matériau influence grandement la rigidité des cellules.

Costa montre que la rigidité de cellules endothéliales peut être rangée en deux classes [COS 06]. L'une regrouperait les rigidités obtenues suite à l'indentation des fibres de stress, l'autre regrouperait les cas où les fibres de stress n'auraient pas été indentées. Les fibres de stress présenteraient une rigidité de l'ordre de 5kPa, alors que les autres indentations correspondraient à une rigidité d'environ 1.5kPa. La dépolymérisation des fibres d'actine via la cytochalasine B apporte alors un éclairage intéressant. Non seulement, la rigidité des fibres chute à 0.89 kPa, mais également celles des zones non-fibreuses. Ceci confirme que les fortes rigidités proviennent des fibres d'actine, et que les rigidités obtenues sur des zones non-fibreuses impliquent peu le réseau d'actine. Ceci a déjà été observé par Simon lors de son travail de thèse. Elle observe l'organisation du cytosquelette en effectuant des sections dans le plan (X,Y) sur différentes zones d'une cellule à partir des images obtenues avec deux forces externes différentes (figure 1.13) [SIM 02]. Les sections présentées sur la figure 1.13a et 1.13b proviennent respectivement de cellules déposées sur du verre et sur de la silice silanisée et biofonctionnalisée par des protéines du sérum de veau fœtal (SVF) adsorbées en surface, un revêtement favorisant l'adhésion cellulaire.

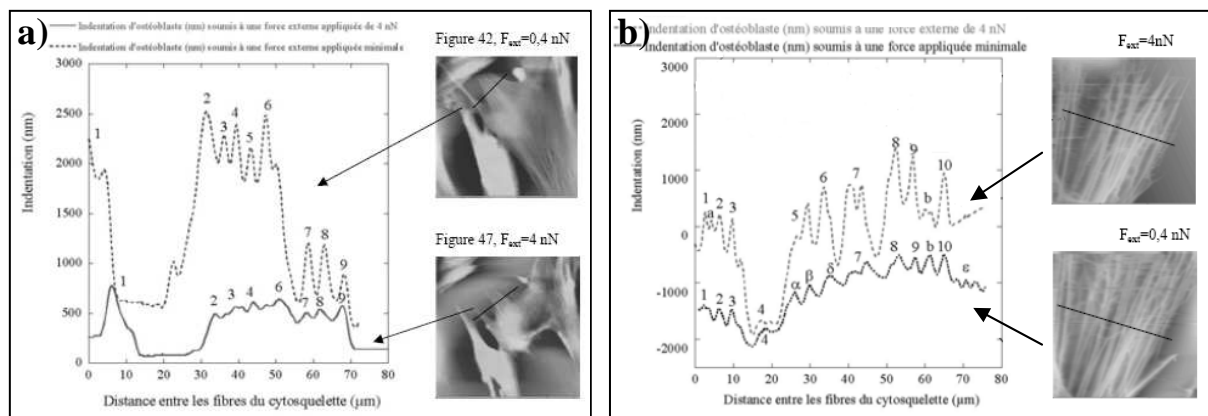


Fig. 1.13 : Indentations d'ostéoblastes déposés sur verre a) et sur une surface de silice silanisée et biofonctionnalisée par des protéines du SVF adsorbées sur cette surface b) [SIM 02].

L'auteur conclut que chaque pic observé peut être attribué à une fibre de stress, témoignant alors de la possibilité d'étudier spécifiquement la mécanique des fibres de stress. De plus, il

est observé que le nombre de fibres de stress est beaucoup plus important dans les cellules déposées sur la silice fonctionnalisée. Celle-ci favorisant l'adhésion cellulaire, nous avons là encore la confirmation du lien entre l'adhésion cellulaire et le développement du cytosquelette.

Cette non uniformité de la rigidité cellulaire avait déjà été observée par Mathur lors de l'évaluation du module élastique de différents types de cellules [MAT 01]. Il montre que les cellules endothéliales présentaient un module élastique compris entre 0.6 et 10kPa. Les résultats obtenus dans les études précédemment citées faisaient aussi mention de la forte non uniformité des rigidités. Domke et Takai montrent des écart-types supérieurs à 50% de la gamme des rigidités obtenues [DOM 00] [TAK 05].

1.3.2.2. Discussion à propos des méthodes d'étude de la mécanique cellulaire

Le type d'effort et/ou de déformation appliqué, la vitesse de chargement et/ou de déformation ainsi que la forme et la taille de la sonde sont des paramètres significatifs pour la détermination de la mécanique cellulaire. Malgré cela, les résultats issus de toutes ces techniques, confrontés aux différents modèles théoriques développés actuellement permettent de façonner une représentation cohérente de la mécanique cellulaire. Pour des temps de sollicitation inférieurs à la fraction de seconde, la réponse reflète la réaction des filaments individuels, l'élasticité est plus élevée que pour des temps plus longs [HOF 06]. Pour des temps de sollicitation supérieurs à 30 secondes, la réorganisation cellulaire mène à des relaxations qui constituent des réponses actives de la cellule. Pour des temps intermédiaires, l'application de forces extérieures peut impliquer des changements dans la composition des contacts focaux, la contractilité ou la rigidité cellulaire.

L'influence du type de contrainte sur l'évaluation des propriétés mécaniques de la cellule a été développée par Martial Balland dans son mémoire de thèse [BAL 04]. Tout d'abord il rappelle que l'utilisation de sondes n'ayant pas de liens spécifiques avec le cytosquelette (microplaques) semble aptes à étudier le comportement passif des cellules, alors que l'utilisation de techniques spécifiques (notamment la magnétocytométrie) conduirait à l'induction de réponses biologiques dirigées. Effectivement, il a été montré que si les forces étaient appliquées spécifiquement au cytosquelette, une redistribution spatiale des filaments cytosquelettiques et un étirement du noyau étaient observés [MAN 97] [ING 00]. Balland utilise aussi les observations faites par Maksym sur la dispersion des rigidités cellulaires

obtenues en fonction de la taille de la sonde pour expliquer les différences de résultats entre la magnétocytométrie et l'AFM [MAK 02]. En effet la surface de contact en magnétocytométrie est approximativement 1000 fois plus grande que dans le cas d'une indentation AFM. Cela implique des amplitudes de contraintes très différentes. De part le caractère non linéaire de la réponse cellulaire, il est alors clair que les mesures de rigidité faites par magnétocytométrie ($E \approx 10$ Pa) ne peuvent être que très différentes de celles réalisées par indentation AFM ($E \approx 10^3$ à 10^5 Pa). Il y a plus de 20 ans Valberg précisait déjà qu'une bille de petit diamètre par rapport aux grandeurs caractéristiques du maillage du réseau cytosquelettique pourrait révéler les propriétés mécaniques non seulement de la structure du cytosquelette mais aussi et surtout du fluide visqueux l'environnant [VAL 87]. Les essais faits par Costa sur la capacité à mesurer des rigidités spécifiques aux fibres de stress confirment cette hypothèse. Il découle de toutes ces observations que la comparaison des propriétés mécaniques cellulaires provenant de diverses techniques expérimentales n'est pas évidente.

1.3.3. Les modèles viscoélastiques cellulaires

Il y a cinquante ans, des chercheurs ont essayé d'appliquer les modèles de la rhéologie à la dynamique cellulaire (voir Annexe A1). La cellule était alors décrite comme un matériau viscoélastique simple dont certains constituants contribuaient à son caractère élastique (cortex d'actine) et d'autres lui conféraient son caractère visqueux (cytosol et le mouvement relatif des filaments d'actines entre eux). C'est ainsi que de nombreux auteurs ont utilisé les relations issues du formalisme des milieux viscoélastiques simples pour interpréter leurs mesures, puis en tirer des paramètres effectifs comme la viscosité dynamique, le module d'élasticité ou la constante de temps. L'utilisation du modèle de Maxwell (un ressort représentant la composante élastique en série avec un amortisseur représentant la composante visqueuse) ou du modèle de Voigt (association d'un ressort et d'un amortisseur en parallèle) pour un matériau viscoélastique était classique mais discutée. Effectivement, tous ces modèles sont unidimensionnels, ils suivent un formalisme discret et sont donc limités pour décrire le comportement mécanique des cellules. De plus, dans ces modèles aucune information quant à la structure et à la dynamique hautement complexe du réseau ne peut être intégrée. Actuellement d'autres représentations sont plus communément acceptées. Il s'agit des modèles structuraux, qui utilisent une description discrète des éléments mécaniques du réseau constituant la cellule. Par ailleurs, certains auteurs ont essayé d'appliquer le formalisme de la

mécanique des milieux continus à la cellule mais avec un succès modeste. La description détaillée des modèles présentés dans la suite de cette partie est regroupée en annexe.

1.3.3.1. Les modèles comportementaux

Ces modèles sont fondés sur les relations entre contrainte et déformation ainsi que leur dépendance en fonction du temps. Les modèles comportementaux ont grandement évolué depuis l'usage des premiers modèles viscoélastiques simples. La nécessité d'étudier la mécanique cellulaire en régime dynamique a poussé les chercheurs à adapter des formalismes plus complexes tels que les modèles de *structural damping* et de *matériaux vitreux mous*. Dans ces derniers, les modules élastiques et visqueux suivent une loi puissance de la pulsation d'excitation. Des mesures de magnétocytométrie effectuées sur des cellules adhérentes ont par ailleurs validé le modèle de *structural damping* [FAB 01] [HOF 06]. Comportement qui a également été observé pour des gels d'actines in vitro [MAH 04].

1.3.3.2. Les modèles structuraux

Dans la seconde partie du XXIème siècle, les techniques d'exploration microscopique se sont considérablement développées permettant des expériences de nanomanipulations comme celles de microscopie à force atomique ; une description du réseau constituant la cellule comme une structure discrète a pu alors être envisagée.

Trois types d'approches ont alors été faites :

- La cellule vue comme un gel de polymère et capable de subir des transformations de type *solgel*. Ces modèles montrent aussi une dépendance des propriétés viscoélastiques du cytosquelette en fonction de la fréquence de sollicitation
- Le réseau d'actine vu comme une mousse. Ces modèles semblent les plus appropriés pour prédire les rigidités des cellules testées par AFM [STA 99].
- La structure du cytosquelette représentée par un réseau de câbles réticulés sous contrainte (le modèle de *tenségrité* découlant de cette approche). Ce modèle est le seul à considérer le cytosquelette sous forme d'une structure tridimensionnelle issue de l'assemblage de plusieurs types de filaments.

Stamenovic montra récemment que les modèles *structuraux* sont adaptés pour de courtes sollicitations (donc à hautes fréquences), par contre ils ne le sont pas pour des sollicitations plus longues, plus proches des temps physiologiques [STA 07]. En effet, contrairement à la majorité des études, le fluage des cellules étudiées n'a pas été seulement réalisé sur des temps courts mais sur une gamme plus large allant de 0.02 à 120 sec. La courbe de fluage montre alors deux domaines en loi puissance séparés par un plateau (figure 1.14a). Elle est caractéristique des matériaux viscoélastiques. Aux temps courts (0.02 à 9 sec), Stamenovic retrouve bien un exposant de l'ordre de 0.2, classiquement mentionné dans la littérature, et déterminé théoriquement pour des modèles de *tenségrité* [CAN 03] ou de *mousse*. Le deuxième exposant, pour les temps longs (14 à 120 sec), est plus élevé et de l'ordre de 0.6. Ce type d'observations avait déjà été fait par Desprat lors d'essais de fluage réalisés pendant 2000 secondes sur des myoblastes (cellules musculaires) par la technique des microplaques [DES 05]. Malheureusement celui-ci s'était cantonné à l'étude du fluage pour des temps inférieurs à 100 secondes, là où il retrouvait une loi puissance d'exposant 0.2... (Figure 1. 14b et c). On le voit ici, le domaine où la courbe de fluage suit une loi puissance d'exposant 0.2 est beaucoup plus large pour des myoblastes (jusqu'à 100 secondes) que pour des cellules pulmonaires (jusqu'à 9 secondes). L'extension de ce domaine dépendra des conditions expérimentales utilisées.

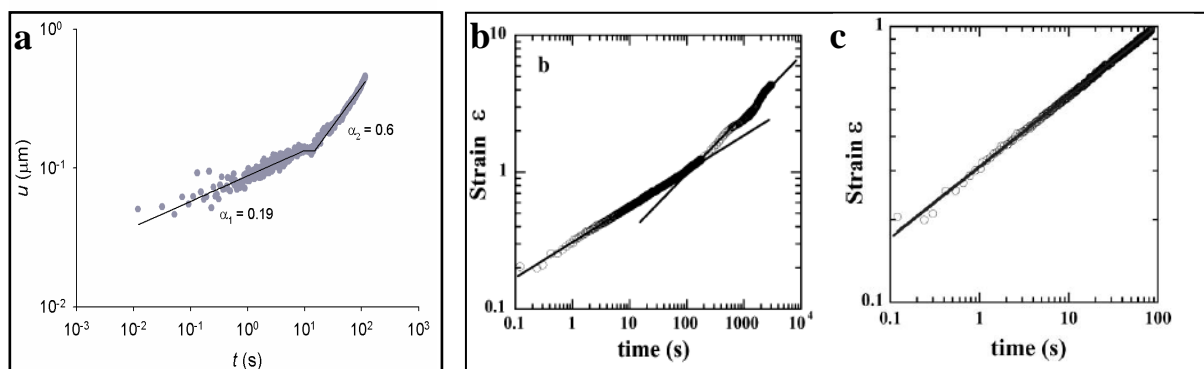


Fig. 1.14 : a) Fluage observé sur des cellules pulmonaires par Stamenovic. Evolution suivant 2 lois puissances séparées par un plateau. Les exposants sont respectivement $\alpha_1 = 0.19$ pour les temps courts et $\alpha_2 = 0.6$ pour les temps longs. b) Courbe de fluage globale réalisée par Desprat sur des myoblastes par le système de microplaques. Plusieurs domaines de dépendance en loi puissance sont observables. c) Partie de la courbe de fluage sur laquelle Desprat a focalisé son étude.

Les différentes hypothèses des modèles décrits ici montrent que l'unanimité sur une représentation n'est pas encore d'actualité. La dynamique du cytosquelette, et la prise en compte de l'ensemble des filaments constituant le cytosquelette restent des points à améliorer.

La non-linéarité de la mécanique cellulaire rend complexe sa modélisation. On observe que les modèles phénoménologiques sont souvent reliés aux techniques expérimentales utilisées. Par contre la tendance est au développement de modèles comportementaux permettant de regrouper des résultats obtenus par toutes les techniques. Le développement et la validation de ces modèles restent encore du domaine de la recherche.

Nous avons vu précédemment que les techniques d'investigation différaient par la façon d'appliquer la contrainte. La modélisation apporte des compléments. Il semble que la prévision du comportement mécanique cellulaire obtenu par des techniques utilisant des forces sous des petites déformations puisse être faite par le modèle de tenségrité, alors que le modèle alvéolaire serait plus en accord avec les résultats issus de techniques où de grandes déformations sont appliquées aux cellules [STA 96] [STA99] [COU 03]. On remarquera aussi que pour les techniques en accord avec le modèle de tenségrité, les efforts sont appliqués directement au cytosquelette (magnétocytométrie, pinces optiques). Au contraire, les techniques apportant des résultats cohérents avec le modèle de solide alvéolaire appliquent les efforts mécaniques sur la surface de la cellule sans lien avec le cytosquelette (indentation AFM, microplaques).

1.4. Adhésion ostéoblastique

D'une manière générale, l'adhésion est un processus fondamental directement impliqué dans divers événements comme la croissance, la migration, la différenciation et la survie de la cellule. On peut distinguer deux phases dans l'adhésion de cellule. L'attachement qui intervient à court terme, dans les heures qui suivent la mise en culture, et qui met en jeu des phénomènes physico-chimiques liés aux forces électriques, charges de surface, forces de Van der Waals... Puis vient la phase d'adhésion cellulaire proprement dite, qui constitue une relation à long terme, faisant intervenir des phénomènes biologiques conduisant à la fabrication d'une matrice extracellulaire liant les cellules à leur substrat.

De nombreuses protéines intra- et extracellulaires sont impliquées dans l'adhésion cellulaire :

- les protéines de la matrice extracellulaire : fibronectine, collagène, laminine, vitronectine...
- les protéines du cytosquelette : actine, paxilline, vinculine...
- les récepteurs membranaires : intégrines...

1.4.1. Les sites d'adhésion cellulaire

Lorsque la cellule entre en contact avec le support, il se forme localement des points de connexion qui les relient physiquement. Ces connexions sont constituées par des complexes transmembranaires qui relient la matrice extracellulaire (MEC) au cytosquelette [BUR 89]. Ces complexes sont composés de regroupements de protéines appelées intégrines. On nomme ces regroupements contact focaux (Figure 1.15). Servant d'attache intracellulaire aux fibres de stress, ces contacts focaux sont soumis à la tension développée dans ces fibres. On le comprend alors, les intégrines sont aussi les capteurs des tensions externes transmises par la MEC à la cellule. En réponse à des stimulations, elles modulent l'activation de nombreuses voies de signalisation dans la cellule. En fonction des voies activées les adhésions vont soit servir de support à la nucléation d'actine branchée et à la formation de protrusions membranaires, soit d'ancrage aux fibres de stress et donc servir de support au développement de la traction sur le substrat

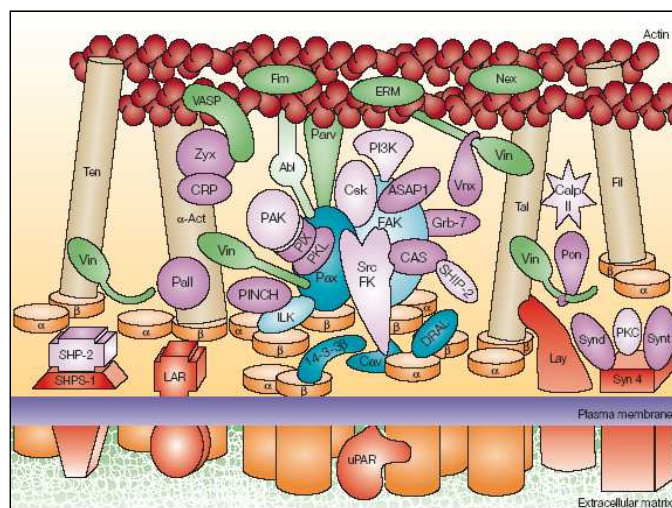


Fig. 1.15 : Représentation schématique des composants d'un contact focal. α et β désignent les intégrines qui sont des molécules transmembranaires, Vin la vinculine, PAK la paxilline, FAK les kinases des adhésions focales, les filaments rouges représentent les filaments d'actine [GEI 01]

Les contacts focaux agissent comme support pour l'activité des molécules de signalisation dans la transduction des signaux. Pour cela, outre les intégrines, les contacts focaux possèdent une composition moléculaire extrêmement riche et variée [ZAM 01]. Ils sont aussi constitués de protéines connectées entre elles, telles la taline, la paxilline, la tensine, le SRC, les protéines RHO, etc., toutes protéines du cytosquelette.

1.4.2. Les intégrines

Les intégrines forment une grande famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques [HYN 87]. Les intégrines sont composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β unies en un complexe non covalent. Il existe 17 sous-unités α et 9 sous-unités β ce qui permet une vingtaine de combinaisons avec pour chacune une spécificité différente (figure 1.16)[TOZ 96]. Les intégrines spécifiques de l'adhésion au collagène de type I et à la fibronectine ont fait l'objet de nombreuses études *in vivo* mais surtout *in vitro*. Des travaux effectués *in vitro* ont montré que l'expression des intégrines peut dépendre chez les cellules ostéoblastiques de la composition chimique du matériau utilisé comme support de culture [SIN 96], de la présence d'une matrice extracellulaire préformée à la surface du support (revêtement par protéines matricielles exogènes) et de sa composition [ELA 03].

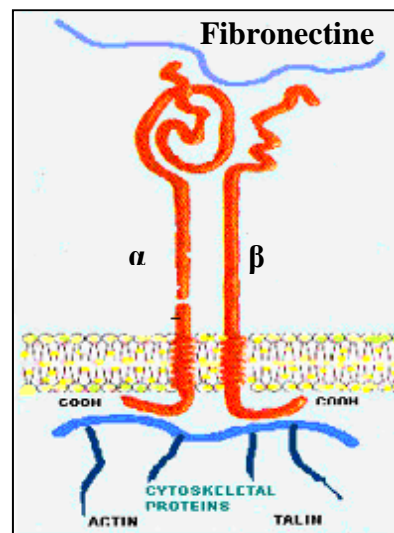


Fig. 1.16 : Représentation schématique d'un dimère d'intégrine avec ses deux sous unités α et β ainsi que ses liens avec la fibronectine et l'actine du cytosquelette. [Adapté de : <http://www.cardiab.com/content/figures/1475-2840-4-9-3.jpg>]

1.4.3. Impact de l'adhésion cellulaire sur le cytosquelette

La disposition générale des filaments d'actine participant à l'élaboration du réseau dépend de l'état d'adhérence cellulaire et de la mobilité des cellules considérées. Des études *in vitro* ont montré que des cellules qui adhèrent peu à leur support présentent une organisation des filaments d'actine désorganisée et diffuse. En revanche des cellules immobiles et très étalées ont un réseau hautement organisé, présentant des fibres de tension

qui peuvent être plus ou moins dirigées suivant le grand axe de la cellule [SAH 99]. Dans les lamellipodes (extensions membranaires) des cellules en mouvement, les filaments d'actine paraissent plus organisés qu'ailleurs.

Au début de l'adhésion, des cascades d'événements vont s'opérer dans la cellule et produire la contraction du cytosquelette [DeM 03]. La signalisation interne dépend aussi de la nature de l'engagement des adhésions avec la matrice extracellulaire. Sur de faibles quantités de fibronectine, il a été montré la formation de protrusions et la migration des cellules, alors que sur des quantités plus élevées c'est l'augmentation de la contractilité cellulaire et réduction de la motilité qui ont été observées [COX 01].

De plus, il a été démontré que l'organisation du cytosquelette était étroitement liée à celle de la matrice de fibronectine [ZHO 98] [BAN 02]. Comme nous l'avons vu, la partie intracellulaire des intégrines est associée, via un complexe protéique, aux filaments du cytosquelette. Les tensions exercées par les cellules sur la fibronectine pourraient résulter de son couplage avec le cytosquelette via les intégrines. L'arrêt de la réticulation des filaments d'actine est ainsi corrélée à une diminution de l'activation des intégrines de la famille $\beta 1$, récepteurs de la fibronectine [ZHO 98].

1.4.4. Influence de la chimie du substrat sur l'adhésion cellulaire

Sinhah ainsi que Shah ont étudié les mécanismes mis en jeu lors de l'adhésion ostéoblastique sur des disques d'alliages métalliques Co-Cr et TA6V [SIN 96] [SAH 99]. Ils montrent que les ostéoblastes humains issus de cultures primaires présentent de grandes différences d'adhérence, de morphologie et d'étalement selon l'alliage utilisé comme support de culture. Sur l'alliage TA6V, le nombre de cellules fixées après 12 heures de culture est plus important que sur l'alliage Co-Cr. Les ostéoblastes ont une forme plus aplatie sur TA6V que sur Co-Cr où les cellules sont plus allongées avec de nombreuses extensions cytoplasmiques. Des analyses par immunofluorescence ont mis en évidence des différences d'organisation du cytosquelette et de la plaque d'adhésion focale [SHA 99]. La formation de fibres de stress est beaucoup plus importante dans les ostéoblastes cultivés sur alliage de TA6V que sur alliage Co-Cr pour lequel la F-actine est faiblement polymérisée. L'immunomarquage de la vinculine révèle que les plaques d'adhésion focale sont réparties de manière homogène dans la cellule, au niveau de la surface en contact avec le TA6V, contrairement à l'alliage Co-Cr où les spots de vinculine sont moins nombreux et localisés uniquement au niveau du relief du matériau. Cette étude semble donc démontrer que sur

TA6V, les interactions cellule-matériau sont renforcées avec des ostéoblastes épousant le relief du support comparativement à l'alliage Co-Cr sur lequel les interactions sont limitées, avec des ostéoblastes fixés uniquement au niveau du relief du support.

Au cours des dernières années, de nouveaux concepts ont été développés afin de stimuler l'adhésion ostéoblastique sur les implants métalliques. Ainsi, le TA6V classique peut être modifié par greffage de peptides de synthèse contenant la séquence RGD ; on parle de fonctionnalisation du matériau. Ce greffage est effectué grâce à un procédé chimique complexe, dont le but est d'obtenir une fixation stable par formation de liaisons covalentes entre les peptides biomimétiques RGD linéaires ou cycliques et la surface du matériau. Ces séquences RGD greffées induisent une nette augmentation de l'attachement cellulaire allant d'un facteur 2 à 3 par rapport aux mesures effectuées sur le TA6V natif [VER 02]. Des expérimentations ont comparé les mécanismes d'adhésion ostéoblastique mis en jeu sur composés céramiques et sur le TA6V [OKA 98] [MAT 00] [KIP 01]. Ainsi, le rôle des récepteurs intégriniques spécifiques des protéines riches en séquences RGD semble encore renforcé sur céramiques bioactives. En effet, l'utilisation de peptides RGD greffés sur alliage TA6V et sur hydroxyapatite montre que les doses de peptide nécessaires à la fixation et à l'étalement de 50% des cellules ostéoblastiques, sont 5 fois plus faibles sur le composé phosphocalcique que sur l'alliage métallique [OKA 98]. Ces résultats sont en accord avec ceux de Matsuura ainsi que ceux de Kipaldi qui observent que les céramiques d'HAP, incubées en présence de sérum, adsorbent des quantités de fibronectine et de vitronectine nettement supérieures à celles observées sur le TA6V et acier inoxydable (316 L) [MAT 00] [KIP 01]. L'adhésion des ostéoblastes sur HAP semble dépendre essentiellement de l'adsorption de la fibronectine et de la vitronectine sérique, contrairement aux alliages métalliques sur lesquels l'adhésion est induite par une coopération entre les glycoprotéines sériques et d'autres protéines contenant les séquences RGD.

1.4.5. Influence de la rugosité du substrat sur l'adhésion cellulaire

La visualisation par microscopie électronique à balayage, de cultures cellulaires sur supports métalliques a permis de démontrer que la morphologie et l'étalement des cellules ostéoblastiques et ostéosarcomateuses dépendaient en partie de la rugosité et de l'organisation de la surface des biomatériaux donc de la nature du traitement de surface effectué (polissage, sablage, attaque acide) [ANS 00-a]. En général, les ostéoblastes ainsi que les lignées ostéoblastiques (MC3T3) et ostéosarcomateuses (MG-63), cultivées sur disques de titane ou

TA6V à surface lisse, forment une monocouche très homogène constituée de cellules plates et étalées dont la morphologie rappelle celle observée sur support plastique. Par contre sur surfaces rugueuses, ces mêmes cellules sont plus petites et présentent une forme cuboïdale avec émission de nombreux filopodes dirigés vers le relief du matériau ou vers d'autres cellules. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que les ostéoblastes cultivés sur surfaces rugueuses ont une morphologie correspondant à des cellules beaucoup plus différenciées que sur polystyrène et surfaces lisses [BOY 95].

L'attachement ostéoblastique sur implants métalliques dépend lui aussi de l'état de surface du matériau. En effet, les données bibliographiques sont concordantes et montrent que l'attachement ostéoblastique est supérieur lors des premières heures de culture sur matériaux traités par polissage (surfaces régulières avec Ra compris entre 0,3 et 1 μm) ou sur supports traités par sablage, attaque acide ou projection titane (surfaces chaotiques avec Ra compris entre 2 et 6 μm) par rapport aux matériaux classiques de culture cellulaire tels que le polystyrène (surfaces lisses). Plusieurs auteurs ont proposé une modélisation mathématique démontrant qu'il existe une corrélation entre l'attachement ostéoblastique et l'état de surface des supports caractérisé par sa dimension fractale. Le calcul de cette dernière est effectué à partir des paramètres de rugosité classique Ra, Rt (profil macroscopique) et de la surface de contact entre la cellule et le support (profil microscopique) [DEL 01] [ANS 00-b] [LOH 00]. Les effets de la rugosité sur l'attachement cellulaire ont été confirmés de manière plus poussée par l'étude des interactions substrat-matrice extracellulaire-ostéoblaste [ANS 00-c]. Ainsi, sur surfaces polies, les protéines matricielles telle que la fibronectine et les filaments d'actine sont, comme les cellules ostéoblastiques, organisées de façon parallèle contrairement aux surfaces rugueuses où l'on observe que les fibres de stress sont plus épaisses et organisées le long du grand axe des cellules avec des protéines matricielles qui n'ont pas d'organisation particulière.

1.5. Les biomatériaux

La société européenne des biomatériaux définit un biomatériau comme « un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les système biologique » [SOC 86]. Ces matériaux doivent répondre à un grand nombre de critères pour pouvoir être intégrés et perdurer dans l'organisme vivant. Ils doivent être biotolérants, biocompatibles et biofonctionnels.

Il est possible de les classer en quatre catégories :

- Les matériaux d'origine naturelle
- Les métaux et alliages métalliques
- Les polymères et matières molles
- Les céramiques

Ce dernier type de matériaux nous intéresse particulièrement puisque notre travail a porté sur le comportement d'ostéoblastes déposés sur des hydroxyapatites substituées. Nous axerons notre description des biomatériaux sur la thématique du remplacement osseux.

1.5.1. Les matériaux d'origine naturelle

Le plus efficace des matériaux de reconstruction osseuse est l'autogreffe, celui du patient lui-même. Il contient tout les éléments du tissu osseux : cellules, protéines et minéraux. Malheureusement, les prélèvements sont quantitativement limités et la durée de la chirurgie se trouve accrue. L'alternative est alors l'allogreffe, des os provenant d'autres individus humains sont alors utilisés. Il peut être aussi pratiqué des hétérogreffes, greffe entre deux individus, un donneur et un receveur, qui appartiennent à deux espèces différentes comme par exemple une greffe d'origine bovine, ou l'utilisation du corail comme substitut osseux.

Malheureusement le rejet des greffes, la transmission de maladies via ce type d'implants (prions, sida...) ainsi que les problèmes d'éthiques que les allogreffes peuvent poser restent importants.

1.5.2. Les métaux et alliages métalliques

L'utilisation des métaux et alliages a été faite depuis longtemps pour des applications biomédicales. Ainsi, un implant dentaire en fer forgé fut découvert sur un jeune homme qui vivait à l'époque galloromaine. De nos jours, le développement des biomatériaux métalliques conduit à leur utilisation dans plusieurs domaines, principalement en orthopédie (clous, vis, plaques, articulations) ou en stomatologie (prothèses, implant dentaires).

Aujourd'hui il existe 3 grandes familles d'alliages employés comme implants ou prothèses :

- Les aciers inoxydables
- Les alliages à base cobalt
- Les alliages à base titane

Dans notre étude, nous avons utilisé l'alliage titane TA6V comme matériau de référence pour le remplacement osseux. Sa composition massique est Ti, Al (6%), V(4%), Nb (7%)

1.5.3. Les polymères et matière molle

Même si ce type de matériaux n'est pas utilisé directement pour le remplacement osseux, il est très présent au niveau des prothèses articulaires de hanches et du genou pour minimiser le frottement avec les constituants métalliques ou céramiques. Pour ces applications, il est principalement utilisé des polyéthylènes haute densité (UHMWPE). L'utilisation de ciment PMMA (PolyMethylMethAcrylate) est aussi très classique pour la fixation d'implants orthopédiques.

1.5.4. Les céramiques

Malgré leur fragilité, plus grande que celles des métaux et alliages, les céramiques ont un rôle prépondérant en chirurgie orthopédique grâce à leur biocompatibilité (inertie ou bioactivité) et de bonnes propriétés tribologiques. On retrouve trois grandes classes de biocéramiques : les céramiques bioinertes, bioactives et résorbables [BER 03].

1.5.4.1. Les céramiques bioinertes

Le champ d'applications principal de ces céramiques est le remplacement articulaire et les prothèses dentaires. Les deux céramiques les plus utilisées dans ce domaine sont l'alumine Al_2O_3 et la zircone ZrO_2 sous forme stabilisée [HEN 91]. Leur inertie par rapport aux tissus environnants leur confère une biocompatibilité évitant le rejet (pas de risque d'infection, de réaction immunitaire ou inflammatoire). Ces céramiques ne sont pas solubles dans le milieu

physiologique et par conséquent stables dans le temps. La liaison développée entre le substitut et le tissu osseux se fait par accroche mécanique via une fine capsule fibreuse située autour de l'implant.

1.5.4.2. Les céramiques bioactives

On appelle bioactives des céramiques dont la réactivité chimique de la surface entraîne la formation de tissus normaux à sa surface. La faible solubilité de ces matériaux permet de créer une liaison intime entre leur surface et le tissu environnant. Les principaux composés de cette catégorie sont les bioverres et l'hydroxyapatite [HEN 91] [BER 03]. L'un des problèmes majeurs des bioverres est leur mauvaise tenue mécanique qui empêche leur utilisation dans le cas de mise en charge importante. L'hydroxyapatite phosphocalcique ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) et ses domaines d'applications seront présentés en détails dans les paragraphes suivants.

1.5.4.3. Les céramiques biorésorbables

Pour cette famille, c'est la solubilité qui est recherchée. Actuellement, le phosphate tricalcique bêta ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\beta$, TCP $_{\beta}$) est la céramique biorésorbable la plus utilisée. Sa vitesse de résorbabilité élevée reste un problème encore mal maîtrisé. En effet, sa dégradation rapide implique une perte de propriétés mécaniques qui ne peut être compensée aussitôt par la repousse osseuse.

1.6. Les apatites phosphocalciques synthétiques à usage biologiques

Que ce soit dans le cas de céramiques bioactives ou biorésorbables, les biocéramiques à base de phosphate de calcium sont largement utilisées. Elles forment une famille de composés chimiques de structures et de compositions variables. Elles peuvent apparaître sous différentes formes : hydrates, hydroxydes ou anhydres. Elles sont habituellement décrites par leur rapport molaire Ca/P. Les principaux composés phosphocalciques utilisés comme substituts osseux sont présentés dans le tableau 1.2.

L'hydroxyapatite phosphocalcique stoechiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA), par sa structure cristallographique et sa composition chimique très proches de la phase inorganique du tissu osseux naturel, fait état de matériau de référence pour la substitution osseuse. Cependant, sa très faible résorbabilité rend ce matériau difficilement utilisable pour des

applications nécessitant une ostéointégration rapide [DOI 98] [BAR 00-A]. A contrario, le phosphate tricalcique bêta $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -TCP) totalement résorbable, ne peut être employé du fait de sa résorption totale et rapide dans le cas de lésions soumises à des contraintes mécaniques trop importantes [DUC 93].

Nom	Abréviation	Formule Chimique	Ca/P
Phosphate dibasique dihydrate	DCPD	$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Phosphate dibasique anhydre	DCPA	CaHPO_4	1,00
Pyrophosphate de calcium		$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00
Phosphate octocalcique	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Phosphate tricalcique α et β	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Hydroxyapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Phosphate tétracalcique monoxyde	TCPM	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00

Tabl. 1.2 : Les principaux phosphates de calcium [ELL 94]

Les matériaux composites particuliers biphasés HA / β -TCP (BCP) ont l'avantage de pouvoir associer la stabilité de l'HA et la biorésorbabilité du β -TCP [RAY 02-C]. L'hydroxyapatite synthétique partiellement substituée par des ions carbonate, tout en étant un matériau monophasé, allierait les mêmes avantages que les mélanges HA/TCP [DOI 98]. D'autre part, la substitution partielle des ions phosphate par des ions silicate améliorerait l'ostéointégration de ces matériaux et la présence de groupement SiO_4^{4-} en surface favoriserait leur fonctionnalisation [THI 05] [THI 07] [HUA 05].

1.6.1. L'hydroxyapatite stœchiométrique

L'hydroxyapatite stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) appartient à la famille cristallographique des apatites de formule générale $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$, composés isomorphes possédant la même structure hexagonale. Me représente généralement un cation divalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion ou un groupement ionique monovalent. Elle cristallise dans le système hexagonal selon le groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$ avec comme paramètres de maille $a = 9.432 \text{ \AA}$ et $c = 6.881 \text{ \AA}$ [KAY 64]. L'HA se caractérise par un rapport molaire Ca/P égal à 1.667 et une densité théorique de 3.156. La structure cristallographique de l'HA est mise en évidence sur la figure 1.17.

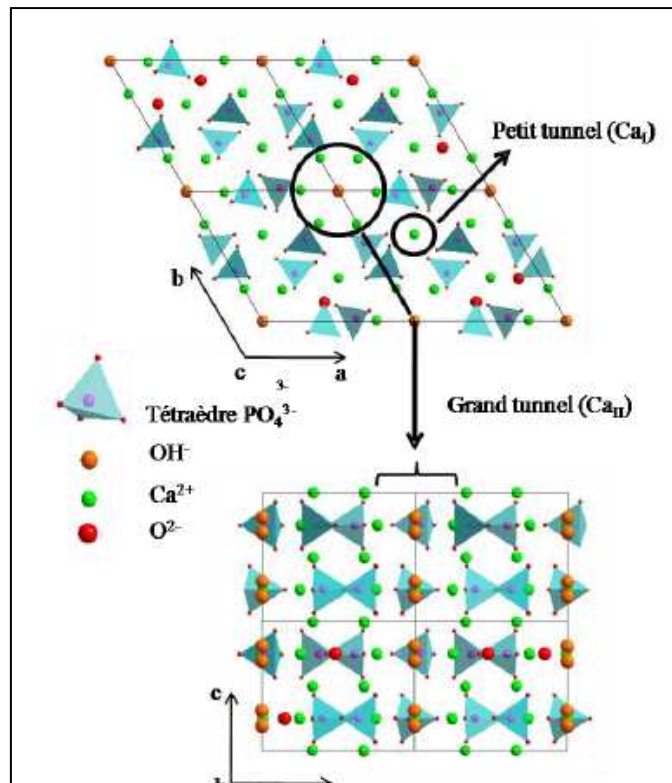


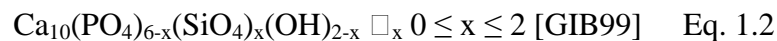
Fig. 1.17 : Projections de la structure de l'hydroxyapatite sur les plans (001) et (010).
[PAL 07]

Il existe deux types de tunnels perpendiculaires au plan (001). Les premiers sont centrés sur les axes ternaires de la structure et sont occupés par 4 ions Ca^{2+} (communément désignés par Ca_I). Leur diamètre est d'environ 2 Å. Ils apparaissent sur la projection de la structure par rapport au plan (010). Le second type de tunnel est centré sur les axes à symétrie hexagonale parallèles à l'axe c. Leur diamètre est compris entre 3 et 3.5 Å. Ils sont occupés par 2 ions OH^- (au centre) et par 6 ions Ca^{2+} (notés Ca_{II}). La projection de la structure sur le plan (001) met en évidence la symétrie hexagonale de ces tunnels. Les tunnels revêtent une importance particulière dans le comportement physico-chimique de l'apatite par leur aptitude à favoriser les échanges ioniques. En effet, les ions OH^- jouissent d'une grande mobilité et peuvent donc être facilement substitués soit par des ions monovalents (Cl^- ou F^-), soit par des ions bivalents comme CO_3^{2-} . Des substitutions sont également possibles sur les sites Ca^{2+} (Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} ...) ainsi que sur les sites PO_4^{3-} (SiO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} ...). Tout au long de cette étude, les sites hydroxyde (OH^-) et phosphate (PO_4^{3-}) de l'hydroxyapatite sont notés respectivement sites A et B. Afin de maintenir l'électroneutralité au sein de la maille, les

échanges ioniques mettant en jeu des espèces de valences différentes entraînent la création de lacunes sur les sites Ca^{2+} et/ou sur les sites OH^- . La capacité de la structure apatitique à accueillir un grand nombre d'ions différents dans chaque site de son réseau permet d'envisager des matériaux avec des compositions différentes, susceptibles d'influencer la réponse biologique du matériau.

1.6.2. Les hydroxapatites silicatées

L'étude de la substitution des ions phosphate (PO_4^{3-}) par des ions silicate (SiO_4^{4-}) dans l'hydroxyapatite (Si-HA) est récente. Peu de modèles décrivant cette substitution ont donc été établis jusqu'à présent. Le modèle retenu par la plupart des auteurs est :



Il prévoit que l'électroneutralité est conservée par la création d'une lacune d'ion hydroxyde, notée \square_x . D'après ce modèle, le nombre théorique de silicate pouvant être introduit dans la maille est de deux, correspondant à un taux massique de silicium de 5.82% (%_{massique} silicate = 19.1%). Le composé résultant d'une telle substitution est appelé silicocarnotite et sa formule chimique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$. Le taux de silicium pouvant être introduit dans la maille apatitique semble être limité, cependant une large gamme de teneur en silicium a été étudiée, de 0.1 à 5% en masse. Récemment, Palard a élaboré des céramiques denses d'apatites silicatées contenant jusqu'à 0.6 mole de silicates sans phase secondaire [PAL 07]. Pour des taux supérieurs (jusqu'à 1 mole), la densification de ces matériaux ne semble pas possible sans formation de seconde phase.

Du point de vue biologique, il apparaît que l'incorporation de silicium dans l'hydroxyapatite augmente la bioactivité des matériaux. Les premières études [GIB99-b] ont montré que les apatites silicatées n'étaient pas toxiques vis à vis des cellules ostéosarcomes humaines (HOC), et que l'activité de ces cellules était très similaire à l'activité de cellules cultivées sur l'HA pure. De plus, l'activité métabolique de ces cellules cultivées directement au contact des deux matériaux (HA et SiHA) est plus importante avec l'apatite silicatée qu'avec l'hydroxyapatite.

In vitro, entre un jour et une semaine de culture, Vallet-Regi montre que plus le taux de silicium incorporé dans l'apatite est important, plus la prolifération de cellules ostéosarcomeuses humaines est grande [VAL05]. L'incorporation de silicium stimule donc

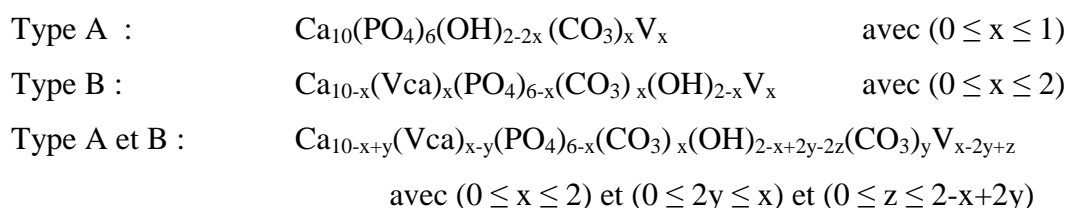
la prolifération cellulaire. Les études sur ostéoblastes humains se résument aux travaux récents de Thian et Huang [HUA05][THI05][THI07] consacrés à la culture de cellules sur des films minces d'hydroxyapatites silicatées. Thian évalue l'activité cellulaire par comparaison entre des dépôts traités thermiquement d'hydroxyapatite stoechiométrique (HA) et d'apatites silicatées contenant 0.8, 2.2 et 4.9% en masse de silicium ($x = 0.28, 0.78$ et 1.71 mol) [THI07]. Les résultats montrent l'augmentation de l'activité cellulaire sur SiHA par rapport aux cellules sur dépôts de HA. Cette augmentation d'activité est d'autant plus marquée que le taux de silicate est grand. Par contre, au-delà de 2,2% en masse de silicium ($x = 0.78$ mol), le nombre de cellules n'augmente plus et décroît même après plusieurs jours. Huang arrive aux mêmes conclusions concernant l'activité cellulaire de dépôts contenant légèrement moins de silicium (% massique $< 2\%$), mais non traités thermiquement [HUA05]. Cependant, la comparaison entre deux films de titane recouvert de SiHA contenant 0.8% en masse de silicium ($x = 0.28$ mol) montre que le traitement thermique améliore les résultats, notamment avec l'augmentation du nombre de cellules pour un temps de culture donné [THI05].

La morphologie des cellules subit aussi des changements en présence de silicium. A partir d'un jour de culture [HUA05] [THI07], le cytosquelette des cellules sur SiHA présente des fibres de stress alignées selon l'axe long des cellules. En comparaison, l'organisation sur HA est diffuse avec moins de microfilaments et de tailles plus petites. Après quelques jours de culture, les cellules se recouvrent dans de larges zones et y produisent de la matrice extracellulaire [HUA05]. La présence de silicium dans l'hydroxyapatite modifie ses propriétés de surface, conduisant à un effet stimulant sur le processus de biominéralisation.

Thian avance que l'amélioration de la bioactivité des substrats de titane par le recouvrement avec SiHA est la combinaison de plusieurs effets. Premièrement, la présence d'HA qui, grâce à ses propriétés ostéoconductrices, favorise l'attachement, la prolifération et la différenciation cellulaire et deuxièmement la présence de silicium dans l'HA qui semble être un facteur important pour la stimulation du métabolisme osseux. En effet, le silicium induit l'augmentation du taux de dissolution conduisant au relargage des ions calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture. Une nouvelle couche d'apatite carbonatée se forme rapidement et devient un site idéal pour l'accroche et la croissance cellulaire, donc pour la formation osseuse. De plus, le silicium relargué peut se lier avec l'oxygène pour former un réseau en surface capable de retenir des protéines. L'hypothèse étant que les protéines peuvent se greffer à ce réseau silicaté, améliorant l'attachement cellulaire par leur interaction avec les intégrines des ostéoblastes. Le processus de minéralisation en est donc amélioré lui aussi.

1.6.3. Les hydroxapatites carbonatées

Comme cela à été rapporté précédemment, la phase inorganique des tissus osseux s'apparente à une apatite phosphocalcique poly-substituée. [LEG 86]. La substitution par les ions carbonates peut être de type A, de type B ou de type A et B. Les matériaux ont alors les formules chimiques suivantes :



La variable x représente la quantité d'ions hydroxydes substitués par des ions carbonates. Lorsqu'un ion carbonate remplace un ion phosphate l'électroneutralité est conservée par la création d'une lacune de calcium V_{Ca} couplée à une lacune d'ion hydroxyde V_x [LAB 73] [ELL94]. Les apatites carbonatées de type A ou B cristallisent dans le système hexagonal. L'introduction d'ions carbonate au sein d'une apatite phosphocalcique conduit à un composé dont la structure et la composition chimique tendent vers celles de l'apatite biologique naturelle. L'incorporation de carbonate déstabilise la structure apatitique, augmente sa solubilité et conduit à un matériau plus résorbable [HAN 02]. Dans ce sens, les travaux de Doi, dont le but était d'apprécier la réponse in-vitro d'une apatite carbonatée de type B sodée vis à vis des ostéoclastes, se sont avérés encourageants. En effet, les résultats montrèrent que la Na-B-CO₃-Aps et l'apatite biologique naturelle sont toutes les deux résorbables par les ostéoclastes contrairement à l'HA [DOI 98]. *In vivo* les premiers résultats de l'étude menée par Landi montrent une bonne biocompatibilité et une bonne ostéointégration des implants d'hydroxyapatite carbonatée de type B, avec de meilleures propriétés ostéoconductrices et une biorésorption plus rapide comparée à l'hydroxyapatite stœchiométrique [LAN 03]. Malgré cela, peu d'études biologiques ont été réalisées sur des échantillons denses d'apatites carbonatées de type B.

Au cours des traitements thermiques utilisés pour la fabrication des pièces, l'instabilité de ces composés se traduit par une décomposition, et par l'apparition de phases secondaires notamment de chaux. Grâce aux travaux de Lafon il est possible aujourd'hui de produire des apatites carbonatées de type B denses avec un taux de carbonates maximal de 7.3 % [LAF

04]. Ce taux étant supérieur à celui de l'os humain, il autorise l'évaluation biologique d'apatites de compositions proches de celle de l'os.

1.7. Conclusion et objectifs de thèse

Au vue des travaux actuels, il apparaît que l'incorporation de silicium ou de carbonate dans l'hydroxyapatite augmente sa bioactivité. Les essais *in vivo* mettent en évidence un excellent comportement de ces matériaux. Malheureusement l'étude biologique de ces apatites est souvent réalisée sur des matériaux mal densifiés ou polyphasés. Dans ces conditions, il est difficile de statuer sur le rôle effectif du silicium ou du carbonate. Les travaux de Pallard et Lafon permettent de produire respectivement des apatites silicatées et carbonatées denses et monophasées. Sur ces bases, l'objectif principal de ce travail a été d'évaluer biologiquement ces matériaux afin de préciser le rôle du silicium et du carbonate.

La bioactivité est un terme générique qui recouvre des aspects variés. Nous nous sommes intéressés à la dynamique de la population cellulaire au contact de ces matériaux, ainsi qu'à la qualité de l'adhésion des cellules. Celle-ci a été approchée directement par marquage immunofluorescent (mise en évidence des contacts focaux) et indirectement, d'une part, par le marquage fluorescent des fibres d'actine et, d'autre part, par la valeur de la rigidité des cellules adhérentes. La mesure de la rigidité d'un ostéoblaste adhérent à une surface n'est pas chose aisée comme ce chapitre l'a montré. Nous avons choisi d'utiliser l'indentation AFM.

Au cours de cette indentation la cellule sollicitée peut réagir par l'intermédiaire de son cytosquelette. Ce qui nous a conduit à étudier le comportement viscoélastique des cellules adhérentes, et dans ce but à mettre au point une méthode originale utilisant le microscope à force atomique.

Chapitre 2 : Préparations et caractérisation des échantillons de biomatériaux et techniques expérimentales

Ce chapitre propose, dans une première partie, la description du procédé utilisé pour la préparation de pastilles d'hydroxyapatite stœchiométrique, carbonatée et silicatée. Les techniques de biologie cellulaire sont regroupées dans une seconde partie. Enfin, une troisième partie sera réservée à la description de la microscopie à force atomique, son principe et les applications que nous en ferons.

2.1. Préparation et caractérisation des biomatériaux

2.1.1. Montage et protocole de synthèse des poudres d'apatites

En utilisant les travaux de Raynaud et ceux de Lafon, nous avons produit des poudres d'hydroxyapatite stœchiométrique et des poudres d'hydroxyapatite carbonatée de type B avec plusieurs taux de carbonate [RAY 02a] [LAF 04]. La formule générale de ces composés est :



dans laquelle x représente la quantité d'ions phosphate substitués par des ions carbonates, V_x les x lacunes d'ions hydroxydes, $(\text{V}_{\text{Ca}})_x$ les x lacunes de calcium.

La production des pastilles d'hydroxyapatites silicatées n'a pas été réalisée par nos soins mais par le laboratoire des Sciences des Procédés Céramiques et de Traitement de Surfaces (SPCTS UMR 6638-CNRS). Ces matériaux ont comme formule chimique :



l'électroneutralité est à nouveau conservée par la création de x lacunes d'ion hydroxydes, notée V_x et x représente la quantité d'ions silicates substituant les ions phosphates. Nous ne présenterons pas ici le protocole détaillé de fabrication de ces poudres.

La précipitation en voie aqueuse est la voie de synthèse utilisée. Elle consiste à ajouter une solution phosphatée à une solution de calcium, à pH et température régulés. La solution de phosphate contiendra le cas échéant soit le précurseur de carbone, soit le précurseur silicium afin de produire respectivement des apatites carbonatées et silicatées.

Le schéma du montage que nous avons utilisé est présenté figure 2.1. Une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ est introduite au sein du réacteur puis chauffée et maintenue à la température choisie à l'aide d'un chauffe ballon relié à une sonde de température (Horst,

Allemagne). Afin d'éviter toute carbonatation des apatites par le gaz carbonique atmosphérique, un flux d'argon balaye le réacteur. Ce dernier est mis à reflux afin de limiter les pertes de liquide par évaporation. Pour l'apatite stoechiométrique le pH du milieu réactionnel est ajusté puis maintenu à sa valeur de consigne par une pompe doseuse régulatrice (BL 7916 Hanna Instruments) connectée à une électrode de pH. L'ajustement du pH se fait par ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium NH_4OH . Dès lors, la solution d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ et du précurseur de carbonate le cas échéant est ajoutée à débit régulé à celle de calcium à l'aide d'une pompe péristaltique (Minipuls 3 Gibson). Les solutions sont maintenues sous agitation mécanique (Heidolph, Allemagne) durant la synthèse. L'ajout terminé, le précipité formé est laissé à maturation, à température contrôlée sous agitation et flux d'argon. Lors de la maturation des précipités d'hydroxyapatite carbonatée le pH n'est pas contrôlé. A l'issue de la maturation, les précipités sont filtrés sous vide, lavés à l'eau distillée puis séchés dans une étuve à l'air pendant 24 heures à 80°C .

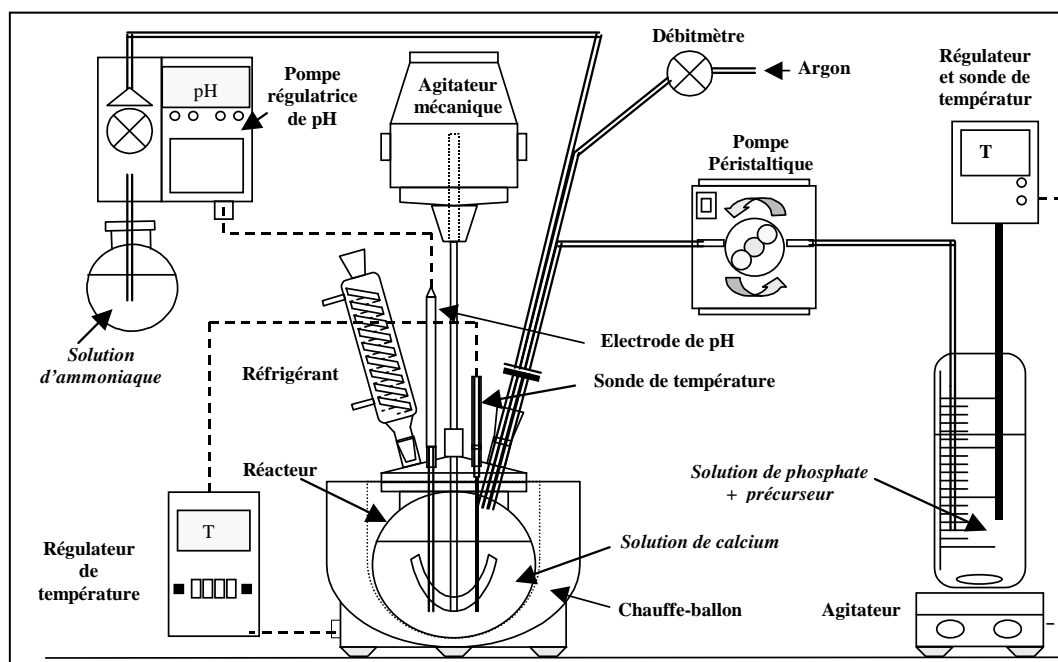


Fig. 2.1 : Schéma du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse

En nous référant aux travaux de Raynaud et Lafon, nous regroupons dans le tableau 2.1 les paramètres retenus pour les synthèses [RAY-02b] [LAF 04]. Le rapport molaire Ca/P en réactifs reste inchangé et égal à 10/6 quelle que soit la composition à synthétiser. La concentration de la solution de nitrate de calcium reste fixe et égale à $0.6413 \text{ mol.L}^{-1}$. Il est possible de faire varier le taux de carbonate des précipités en modifiant respectivement la

valeur du rapport molaire $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ en réactifs (noté $(\text{C/P})_{\text{réactif}}$ dans le reste de l'étude). Les synthèses sont réalisées à partir de valeurs de $(\text{C/P})_{\text{réactif}}$ qui varient de 0 (pour la synthèse de l'HA) à 1.

Paramètres \ Poudres	Hydroxyapatites stoechiométriques	Hydroxyapatites carbonatées
Solution de calcium	Nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Solution de phosphate	Hydrogénophosphate diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Hydrogénophosphate diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Type de précurseur chimique	 	$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$
Débit d'ajout de la solution PO_4^{3-} + précurseur	10 ml.min-1	10 ml.min-1
Temps de maturation	30 min	30 min
pH de réaction	pH = 8.1 ±0.1	pH = 9.0 ±0.1
T° de réaction	T = 95-99°C	T = 90°C

Tabl. 2.1: Paramètres de synthèse des poudres d'apatites stoechiométriques et carbonatées

On repérera les poudres d'hydroxyapatites carbonatées par la nomenclature C_yHA où y représente le $(\text{C/P})_{\text{réactif}}$ de la poudre. Dans notre étude, y est fixé à 0.125, 0.250, 0.5 et 1. Le tableau 2.2 regroupe l'ensemble des caractéristiques chimiques des poudres produites.

Compositions	$(\text{Ca/P})_{\text{réactifs}}$	n_c (mol)	$(\text{C/P})_{\text{réactif}}$
HA	1.67		
$\text{C}_{0.125}\text{HA}$	1.67	0.03	1/8
$\text{C}_{0.250}\text{HA}$	1.67	0.06	1/4
$\text{C}_{0.5}\text{HA}$	1.67	0.12	1/2
C_1HA	1.67	0.24	1

Tabl. 2.2 : Paramètres de synthèse des poudres d'apatites

2.1.2. Caractérisations des poudres d'apatites stoechiométriques et carbonatées

Après séchage, les poudres sont désagglomérées par broyage à sec dans un mortier en agate. Les différentes techniques utilisées renseignent sur les caractéristiques structurales, chimiques, morphologiques et physico-chimiques de chacune des compositions préparées. Afin de réduire les erreurs liées à la présence de quantités non négligeables d'eau adsorbée et de résidus de synthèse (en particulier les ions nitrate et ammonium), les poudres brutes

d'apatites carbonatées ont été calcinées 2 heures à 400°C sous air avant d'être analysées. Lafon a montré que le taux de carbonate au sein de l'apatite restait inchangé entre la poudre brute et la poudre calcinée, mais que ce traitement pouvait conduire à une augmentation de la cristallinité de la poudre [LAF 04].

2.1.2.1. Analyses structurales - Diffraction des rayons X

L'analyse des phases présentes dans les poudres (ou des pastilles après frittage) est faite par diffraction des rayons X (DRX). Les diffractogrammes sont enregistrés avec la radiation $\text{CuK}\alpha$ sur un diffractomètre $\theta/2\theta$ Siemens D5000. Les clichés DRX sont enregistrés dans l'intervalle 5 - 80° (en 2θ) avec un pas compris entre 0.01 et 0.04° et des temps de comptage compris entre 2 et 10 s en fonction des informations requises. Les phases sont identifiées par comparaison avec les références du fichier ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data - Powder Diffraction Files). Le tableau 2.3 regroupe les numéros des fiches PDF d'intérêt ainsi que les composés correspondants.

Nature du composé	N° Fiches PDF	Nature du composé	N° Fiches PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HA	9 – 432	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{SiO}_4)_2$	40 – 393
CaO	37 – 1497	$\text{Ca}_2(\text{SiO}_4)$	86 – 401
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP - α	9 – 348	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	25 – 1137
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP - β	9 – 169	CaSiO_3	43 – 1460

Tabl. 2.3 : Fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés

La superposition de la raie caractéristique principale de la chaux sous forme $\text{Ca}(\text{OH})_2$ correspondant au plan (200) à $2\theta = 34,08^\circ$ avec une raie de l'apatite (plan (202) à $2\theta = 34,05^\circ$ pour l'HA) rend difficile sa détection par analyse DRX. L'absence de chaux est alors vérifiée avec précision par immersion de l'échantillon dans une solution de phénolphtaléine comme le recommande la norme NF S 94-066 [AFN98]. S'il y a présence de chaux, du fait de sa basicité, la solution vire au rose immédiatement.

Les résultats montrent qu'aucune coloration des solutions aqueuses des poudres d'apatites avec la phénolphtaléine n'est observée, traduisant ainsi l'absence de chaux dans toutes les poudres. La figure 2.3A présente les diffractogrammes de chacune des 5

compositions synthétisées sur le domaine angulaire $10^\circ - 50^\circ$ avec un pas de 0.04° et un temps de pose de 10 s. Les poudres sont toutes monophasées avec une structure apatitique.

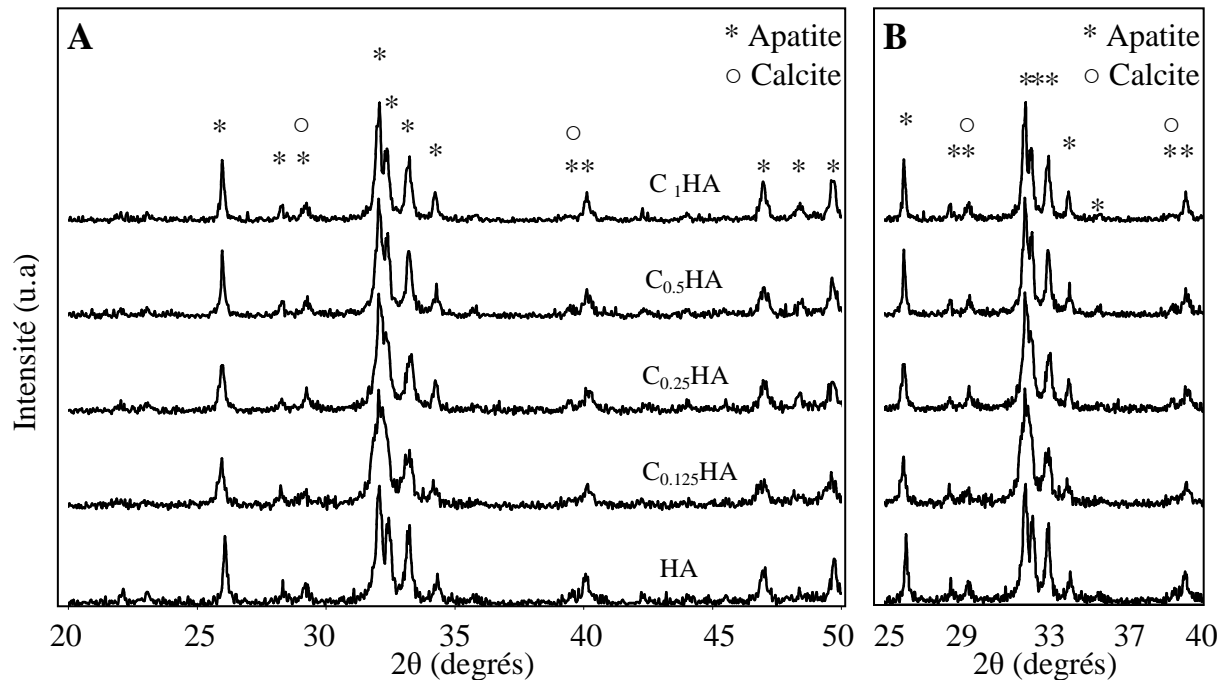


Fig. 2.3: Diffractogrammes complets (A) et diffractogrammes partiels (B) des poudres d'apatites carbonatées calcinées à 400°C pendant 2 heures et d'apatites stœchiométriques brutes.

2.1.2.2. Analyses spectroscopiques - Infrarouge

La caractérisation des poudres par spectroscopie infrarouge a été menée sur un appareillage Perkin Elmer Spectrum One (USA). Les spectres sont enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} . Les mesures sont réalisées en réflexion totale atténuée (ATR). Le principe consiste alors à mettre en contact un cristal (ZnSe,) avec la poudre à analyser. Le faisceau IR se propage dans le cristal ; si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon ($n > 2.42$), alors le faisceau subit des réflexions totales au-delà d'un certain angle d'incidence à l'interface échantillon/cristal à l'exception d'une onde, dite onde évanescente qui émerge du cristal et est absorbée par l'échantillon. C'est cette onde évanescente qui est responsable du spectre IR observé. Le tableau 2.4A présente les fréquences des bandes d'absorption caractéristiques des groupements CO_3^{2-} au sein d'apatites carbonatées synthétiques de différentes natures (A, B et A/B). Le tableau 2.4B présente les bandes d'absorption caractéristiques de plusieurs autres groupements atomiques susceptibles

d'être présents dans les poudres d'apatites carbonatées synthétiques (résidus de synthèse, HPO_4^{2-} , gaz carbonique adsorbé...).

Groupements ioniques	Bande d'absorption IR	
CO_3^{2-} type A	ν_2	880 ; 878
	ν_3	1545 ; 1540 ; 1500 ; 1450 ; 1465
	ν_4	609-565
CO_3^{2-} type B	ν_2	873
	ν_3	1465 ; 1412
	ν_4	710 ; 692
CO_3^{2-} type B (CO_3 ,)□	ν_2	871
	ν_3	1470 ; 1420
CO_3^{2-} type B (CO_3 , OH)	ν_2	871
	ν_3	1460 ; 1420
CO_3^{2-} labile	ν_2	866
CO_3^{2-} dans AB- CO_3 -Aps	ν_2	1452 ; 1470 ; 1500 ; 1545 ; 1568
	ν_1	950
CO_3^{2-} dans A- CO_3 -Aps	ν_3	1045 ; 1025
	ν_4	602 ; 572
	ν_1	957
CO_3^{2-} dans B- CO_3 -Aps	ν_3	1090 ; 1040
	ν_4	602 ; 562

Tabl. A : Bandes d'absorption caractéristiques des groupements CO_3^{2-} dans les apatites carbonatées (en cm^{-1})

Groupements ioniques	Bande d'absorption IR
H-O-H, H ₂ O adsorbée	3700-3000
O-H de $\text{Ca}(\text{OH})_2$	3569-3571
CO_2 moléculaire	2340
H ₂ O et CO_2 adsorbés	1630
N-O des groupements NO_3	1380-1400

Tabl. B : Autres bandes d'absorption susceptibles d'être détectées dans les poudres (en cm^{-1})

Tabl. 2.4: Bandes d'absorption susceptibles d'être détectées dans les hydroxyapatites carbonatées (Tabl. A et B) [LAF 04].

La figure 2.5 présente les spectres obtenus sur les différentes compositions carbonatées dans le domaine $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Les bandes dans les domaines $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ et $700 - 450 \text{ cm}^{-1}$ correspondent respectivement aux modes $\nu_3\text{PO}_4$ et $\nu_4\text{PO}_4$ des groupements phosphate de l'apatite. La bande à 960 cm^{-1} est assignée à $\nu_1\text{PO}_4$. Les modes $\nu_3\text{CO}_3$ et $\nu_2\text{CO}_3$ des groupements carbonates apatitiques apparaissent respectivement dans les domaines $1500 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ et $900 - 850 \text{ cm}^{-1}$ (figure 2.6A et B). La comparaison des intensités des bandes d'un spectre à l'autre, rendue possible grâce à la normalisation des spectres, montre l'augmentation du taux d'ions carbonates insérés dans la structure apatitique avec l'augmentation du rapport $(\text{C/P})_{\text{réactif}}$ (Figure 2.5 et figure 2.6A et B). Les bandes à 1416 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} (Fig. 2.6A) et à 873 cm^{-1} (Fig. 2.6B) reflètent clairement une carbonatation des apatites en site B. Ceci était attendu en raison du type de synthèse [LAF 04].

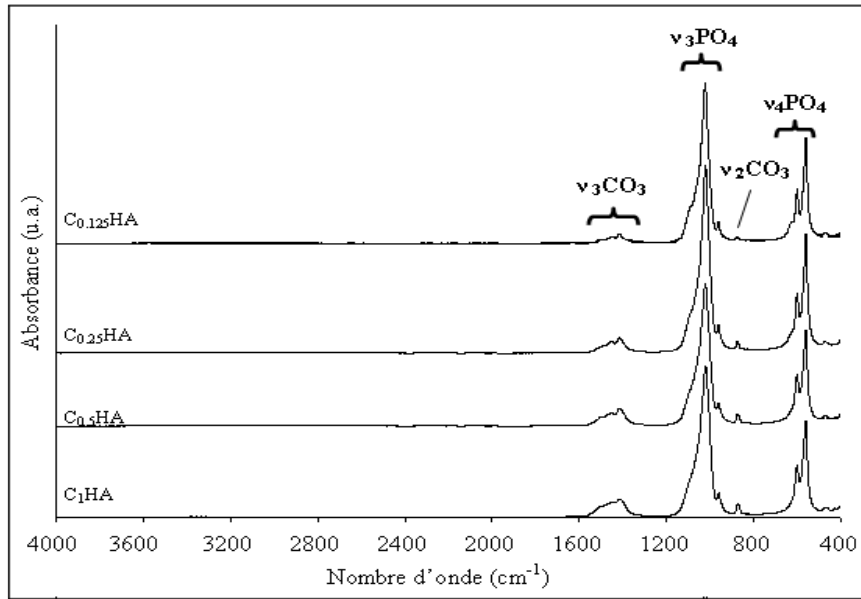


Fig. 2.5: Spectres infrarouges des poudres calcinées 2h à 400°C sous air d'apatites carbonatées de différentes compositions sur le domaine 400-4000 cm^{-1} .

L'épaulement à 1540 cm^{-1} associé aux bandes à 1456 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} (Fig. 2.6A) et 873 cm^{-1} (Fig.2.6B) confirme la faible carbonatation de type A.

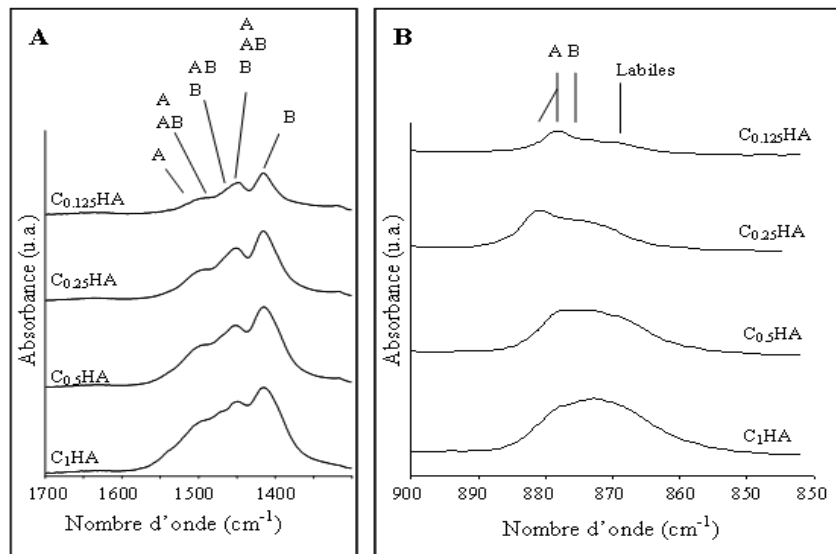


Fig. 2.6 : Spectres infrarouges des poudres calcinées 2h à 400°C sous air d'apatites carbonatées de différentes compositions sur le domaine 1700-133 cm^{-1} (A) et sur le domaine 100-400 cm^{-1} (B).

Ce type de carbonatation est d'autant plus fort que le taux de carbonate incorporé est faible. Phénomène déjà observé par Vignoles qui montra que les apatites faiblement carbonatées étaient susceptibles de contenir des ions carbonate en site A en très forte proportion [VIG 84].

Le domaine $\nu_2\text{CO}_3$ (Figure 2.6B) fait apparaître, sur certaines compositions, un épaulement à 868 cm^{-1} . Ce dernier est généralement attribué à la présence d'un troisième type d'ions carbonates dits labiles. Adsorbés en surface des précipités, ces ions doivent donc être considérés comme résidus de synthèse

2.1.2.3. Analyse chimique du carbone

Les pourcentages massiques de carbone contenu dans les échantillons sont déterminés par analyse élémentaire (CS-444, LECO, USA). Le principe de la mesure consiste à chauffer 0,5g de poudre à haute température par induction dans des creusets en alumine dans un flux constant d'oxygène. Le carbone contenu dans les échantillons est principalement transformé en dioxyde de carbone et monoxyde de carbone. Ces deux gaz sont ensuite dosés par spectroscopie Infrarouge. Des analyses sans poudre (ou blancs) et des mesures avec des étalons (3.76% de carbone) sont réalisées pour tracer une droite d'étalonnage qui permet de déterminer le pourcentage massique de carbone dans le domaine étudié. En supposant que dans les poudres, le carbone est sous forme d'ions carbonates, le taux de carbonates est déterminé par la relation :

$$\%_{\text{massique}} \text{CO}_3^{2-} = (\%_{\text{massique}} \text{C})_{\text{mesuré}} \times \frac{M_{\text{CO}_3^{2-}}}{M_{\text{C}}} \quad \text{Eq. 2.3}$$

On regroupe sur la figure 2.9 les pourcentages massiques de carbonates contenus dans les poudres pour les différents rapports C/P en réactifs. L'évolution de ces pourcentages en fonction du rapport C/P en réactif est comparée à celle obtenue par Lafon.

A

$(\text{C/P})_{\text{réactif}}$	$\%_{\text{massique}} \text{C}$	$\%_{\text{massique}} \text{CO}_3^{2-}$
0.125	$0.53 \pm 0,044$	$2.64 \pm 0,22$
0.125	$0.81 \pm 0,02$	$4.09 \pm 0,09$
0.5	$1.20 \pm 0,04$	$6.02 \pm 0,20$
1	$1.49 \pm 0,04$	$7.44 \pm 0,22$

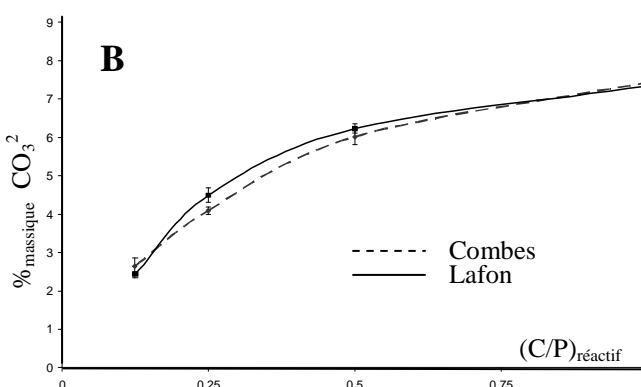


Fig. 2.9 : (A) Pourcentage massique de CO_3^{2-} dans les poudres carbonatées en fonction du rapport $(\text{C/P})_{\text{réactif}}$ et (B) évolution de ces pourcentages en comparaison de ceux obtenus par Lafon.

On retrouve une forte corrélation entre les deux évolutions. Les deux courbes représentées sur la figure 2.10 donnent l'évolution du pourcentage massique en ions carbonate en sites B et la variation de la masse molaire du composé décrit par le modèle (équation 2.1) en fonction de la valeur du paramètre sous stoechiométrique x . Lorsque x est égal à 0, le composé a la formule chimique et la masse molaire de l'HA.

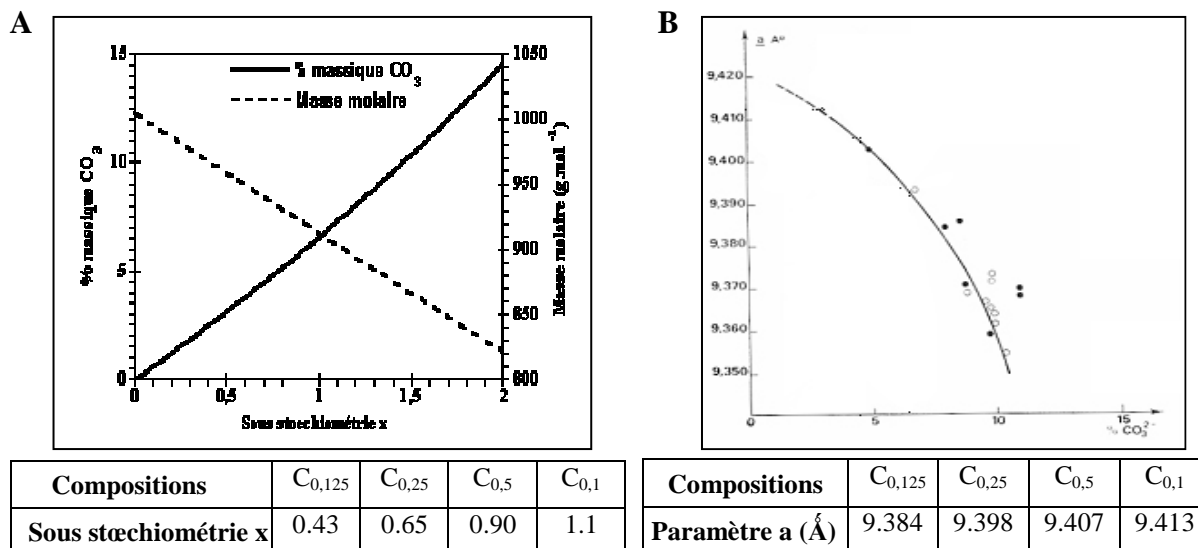
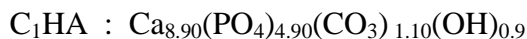
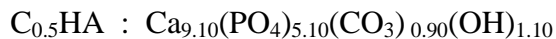
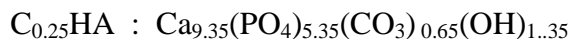
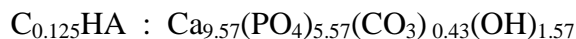


Fig. 2.10 : (A) Evolution du % massique en ions carbonates en sites B en fonction de la sous stoechiométrie x et (B) évolution du paramètre de maille a de l'hydroxyapatite carbonatée en fonction du taux de carbonatation [LAB 73]. Sont regroupées dans des tableaux les valeurs de x et a associées à nos composés.

Le taux de carbonatation de l'apatite est contrôlé de manière reproductible par la valeur du rapport $(C/P)_{\text{réactifs}}$ choisie lors de la synthèse. Une formule chimique satisfaisante de ces composés est $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ avec x variant de 0 à 1.1. Les formules des poudres produites sont alors les suivantes :



Sachant que le paramètre de maille c des hydroxyapatites carbonatées de type B reste constant et égal à celui de l'HA quel que soit le taux de carbonatation [VIG 84], il est possible de calculer la densité des composés préparés dans cette étude à partir du volume de maille et de la masse molaire du composé. L'hydroxyapatite cristallise en maille hexagonale compacte. Le volume de la maille est alors défini par $V = a^2 c \sin(2\pi/3)$ et la masse volumique de

composé par $M_{\text{comp}} = (10-x)M_{\text{Ca}} + (6-x)(M_{\text{P}}+4M_{\text{O}}) + xM_{\text{CO}_3} + (2-x)(M_{\text{H}}+M_{\text{O}})$ où x est le paramètre sous stœchiométrique et M_w la masse molaire de w .

Le tableau 2.5 regroupe les valeurs de ces différents paramètres.

	a (Å)	c (Å)	Volume de maille (Å³)	M_{comp} (g.mol⁻¹)	d_{théorique}
C _{0.125}	9.413	6.8840	528.83	965.4	3.03
C _{0.25}	9.407	6.8840	528.15	945.1	2.97
C _{0.5}	9.398	6.8840	527.15	922.1	2.91
C1	9.384	6.8840	525.57	903.7	2.86

Tabl. 2.5 : Paramètres de maille a, c, volume de la maille, masse molaire et densité théorique des apatites carbonatées.

2.1.2.4. Morphologie et caractéristiques physiques des poudres

a. Techniques de caractérisation

La surface spécifique des poudres est mesurée par la méthode B.E.T. (Brunauer – Emmett – Teller) 8 points à l'aide d'un appareillage Micromeritics ASAP 2000, USA. La caractérisation est alors effectuée après dégazage de l'échantillon d'environ 0.5g, sous vide, à 250°C pendant au moins 4 heures. Les valeurs des surfaces sont obtenues à partir de la mesure de l'isotherme d'adsorption d'un gaz à la température de l'azote liquide (77K). Le gaz utilisé pour les expérimentations est l'azote. La masse volumique des apatites carbonatées a été évaluée théoriquement via la mesure du pourcentage de carbonates insérés dans les poudres (§ 2.2.3).

Les valeurs des surfaces spécifique et le calcul des densités permettent de fournir une estimation du diamètre équivalent des particules (supposées sphériques) qui composent les poudres. Le calcul se fait selon la formule (équation 2.4) [RAY 99]:

$$\phi_{\text{moyen}} = \frac{6}{d \times S_{\text{BET}}} \quad \text{Eq. 2.4}$$

dans laquelle Φ_{moyen} représente le diamètre équivalent des particules exprimé en μm , d et S_{BET} représentent respectivement la densité et la surface spécifique des poudres (S_{BET} est exprimé en $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$).

La morphologie et la texture des poudres d'apatites carbonatées sont mises en évidence par microscopie électronique à balayage MEB (JEOL 6400, Japan). Les poudres sont déposées sur une pastille adhésive en carbone puis métallisées à l'or.

b. Résultats

Le tableau 2.7 regroupe les mesures de surface spécifique, de masse volumique et l'estimation du diamètre moyen des particules des poudres brutes d'hydroxyapatite stoechiométrique ainsi que celles des poudres d'apatites carbonatées calcinées. La surface spécifique des poudres carbonatées est comprise entre 39.5 à 42.3 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. On observe l'augmentation de cette surface avec l'augmentation du taux de carbonate. Les poudres d'hydroxyapatites présentent des surfaces spécifiques proches de 44 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. Elles sont donc supérieures à celles des poudres d'apatites carbonatées. Cela est explicable par le traitement thermique que les apatites carbonatées ont subi, et qui a pu conduire à la diminution de leurs surfaces spécifiques (grossissement des grains).

Compositions	S_{BET} [m²/g]	Masse volumique (g.cm⁻³)	Φ_{moyen} Grain (nm)
HA	43.7 ± 0,4	3.156	44
C_{0.125}	39.5 ± 0,4	3.03	50
C_{0.25}	39.4 ± 0,4	2.97	51
C_{0.5}	41.5 ± 0,4	2.91	50
C₁	42.3 ± 0,4	2.86	50

Tabl. 2.7 : Surfaces spécifiques, masses volumiques et estimation du diamètre moyen des particules des poudres d'apatites carbonatées (calcinées).

Les micrographies montrent que les poudres sont fortement agglomérées. La taille des agglomérats évolue entre 1 et 10 μm . Les grains des compositions carbonatées sont équiaxes (figure 2.11). Leur taille est comprise entre 50 nm et 100 nm, quelle que soit la composition considérée. Ces observations sont en accord avec les tailles moyennes calculées (Tableau 2.7).

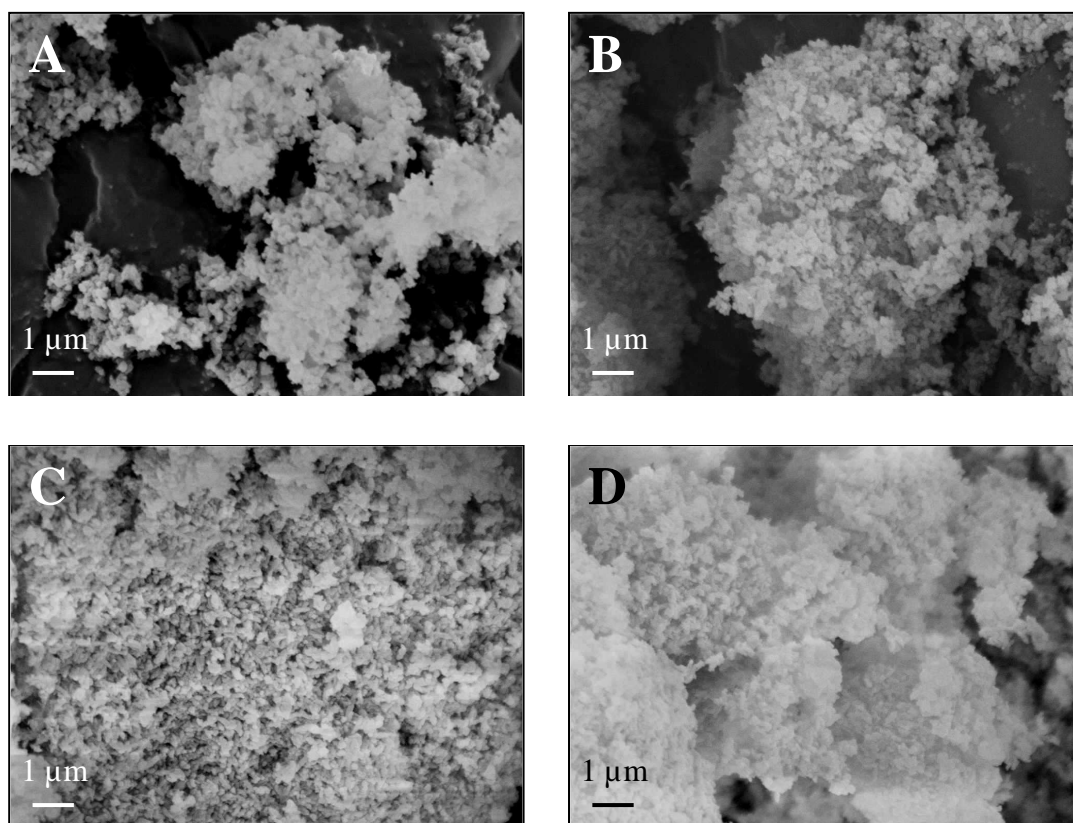


Fig. 2.11 : Micrographies MEB des poudres d'apatites carbonatées calcinées 2 heure à 400°C sous air. (A) $C_{0.125}$; (B) : $C_{0.25}$; (C) : $C_{0.5}$; (D) : C_1

2.1.2.5. Conclusion sur la synthèse des apatites stœchiométriques et carbonatées

Les poudres d'hydroxyapatite stœchiométriques produites sont monophasées, elles présentent une surface spécifique élevée ce qui nécessitera un traitement thermique pour faciliter leur compression avant frittage.

Quelle que soit leur composition, les poudres ont des morphologies similaires et des tailles de grains identiques. Le taux de carbonatation de l'apatite est contrôlé de manière reproductible par la valeur du rapport $(C/P)_{\text{réactifs}}$ choisie lors de la synthèse. Les ions carbonates introduits dans la structure se substituent préférentiellement aux ions phosphates (sites B). Une formule chimique satisfaisante de ces composés est $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x}$ avec x variant de 0 à 1.1, soit un taux de carbonatation maximum de 7.44 % massique. Cette dernière valeur est supérieure à celle rencontrée dans les tissus osseux qui est de l'ordre de 6 % massique au maximum.

2.1.3. Elaboration des pastilles d'apatites stœchiométriques et carbonatées par frittage

Le frittage constitue une étape obligée dans le procédé d'élaboration de pièces céramiques. Il consiste en un traitement thermique, appliqué à une préforme, qui doit aboutir à la densification du matériau. Pour cela la préforme est chauffée au dessous de sa température de fusion ou de décomposition afin de faire croître des liaisons entre les grains. Cela se traduit par une consolidation et souvent une diminution du volume de l'échantillon. Le taux de densification τ (densité relative) augmente avec le temps de frittage. En fin de frittage, l'augmentation de la densité est plus difficile, elle correspond à l'élimination de la porosité fermée ($\tau > 0,92$). C'est au dessus de ce taux de densification que l'on peut parler de matériaux « dense ». L'objectif était donc de produire des pastilles d'apatites monophasées présentant un taux de densification le plus élevé possible.

De même que pour la synthèse, nous nous sommes fondés sur les travaux de Raynaud et Lafon pour réaliser respectivement le frittage des apatites stœchiométriques et carbonatées. Le frittage des apatites silicatées a été réalisé dans le laboratoire SPCTS. Le diamètre des pastilles est fixé à 10 mm, en raison de l'utilisation ultérieure d'un microscope à force atomique (AFM) pour l'étude de l'adhésion cellulaire.

2.1.3.1. Elaboration des préformes

La production de pastilles cylindriques passe par la compaction uniaxiale de 500 mg de poudre calcinée. La compaction de poudres trop fines est difficile voire même impossible. La réduction de leur surface par calcination, c'est-à-dire le grossissement des grains doit être envisagé. La cinétique de frittage dépend de la surface développée par les grains. Une surface spécifique de l'ordre de $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ autorise un compromis entre un frittage correct et une compaction possible. Des travaux préliminaires montrent que l'hydroxyapatite stœchiométrique doit être traitée à 700°C pendant 1h pour obtenir cette surface spécifique. Les poudres d'apatites carbonatées ne seront pas sujettes à une calcination puisque ce type de traitement peut engendrer leur décomposition thermique. Elles garderont donc une surface spécifique comprise entre 39 et $42 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ suivant la composition (tableau 2.7).

Nous utilisons des préformes de 12.5 mm de diamètre afin d'obtenir, après frittage, des pastilles d'environ 10 mm de diamètre. En effet, le retrait après frittage a été évalué à environ 20 % [RAY02-c] [LAF 04] [PAL 07]. La pression est fixée à 125 MPa dans le cas des

apatites stœchiométriques. Pour les apatites carbonatées, nous avons observé qu'une surface spécifique élevée des poudres induit le délaminage des pastilles si la pression appliquée est trop importante. Un compromis doit donc être déterminé entre la pression maximale applicable et la résistance mécanique des pastilles. Elle a été fixée à 40 MPa. Afin d'améliorer le taux de compaction, les pastilles sont ensuite pressées isostatiquement à froid à 200 MPa (Presse isostatique Basset - Bretagne - Loire). Pour cela, les pastilles sont introduites dans une gaine de latex fermée hermétiquement, cette dernière est ensuite placée dans le compartiment de pressurisation (fluide : huile). Bien que le pressage isostatique à froid constitue une étape supplémentaire dans le procédé d'élaboration des préformes, l'augmentation du taux de densification obtenu présente plusieurs intérêts : le premier est de permettre une manipulation plus aisée des compacts, le second est d'accélérer la cinétique de densification du matériau.

2.1.3.2. Frittage des pastilles

Les hydroxyapatites stœchiométriques sont frittées sous air dans un four Super Kanthal à 1200°C pendant 30 min, avec des vitesses de montée et descente en température de 20°C.min⁻¹. La difficulté majeure liée au frittage des composés carbonatés tient au fait qu'ils se décomposent à des températures très basses. L'obtention de céramiques denses d'apatites carbonatées de type B monophasées est envisageable sous atmosphère de gaz carbonique [LAF 04]. Le frittage de ces pastilles s'est avéré difficile en raison d'une grande inhomogénéité thermique du four utilisé. Il s'agissait d'un four tubulaire dont la température de consigne n'était pas respectée dans l'ensemble de la chambre. Nous avons alors concentré notre étude sur 2 compositions : C_{0,25}HA et C₁HA. Celles-ci présentent l'avantage d'avoir respectivement un taux de carbonate proche de la phase minérale de l'os, et d'avoir un taux de carbonate suffisamment élevé pour espérer observer une réactivité différente des cellules osseuses.

Afin de déterminer les conditions de frittage adéquates une étude dilatométrique a été réalisée. Le frittage naturel des apatites carbonatées de type B et de l'HA sous CO₂ est suivi sur un dilatomètre vertical informatisé (SETARAM TMA92), par la mesure de la variation de longueur ΔL des échantillons en fonction de la température. Le four est maintenu sous balayage de CO₂ (débit des gaz = 10 L.h⁻¹) durant la totalité du cycle thermique. Les échantillons sont chauffés à 10°C.min⁻¹ jusqu'à 1250°C, température à laquelle un palier de 5 minutes est respecté, puis refroidis à 20°C.min⁻¹. L'étude du frittage de l'HA sous atmosphère

CO₂ est réalisé afin d'obtenir une courbe de référence. Par contre l'élaboration des pastilles de HA pures par frittage sera, comme dit précédemment, menée sous air.

La figure 2.13 présente les courbes de retrait obtenues ainsi que leurs dérivées (vitesses de retrait). Ces essais montrent un comportement différent des apatites carbonatées de l'apatite stœchiométrique. La température de début de retrait est d'autant plus faible que le taux de carbonate dans le composé est élevé. L'hydroxyapatite stœchiométrique commence son retrait aux environs de 920°C et atteint son maximum à 1125°C. Sous atmosphère ambiante, le frittage de ces apatites débute à 800°C ; l'atmosphère CO₂ retarde donc leurs frittage. Dans le cas des apatites carbonatées, on observe initialement une diminution du volume ($\Delta L < 0$). Le frittage commence aux environs de 800°C et 750°C pour C_{0,25}HA et C₁HA respectivement. Les courbes dérivées montrent un maximum des vitesses de retrait à 960°C pour C_{0,25}HA et à 870°C pour C₁HA (fig. 2.13B).

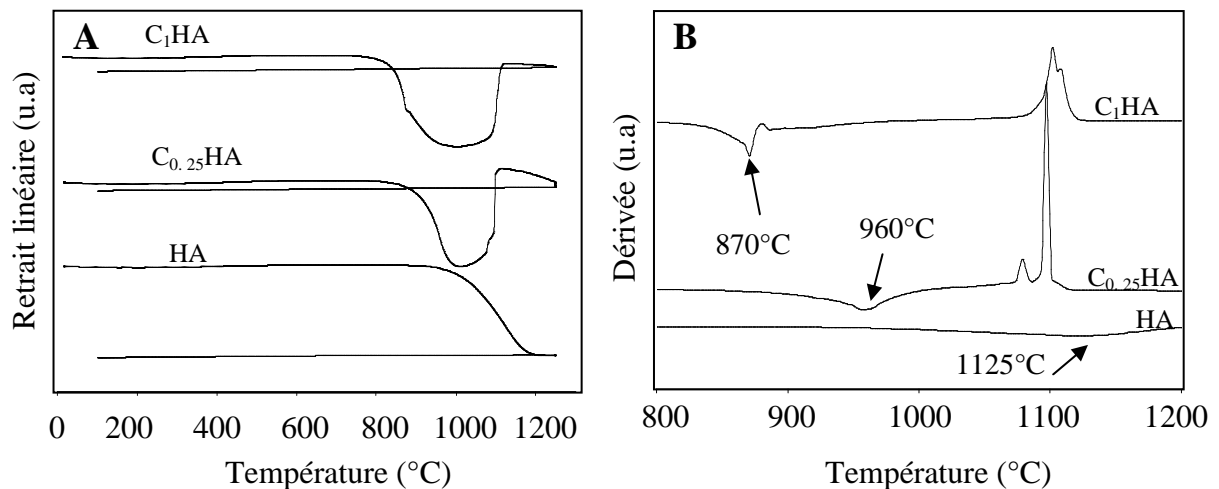


Fig. 2.13 : Courbes de retrait (A) et dérivées correspondantes (B) des compositions HA, C_{0,25}HA et C₁HA traitées sous gaz carbonique.

Après ces maxima, le volume augmente jusqu'à la fin de la montée en température. Cette augmentation de volume est associée à la décomposition des ions carbonates qui se traduit par l'évacuation du gaz CO₂ à l'extérieur de la pastille. La présence de bulles à la surface des pastilles confirme cette hypothèse. Ce phénomène avait déjà été observé par Lafon grâce à une analyse par spectrométrie de masse des gaz émis lors de la décomposition. A partir de ces courbes dilatométriques, nous avons fritté sous CO₂ les composés carbonatés aux températures associées aux maxima des vitesses de retrait. Nous avons testé des frittages allant de 30 à 120 min. Malheureusement, dans le cas des composés C₁HA, la densification des pastilles a toujours été accompagnée de la formation de bulles en surface, synonyme de

décomposition du matériau. Un traitement à 1050°C pendant 120 min des composés C_{0.25}HA a permis la production de pastilles denses et monophasées. L'utilisation d'une température supérieure à celle prédite par l'étude dilatométrique s'explique par la forte hétérogénéité thermique du four de frittage. Le positionnement des pastilles à l'intérieur de celui-ci ne peut être réalisé d'une façon tout à fait reproductible.

2.1.3.3. Caractérisations des pastilles frittées

Après frittage, les pastilles ont un diamètre proche de 10 mm et présentent une hauteur comprise entre 2 et 2.5 mm. Le rapport de la densité des pastilles (déterminées par méthode géométrique ou par la méthode d'Archimède) à celle calculée pour les apatites monophasées supposées denses (D_x - Tableau 2.9) donne leur taux densification :

$$\tau(\%) = \frac{d_{\text{pastille}}}{D_x} \times 100 \quad \text{Eq. 2.5}$$

Les taux de densifications des pastilles frittées sont regroupés dans le tableau suivant :

Compositions	HA	C _{0.25} HA
Taux de densification (%)	98	94-97

Tabl. 2.9 : Taux de densification après frittage en fonction de la composition des apatites.

L'analyse par DRX des échantillons frittés a montré que les matériaux sont monophasés (figure 2.14).

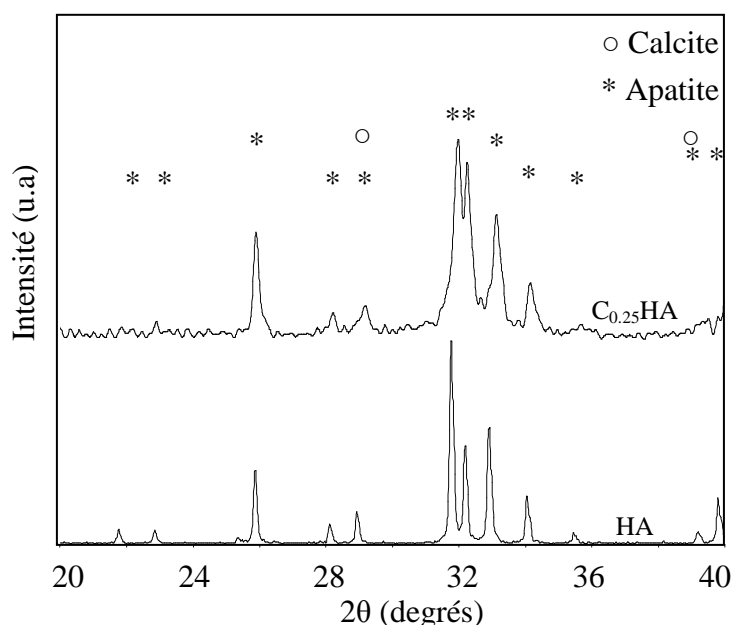
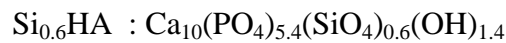
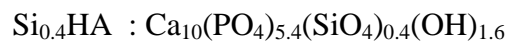
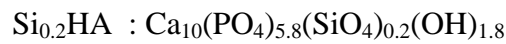


Fig. 2.14 : Diffractogrammes des pastilles d'apatites après frittage.

Les pastilles produites présentent toutes un taux de densification supérieur à 94%, synonyme de porosité fermée. La densité des pastilles d'apatites carbonatées, bien que toujours supérieure à 94 %, n'est pas parfaitement reproductible. En conséquence, seule une dizaine de pastilles de composition proche de $C_{0.25}HA$ a pu être produite.

2.1.4. Pastilles d'apatites silicatées

Les pastilles d'apatites silicatées produites au SPCTS étaient denses et monophasées. L'ensemble de leur procédé de fabrication est détaillé dans la thèse de Mickael Palard [PAL 07]. Les compositions utilisées seront notées Si_xHA où x est le nombre de moles de silicium. Dans notre étude, x a été fixé à 0.2, 0.4 et 0.6. Les pastilles d'apatites silicatées utilisées ont les formules chimiques suivantes :



2.1.5. Préparation de la surface des pastilles d'apatites et de TA6V

Les pastilles de TA6V ont été obtenues par découpe d'un barreau de diamètre 10 mm. Ces pastilles présentent initialement un diamètre de 10 mm pour une hauteur de 2.5 mm. Un polissage à la pâte diamantée (LamPlam - $\Phi = 1 \mu m$) est réalisé sur les pastilles afin d'homogénéiser la surface. La rugosité est déterminée par une utilisation particulière de la microscopie à force atomique. Dix mesures de rugosité sont effectuées sur 10 carrés de $40 \mu m$ de côté et la valeur moyenne est obtenue à partir de la relation :

$$R_a = \frac{1}{N_x N_y} \times \sum_{i=1}^N |z(ij) - z_{moyen}| \quad \text{Eq. 2.6}$$

Où N représente le nombre de mesures et z la hauteur des pics ou la profondeur des creux.

Les valeurs de rugosité sont comparables (tableau 2.10), et proche de 10 nm.

Compositions	TA6V	HA	$Si_{0.2}HA$	$Si_{0.4}HA$	$Si_{0.6}HA$	$C_{0.25}HA$
R_a (nm)	9.9	11.8	7.5	8.6	10.1	8.99

Tabl. 2.10 : Rugosité après polissage des pastilles d'apatite et de TA6V.

2.2. Technique de culture cellulaire

2.2.1. Culture de la lignée cellulaire MG 63

Les cellules utilisées appartiennent à la lignée cellulaire MG-63 qui dérive d'un ostéosarcome humain obtenu chez un garçon de 14 ans de type caucasien. Elles ne sont pas capables de minéraliser leur matrice en culture, donc ces cellules sont des "ostéoblastes-like" immatures. Ces cellules présentent l'avantage d'avoir un taux de prolifération élevé et un phénotype stable. C'est une lignée de référence pour les biomatériaux.

La lignée (Référence ATCC : CRL 1427) est maintenue dans des flacons de 75 cm² (T75 Falcon) en présence d'un milieu de culture dans une étuve à atmosphère contrôlée : 37°C, 95% d'humidité, 5% de CO₂. La base du milieu de culture utilisé est un milieu minimum essentiel (DMEM - SIGMA M4526). Il contient des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines, du glucose, un indicateur de pH (rouge de phénol). Ce milieu de base est complété avec 10% de sérum de veau foetal pur (Biological Industries 04-001-1), 1% d'antibiotiques à 50X (SIGMA P4458) et 1% de L-glutamine à 0,2 mol.L⁻¹ (SIGMA G7513) afin de devenir un milieu complet. Le sérum de veau foetal, composé entre autres d'hormones, de sels minéraux et de facteurs d'attachement, est nécessaire à la croissance des cellules. La glutamine est rajoutée extemporanément car il s'agit d'un acide aminé non stable. Le mélange d'antibiotiques permet de couvrir un large spectre bactérien. Le milieu est remplacé tous les trois jours.

A confluence, un repiquage est effectué. Les cellules sont détachées sous l'action de la trypsine-EDTA 1X (diluée à partir de trypsine-EDTA 10X dans du PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4, Sigma D-8537)). Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est rincé au PBS et la trypsine 1 X, est ajoutée (2 mL par flacon de 75 cm²). Celle-ci est préalablement chauffée à 37°C. Après détachement des cellules, la suspension cellulaire est récupérée et centrifugée pendant 10 min à 2500 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans le milieu complet puis réparti dans des flacons de culture de 75 cm². Le volume complété à 12 mL par flacon. Les cellules utilisées pour les expérimentations sont prélevées entre le 10^{ème} et le 20^{ème} passage. Le comptage cellulaire est réalisé avec un hématocytomètre de Malassez.

2.2.2. Cultures en puits

L'évaluation de la biocompatibilité des apatites silicatées se fait avec une densité d'ensemencement assez forte pour permettre une prolifération rapide. Les pastilles sont déposées au fond des puits de culture (24 puits par plaque $\Phi=16$ mm). Une suspension cellulaire à 8.10^4 cellules.mL⁻¹ est ajoutée dans les puits à raison de 1 mL par puit. Les 8.10^4 cellules ainsi introduites ne se déposeront pas toutes sur la pastille ($\Phi=10$ mm). En effet, une partie des cellules va se déposer sur le fond du puits, autour de la pastille. En chiffrant le rapport entre la surface du puit et la surface d'une pastille ($r = 2.56$), on estime que seulement 3.10^4 cellules sont déposées sur la pastille. La surface de la pastille étant légèrement inférieure à 0.8 cm², l'ensemencement est alors d'environ $3.5.10^4$ cellules.cm⁻² (fig. 2.15).

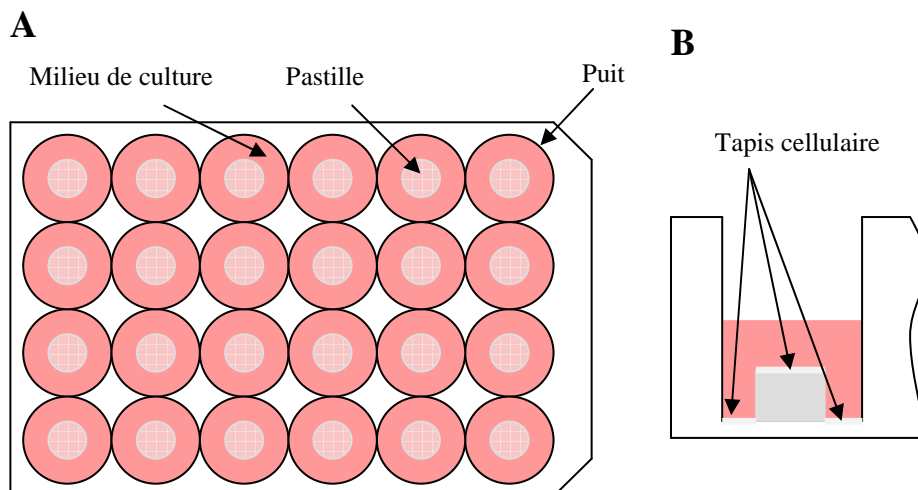


Fig. 2.15 : Représentation d'une boîte 24 puits (A) et d'un puits (B) contenant une pastille et 1 mL de suspension cellulaire. Le tapis cellulaire déposé sur la pastille et sur le fond du puits est défini par la couche blanche

L'étude de la mécanique des cellules adhérentes doit être faite sur des cellules isolées. En effet, notre problématique est centrée sur l'étude des interactions cellules-biomatériaux. Afin d'éviter les interactions cellule-cellule, une suspension cellulaire à 3.10^4 cellules.mL⁻¹ a été utilisée, permettant ainsi un encensement d'environ 10^4 cellules par pastille.

2.3. La microscopie à force atomique

2.3.1. Principes et fonctionnement

La microscopie à force atomique (AFM) fait partie de la famille des microscopes à champ proche (ou à sonde locale). La microscopie à force atomique repose sur l'interaction (forces de répulsion ionique, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces magnétiques,.....) entre une sonde de taille nanométrique et une surface (figure 2.16). Cette interaction dépend d'une part de la distance entre la sonde et la surface, et d'autre part de la nature physicochimique des deux protagonistes. La distance sonde-surface est ajustée par une céramique piézoélectrique dont la déformation est contrôlée avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre. Généralement, la sonde utilisée est une pointe pyramidale très fine ou une sphère, fixée à l'extrémité d'une lame-ressort ou microlevier de constante de raideur k_C . Lorsque la pointe est approchée d'une surface, des forces d'interactions provoquent la déflexion du microlevier. Cette déviation est enregistrée sur un système de détection optique grâce au déplacement d'un faisceau laser. Ce faisceau est focalisé à l'extrémité du levier sur sa face supérieure recouverte d'or, puis est réfléchi vers un système de détection optique constitué de photodiodes. Depuis son invention pour l'imagerie des surfaces à l'échelle nanométrique, l'AFM s'est imposé comme un instrument de mesure de forces.

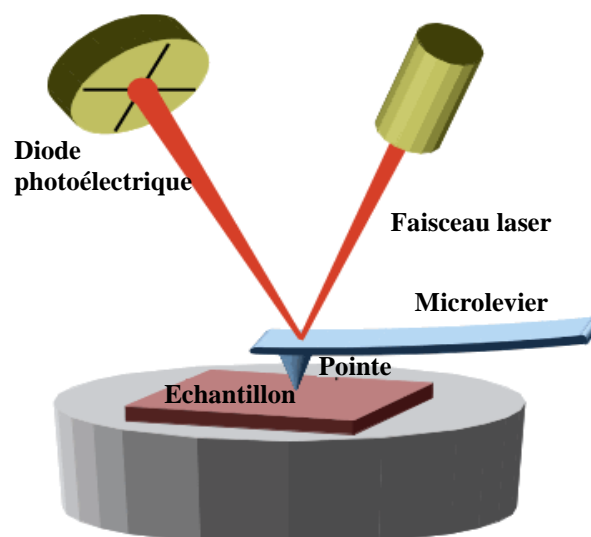


Fig. 2.16 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique «AFM». D'après [<http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm>]

2.3.1.1. Les différents modes d'utilisation de la microscopie à force atomique

On distingue trois modes de fonctionnement de l'AFM : le mode contact, le mode non contact et enfin le mode contact intermittent. Ces modes exploitent différents types d'interactions entre la pointe et la surface.

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe « appuie » sur la surface, elle est donc repoussée par des interactions à courte distance (forces répulsives), et le microlevier dévié. Une boucle rétroactive maintient la force d'interaction (déflexion du microlevier) constante.
- Le mode non contact exploite les forces attractives présentes entre la pointe et la surface à étudier. La pointe n'entre pas en contact avec la surface mais oscille à une fréquence supérieure à la fréquence de résonance du levier. L'amplitude des oscillations du levier est inférieure à 10 nm. C'est la fréquence d'oscillation du levier qui est maintenue constante, égale à une valeur de consigne. L'échantillon n'est pas endommagé par ce mode non-contact, mais, la vitesse de balayage est très lente et la résolution latérale est faible.
- Le mode résonant, ou « tapping », (le plus utilisé) consiste à faire osciller le microlevier à sa fréquence propre (souvent de l'ordre de 100 kHz), avec une certaine amplitude. La pointe interagit périodiquement avec la surface. Lorsque la pointe « touche » la surface, l'amplitude décroît parce que la fréquence de résonance change. La boucle d'asservissement s'exerce alors sur l'amplitude d'oscillation du microlevier. L'échantillon est moins endommagé dans ce mode, et il permet d'accéder à une plus haute résolution latérale. Cependant, l'observation d'un échantillon nécessite plus de temps que par le mode contact à cause d'une vitesse de balayage lente.

2.3.1.2. Description du matériel

L'appareil utilisé est un Nanoscope IIIA, de la société Digital Instruments (Veeco, Californie, Etats-Unis) associé à un dispositif Picoforce permettant la mesure de forces extrêmement faibles, de l'ordre du piconewton. Dans ce type de microscope la pointe est

fixe : c'est l'échantillon qui est mis en mouvement grâce au déplacement d'une céramique piézoélectrique sur laquelle il est déposé. Dans notre cas, c'est donc la cellule qui va en direction de la pointe.

Les pointes utilisées lors des expérimentations AFM sont les pointes MSCT[®], fournies par la société VeecoProbes[®]. Les microleviers sont en nitrure de silicium et leur très faible constante de raideur (0.01N.m^{-1}) autorise des mesures de forces particulièrement précises. Les pointes sont pyramidales, possèdent un demi-angle d'ouverture de 35° , présentent un rayon de courbure de 10 nm et ont une hauteur comprise entre 2.5 et $3.5\ \mu\text{m}$ (figure 2.17).

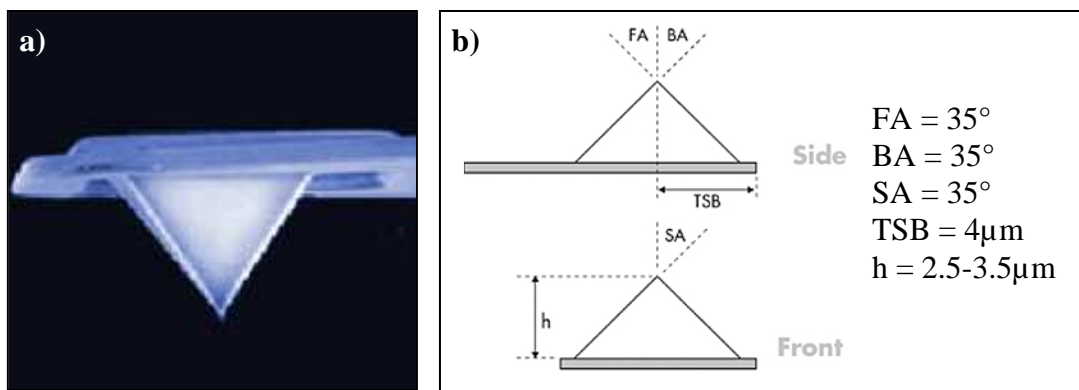


Fig. 2.17 : a) Pointe utilisée lors des expérimentations AFM et b) ses données géométriques. [D'après <https://www.veecoprobes.com/>]

2.3.1.3. Calibration de la céramique piézoélectrique

Avant chaque expérimentation, la sensibilité de la céramique piézo-électrique est évaluée. Le but de cette calibration est de savoir précisément de combien se déplace l'échantillon pour une tension donnée. Pour cela, une courbe de force sur un échantillon de référence présentant une surface dure est enregistrée. Les échantillons de TA6V sont habituellement utilisés. L'utilisation du logiciel commercial Multimode PicoForce (Veeco, Santa-Barbara, US) fourni avec le microscope permet la détermination de la sensibilité à partir de la courbe réalisée. Les pointes sont changées régulièrement, elles ne sont utilisées que quelques heures au total.

2.3.1.4. Calibration du microlevier

A la suite de cette calibration est déterminée la constante de raideur du microlevier par la méthode des « fluctuations thermiques » qui consiste à mesurer les fluctuations de la

déflexion du microlevier au repos. Ces mesures sont réalisées dans le milieu de culture afin de maintenir les mêmes conditions expérimentales que lors des essais sur cellules. L'amplitude des fluctuations d'origine thermique est directement reliée à la constante de raideur du microlevier par la relation :

$$K\langle Z^2 \rangle = k_B T \quad \text{Eq. 2.7}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, $\langle Z^2 \rangle$ la moyenne des carrés des positions du microlevier par rapport à sa position moyenne prise comme référence ($\langle Z \rangle = 0$), et K une constante proportionnelle à la constante de raideur du ressort. Le logiciel commercial permet alors la détermination de la constante de raideur du microlevier.

2.3.2. Imagerie AFM de la morphologie cellulaire

Le mode « tapping » a été utilisé pour l'obtention des images. Ce mode d'acquisition a donc pour avantage de réduire les risques de dégradation de la surface à imager. La régulation rétroactive de l'amplitude des oscillations du microlevier, associée aux déplacements de la céramique piézoélectrique permet d'obtenir une image topographique de la surface de l'échantillon en deux ou trois dimensions. Les grandeurs mesurées présentent une très grande précision puisque le déplacement de la céramique piézoélectrique est contrôlé à l'échelle du dixième de nanomètre. Dans le milieu de culture, les forces attractives dues à la tension de surface sont éliminées [SIM 02]. Cela permet d'observer la surface d'un échantillon avec une force minimum appliquée par la sonde AFM. Par contre, si les cellules sont faiblement adsorbées, le passage de la sonde les détache de la surface et elles retournent dans le milieu de culture environnant. De ce fait, les cellules doivent être adhérentes et non adsorbées pour être observées par AFM. Les images sont réalisées avec une définition de 256 lignes pour un échantillonnage de 256 échantillons par ligne avec une vitesse de balayage fixée à 0.6Hz. Les dimensions de l'image sont limitées par l'appareillage à 40x40µm. Une cellule adhérente et étalée mesure généralement plus de 40µm en longueur. On comprend alors qu'il est impossible d'imager entièrement une cellule avec cet appareillage. Suivant les informations recherchées, nous choisirons la zone à imager. Sur la figure 2.18 est représentée une cellule MG 63 sur hydroxyapatite 24h après ensemencement. La zone imagée est la zone apicale de la cellule. Sous cette zone se trouvent le noyau cellulaire ainsi que de nombreux organites. C'est sur cette zone que les mesures de propriétés mécaniques ont été réalisées

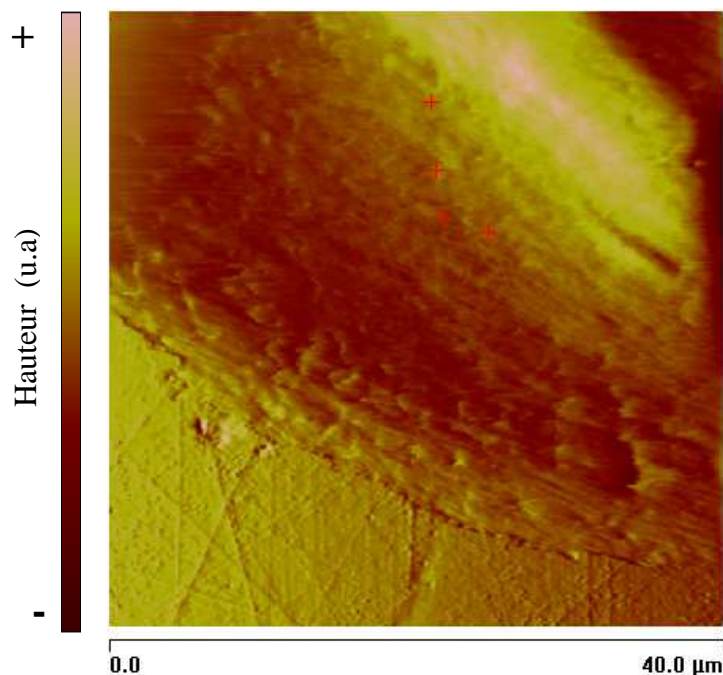


Fig. 2.18 : Image d'un ostéoblaste MG63 sur hydroxyapatite 24h après ensemencement.

2.3.3. La spectroscopie de force

En mode contact, l'AFM permet l'obtention de courbes de force. Le principe est de mesurer la déflexion du levier en fonction du déplacement en z de l'échantillon (Figure 2.19). La pointe ne balaie plus la surface de l'échantillon. Elle sonde la surface en un point (x,y) grâce au déplacement en z de la céramique piézo-électrique (figure 2.19). La pointe est alors utilisée comme un nanoindenteur. En partant d'une position éloignée de l'échantillon, la surface est progressivement rapprochée de la pointe. Entre les points 1 et 2, aucune déviation du levier n'est observée. Entre les points 2 et 3, la déviation négative observée est due aux forces attractives apparaissant entre la pointe et l'échantillon. La hauteur de cette déviation est proportionnelle à la force attractive. Lorsque la surface entre « en contact » avec la pointe, le sens de la déviation du levier s'inverse. L'échantillon continue à se déplacer et la déviation augmente linéairement. A partir du point 5, le mouvement de l'échantillon est inversé. Le point 6 correspond à une distance nulle entre l'échantillon et la pointe, pour laquelle le levier n'est pas dévié. Quand l'échantillon continue à s'éloigner, la pointe reste au contact de la surface de l'échantillon grâce aux forces d'adhésion (F_{adh}) jusqu'au point 7 où la force

élastique du levier l'emporte sur la force d'adhésion. Au point 8, le levier est revenu dans son état initial.

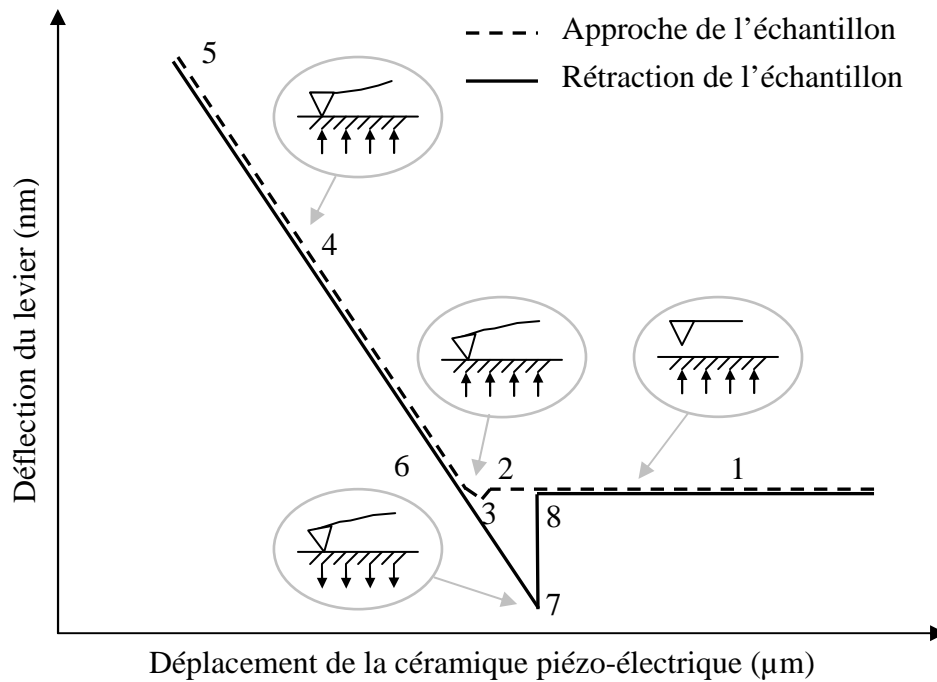


Fig. 2.19 : Principe d'une courbe de force

2.3.3.1. Description de la technique et traitement des données

Expérimentalement, obtenir une courbe de force consiste à appliquer une tension variable à la céramique piézoélectrique et à enregistrer une tension proportionnelle à la déflexion du microlevier. Préalablement, la zone de la cellule où les indentations seront réalisées doit être imagée. Pour cela, on utilise la méthode décrite au paragraphe 2.3.2. Les lieux d'indentation sont définis directement sur l'image. Ils sont représentés par des croix sur la figure 2.20. On impose à un échantillon un cycle charge-décharge (approche-retrait) jusqu'à une force de consigne. Pour cela, l'AFM fonctionne en mode asservi. La force imposée est fixée à 3nN, une valeur couramment trouvée dans la littérature [TAK 05] [COS 04]. Pour connaître le déplacement de l'échantillon correspondant à la tension appliquée, on utilise la constante de calibration de la céramique piézoélectrique.

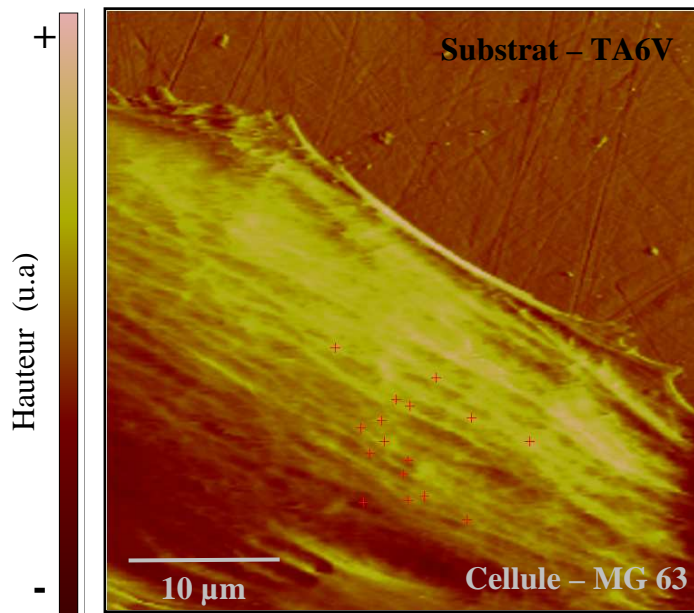


Fig. 2.20 : Image d'une cellule MG63 déposée sur TA6V et lieux des indentations (croix).

La figure 2.21 montre un exemple de courbes de force. La phase de charge (croix noires) suivie de la phase décharge (ronds gris) constituent un cycle complet charge/décharge de la sonde. La force appliquée au microlevier en fonction du déplacement de la céramique piézoélectrique est obtenue via le logiciel d'utilisation du microscope.

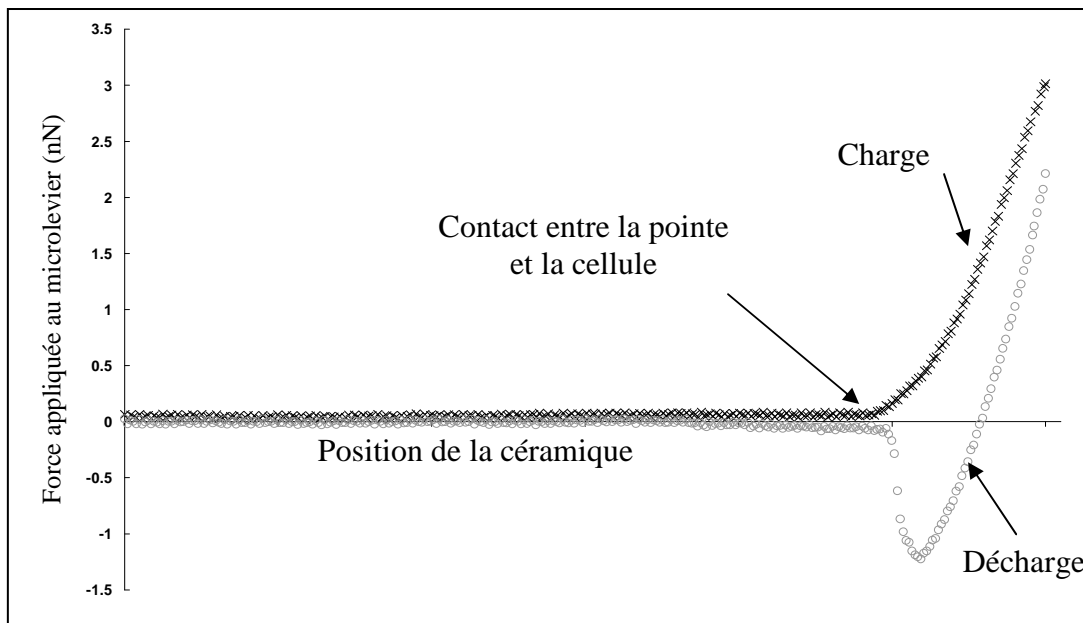


Fig. 2.21 : Représentation d'une courbe de force obtenue sur ostéoblaste.

Sur la courbe de charge, avant le contact entre la cellule et la pointe, on n'enregistre aucune déflexion du microlevier : la pointe et la surface sont très éloignées l'une de l'autre et la force d'interaction est nulle. Cette zone définit la ligne de base ($F = 0$). Après le contact, la déflexion augmente avec le déplacement : la pointe indente la cellule. Sur la courbe de décharge, on observe la diminution de la force appliquée sur le microlevier. En raison des interactions exercées entre la pointe et la surface (forces d'adhésion), des forces négatives peuvent être observées.

Le traitement de la courbe de charge par un modèle élastique ou viscoélastique permet de déterminer les propriétés mécaniques de la cellule. Pour cela, nous devons obtenir de l'évolution de la force d'indentation en fonction de la profondeur d'indentation. En premier lieu la position de la céramique pour laquelle la pointe entre en contact avec la cellule doit être déterminée. Cette position est notée Z_0 (figure 2.22B). On évalue cette position par un changement de pente significatif sur la courbe de force. Avant le contact la force est nulle, après le contact elle augmente rapidement jusqu'à la force de consigne. A partir de cette position Z_0 , l'indentation cellulaire débute. Malheureusement, le déplacement de la céramique piézoélectrique à partir de cette position ne représente pas directement l'indentation cellulaire (figure 2.22C). En effet, le déplacement après le contact entre la cellule et la pointe représente d'une part l'indentation cellulaire mais aussi la déflexion du microlevier. Pour connaître l'indentation, il faut soustraire la déflexion du microlevier du déplacement de la céramique. La connaissance de la constante de raideur du microlevier permet de calculer la déflexion en appliquant la loi de Hooke, **déflexion** = $F_{\text{cellule} \rightarrow \text{pointe}} / k$.

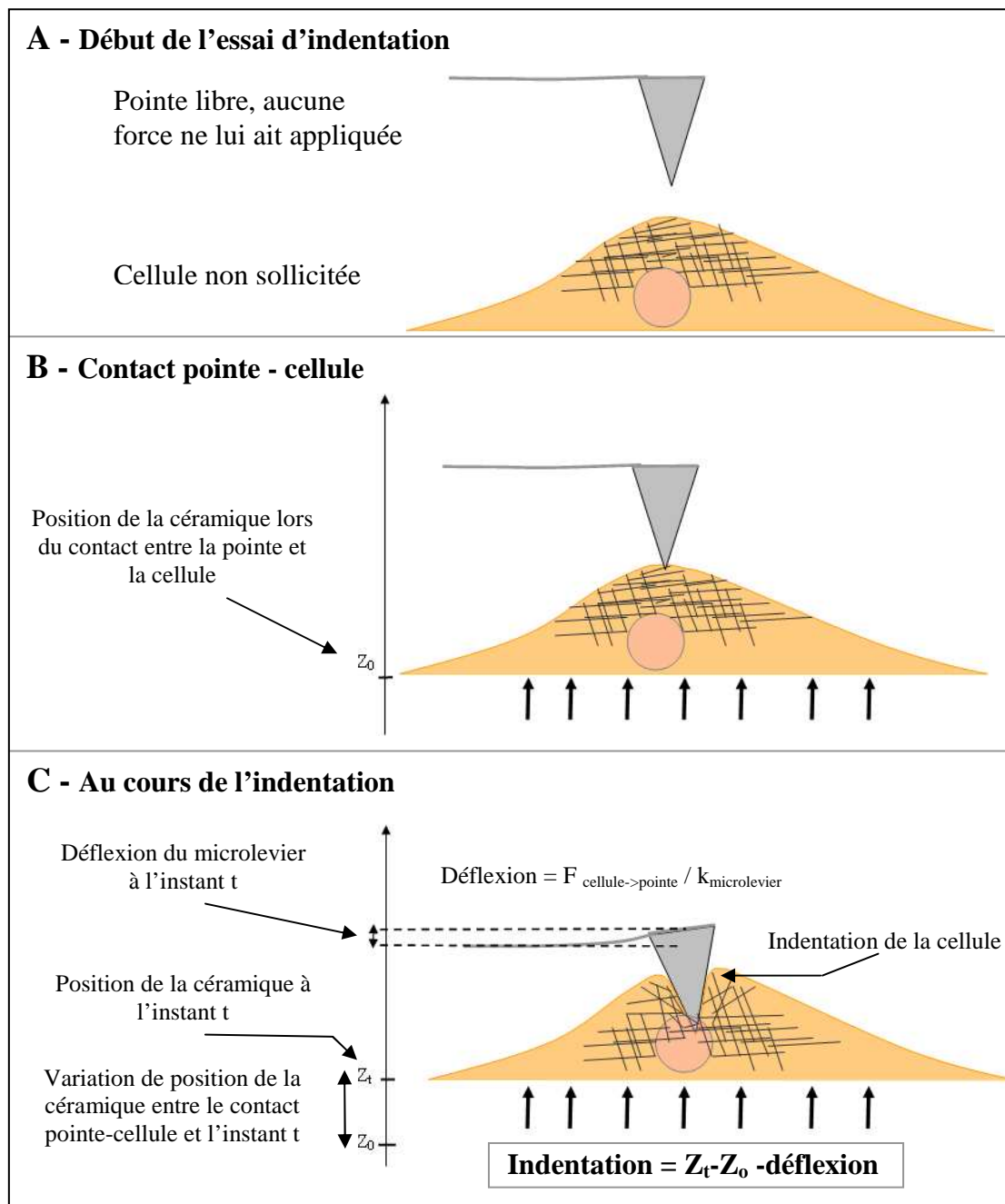


Fig. 2.22 : Etapes d'un essai d'indentation. Début de l'essai (A), contact entre la pointe et la cellule (B) et indentation (C).

Il est alors possible de tracer l'évolution de la force appliquée à la pointe (force d'indentation) en fonction de la profondeur d'indentation (figure 2.23).

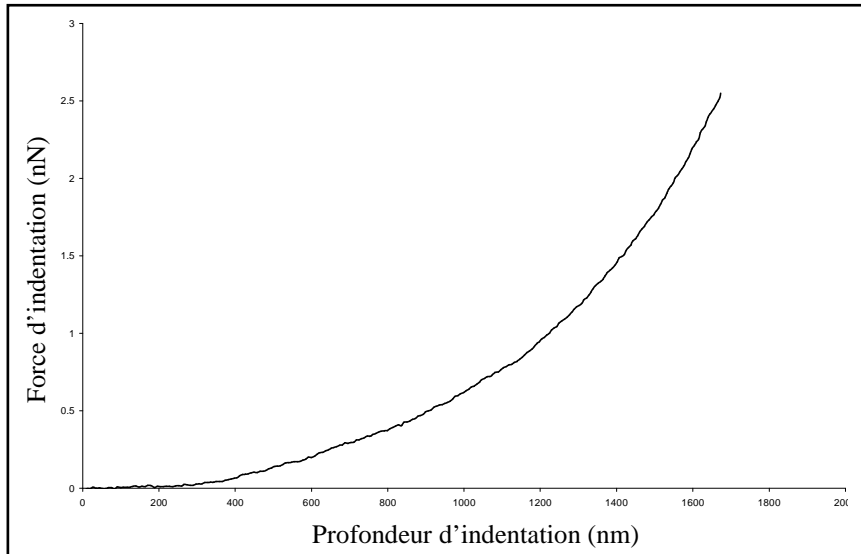


Fig. 2.23 : Représentation de la force d'indentation en fonction de la profondeur d'indentation dans une cellule adhérente.

2.3.3.2. Modèles de contact

Nous décrivons dans ce paragraphe les modèles utilisés pour exploiter ces courbes et ainsi déterminer les propriétés mécaniques de la cellule. L'application de la théorie de Hertz ou de Sneddon permet une première approximation du comportement mécanique des cellules par la détermination du module élastique (rigidité) cellulaire.

a. La théorie de Hertz

L'étude et la résolution mathématique du contact entre deux corps date de 1882 avec les travaux de Hertz [HER 82]. A partir d'une démarche analytique qui s'appuie sur la théorie de l'élasticité, il évalue l'écrasement, la surface de contact et les contraintes générées lors du contact de deux corps. La théorie de Hertz décrit la géométrie d'un contact élastique entre deux sphères de rayons quelconques, ou une sphère et une surface plane (rayon de courbure infini).

Les hypothèses sont les suivantes :

- les solides en regard sont soumis à des contraintes faibles, dans les limites de leur réponse élastique,
- les surfaces sont parfaites, lisses et homogènes,

- la force s'applique perpendiculairement au plan de contact. Il n'y a ni adhésion, ni frottement ou force tangentielle au plan défini par le contact.
- Les dimensions de l'aire de contact, par exemple le rayon (a) dans le cas du contact sphère-plan, sont petites par rapport au rayon de courbure des surfaces ($a \gg R$).

Considérons le cas d'une sphère indéformable en contact avec un plan élastique, cela implique que le module de Young E et le coefficient de poisson ν sont ceux du plan (cellule). Le rayon équivalent vaut celui de la sphère (figure 2.24).

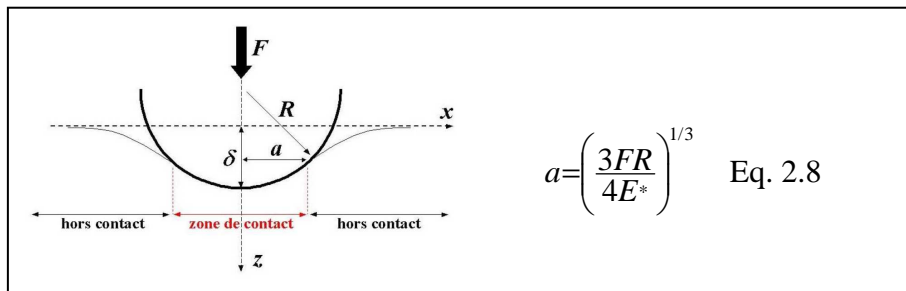


Fig. 2.24 : Géométrie du contact pointe-cellule selon un modèle de Hertz sphère-plan et expression du rayon de contact.

Avec le module effectif :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} \quad \text{Eq. 2.9}$$

et l'enfoncement des surfaces (profondeur d'indentation) :

$$\delta = \frac{a^2}{R} \quad \text{Eq. 2.10}$$

b. La théorie de Sneddon

Sneddon [SNE 65] a repris et étendu la théorie de Hertz à diverses formes d'indenteurs ; celle qui nous intéresse est celle d'un cône sur un plan semi-infini élastique. Dans ce cas, l'équation permettant de relier la force aux autres paramètres d'indentation est la suivante :

$$F = \frac{2E \tan(\alpha) \delta^2}{\pi(1-\nu^2)} \quad \text{Eq. 2.11}$$

avec α le demi-angle d'ouverture du cône. De même que pour la théorie de Hertz, nous pouvons exprimer le module d'élasticité de la cellule indentée à partir de l'équation précédente.

2.3.3.3. Application des modèles de contact à l'indentation à l'aide d'une pointe de microscope à force atomique.

Pour évaluer le module élastique de la cellule, les modèles de Hertz et de Sneddon sont classiquement utilisés. Simon reporta dans ses études, que pour une indentation inférieure à 100 nm, le modèle sphérique pouvait être utilisé [SIM 02]. Pour une indentation supérieure, c'est le modèle de Sneddon qui est adéquat. Par contre, pour de grandes indentations Mahaffy a montré que les modèles de Hertz et de Sneddon n'étaient pas adaptés pour évaluer correctement le module élastique de la cellule [MAH 04]. Nous décidons de déterminer le module élastique pour une profondeur d'indentation comprise entre 100 et 500 nm avec le modèle de Sneddon. Une indentation de 500 nm représentant environ 10 % à 15 % de la hauteur cellulaire, le modèle est jugé satisfaisant sur cette gamme de déformation. Le coefficient de poisson ν de la cellule et le demi-angle d'ouverture α de la pyramide sont fixés respectivement par les données de la littérature ($\nu = 0.5$) et par les données du constructeur ($\alpha = 35^\circ$) [McG 04]. La profondeur d'indentation et la force d'indentation proviennent du traitement des données du logiciel constructeur (§ 2.5.1). A partir de l'équation 2.11, il est possible de déterminer le module élastique de la zone indentée

Plusieurs méthodes sont envisageables pour évaluer le module élastique de la zone indentée. Certains auteurs déterminent le module élastique pour une profondeur d'indentation fixée [COS 04]. Une autre méthode consiste à tracer l'évolution du module élastique en fonction de la profondeur d'indentation (figure 2.25A) [MAT 01] [BAC 08] [MAH 04]. Takai estima alors que le module élastique devait être choisi dans la zone de la courbe où le module ne varie pas en fonction de la profondeur d'indentation [TAK 05]. Sur l'exemple présenté, il est observé que le module élastique ne se stabilise jamais dans la modélisation par un contact de Hertz. Ce comportement est observé pour toutes les indentations que nous avons réalisées. Ceci confirme que ce modèle n'est pas adéquat pour notre application. Par contre, la modélisation par la théorie de Sneddon montre une stabilisation du module élastique à partir d'une indentation de 300 nm. En restant dans les limites du modèle, il est possible d'évaluer le module élastique entre 300 et 500 nm. Dans le cas présenté, ce module est évalué à 1.3 kPa mais cette détermination reste imprécise.

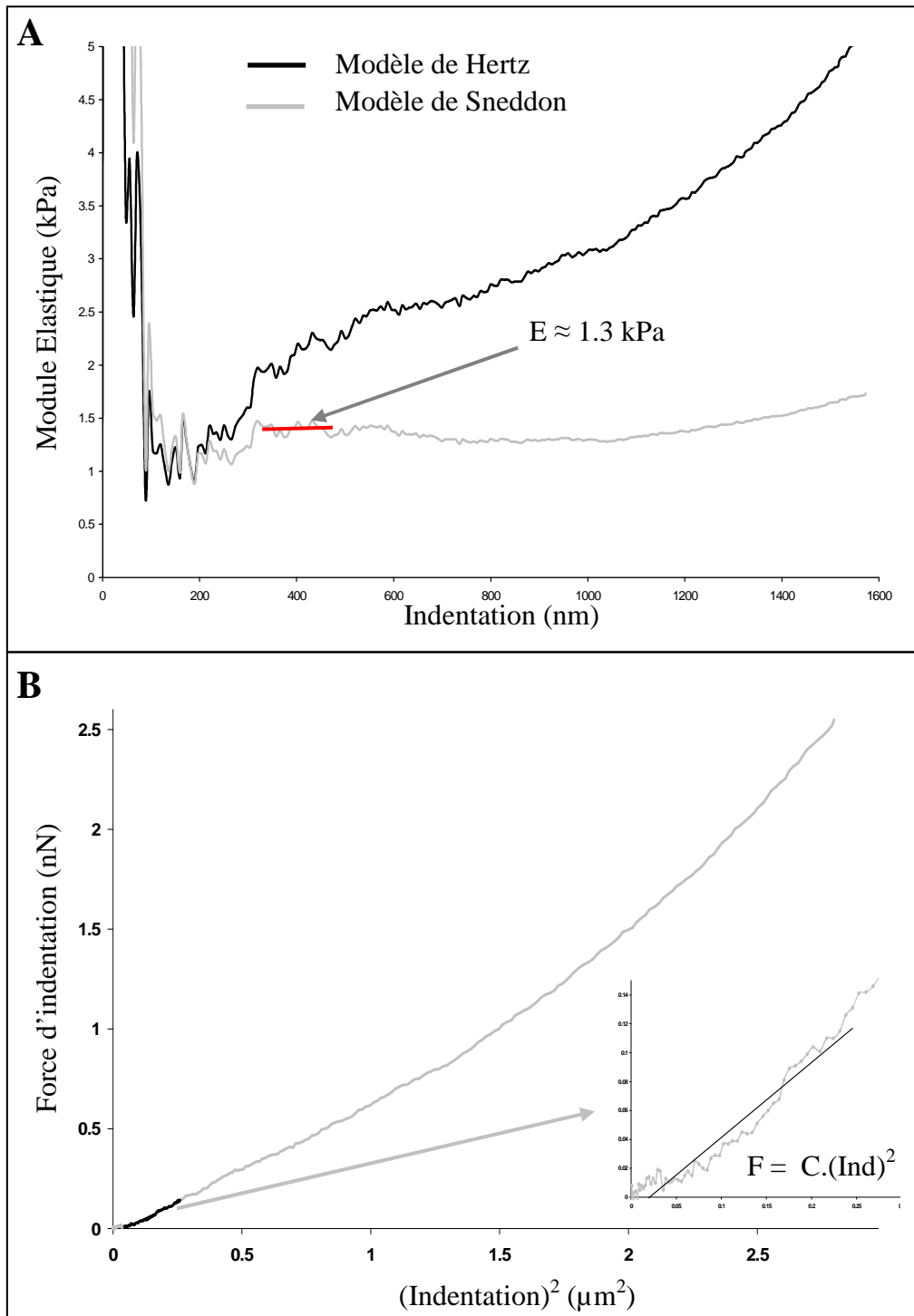


Fig . 2.25 : Evolution du module élastique en fonction de la profondeur d'indentation pour les modèles de Hertz et de Sneddon (A) et évolution de la force d'indentation en fonction du carré de l'indentation (en vue de l'utilisation du modèle de Sneddon) (B)

Une dernière méthode consiste à tracer l'évolution de la force d'indentation en fonction du carré de la profondeur d'indentation [RAB 05] [LAU 05]. Dans le cas de la modélisation de Sneddon, le coefficient directeur de la droite obtenue est alors directement

proportionnel au module élastique (figure 2.25B). Cette méthode présente l'avantage de ne pas choisir arbitrairement une profondeur d'indentation pour la détermination du module élastique. Sur l'exemple présenté, on observe que la force d'indentation n'est pas proportionnelle au carré de l'indentation sur l'ensemble de l'essai. On confirme ici que pour de fortes indentations, le modèle de Sneddon n'est pas parfaitement adaptés à nos résultats. cependant sur l'intervalle 0.01-0.25 μm^2 , la linéarité obtenue permet une détermination précise du module élastique.

Il est déterminé par le calcul suivant :

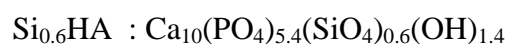
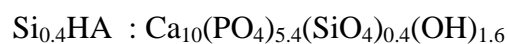
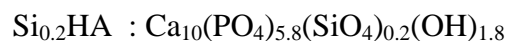
$$E = \frac{C\pi(1-\nu)}{2 \tan(\alpha)} \quad \text{Eq. 2.12}$$

Où C est le coefficient directeur de la droite $F_{\text{ind}} = f(\text{ind}^2)$ aux faibles indentations.

Au vue de sa plus grande précision, cette dernière méthode sera utilisée pour l'évaluation du module élastique cellulaire. Nous avons alors utilisé des macros Excel[®] pour automatiser les différents calculs intermédiaires (calcul de la déflexion du microlevier, calcul de la profondeur d'indentation, évaluation du coefficient directeur de la courbe $F_{\text{ind}}=f(\text{ind}^2)$, etc...).

2.4. Conclusion

La détermination des conditions optimales de frittage à permis la préparation des pastilles d'apatites stœchiométriques denses et monophasées. Dans le cas des apatites carbonatées, seule la composition $\text{C}_{0.25}\text{HA}$ a pu être frittée convenablement pour obtenir des pastilles denses et monophasées. Sa formule chimique est la suivante : $\text{Ca}_{9.35}(\text{PO}_4)_{5.35}(\text{CO}_3)_{0.65}(\text{OH})_{1.35}$. Les taux de densification sont compris entre 94 et 98.5%. La porosité résiduelle est dans tous les cas fermée, ce qui permet de comparer les résultats de l'évaluation biologique en éliminant les effets de la porosité ouverte sur la bioactivité. Les pastilles d'apatites silicatées sont denses et monophasées. Leurs formules chimiques sont les suivantes :



La reproductibilité du polissage des pastilles après frittage (dans le cas des apatites) et après découpe (dans le cas du TA6V) permet une uniformisation de la surface et l'obtention de rugosités semblables, indépendantes de la composition des matériaux. Malheureusement il n'a été possible de produire qu'une dizaine de pastilles d'apatites carbonatées $C_{0,25}HA$. Le doute qui subsiste sur la composition réelle de ces pastilles nous a contraints à restreindre l'étude complète de la bioactivité des hydroxyapatites substituées aux seules apatites silicatées. L'hydroxyapatite carbonatée sera uniquement utilisée par la détermination du module élastique d'ostéoblastes ensemencés à sa surface.

L'évaluation du module élastique d'une cellule par indentation à l'aide de la pointe d'un microscope à force atomique nécessite un traitement de la courbe de charge, et son exploitation par le modèle de Sneddon. La méthode consiste à tracer l'évolution de la force d'indentation en fonction du carré de la profondeur d'indentation pour une profondeur d'indentation comprise entre 100 et 500 nm. Le coefficient directeur de la droite obtenue est alors directement proportionnel au module élastique.

Chapitre 3 : Validation de la méthode d'évaluation de la rigidité cellulaire

L'indentation par AFM comme outil pour l'étude de la mécanique cellulaire n'est pas encore totalement maîtrisée. De nombreux artefacts de mesure restent délicats à prendre en compte, et des difficultés dans l'interprétation des résultats poussent à l'amélioration de la modélisation du contact entre la pointe et une cellule. C'est pourquoi, préalablement à notre étude sur les cellules déposées sur différents substrats, nous avons réalisé des travaux destinés à rendre plus robustes les interprétations ultérieures.

3.1. Choix des courbes de forces à exploiter

L'obtention de courbes de force exploitables reste un art difficile. De nombreux phénomènes physiques peuvent venir perturber la mesure. Dans notre cas, ces perturbations se sont traduites le plus souvent par l'apparition d'une augmentation de la force appliquée à la pointe lors de l'approche de la cellule. Comme décrit dans le chapitre précédent, cette force est supposée rester quasi nulle jusqu'à une distance très faible de la cellule. Sur la figure 3.1A est donné un exemple de courbe de force obtenue lors de l'indentation d'une cellule ensemencée sur TA6V. En gris, une courbe classique d'indentation avec une rupture de pente nette. La détermination du point de contact (Z_0) entre la cellule et la pointe est alors aisée. A partir de là, le calcul de la déflexion du microlevier, de la profondeur d'indentation puis du module élastique ne posent aucun problème..

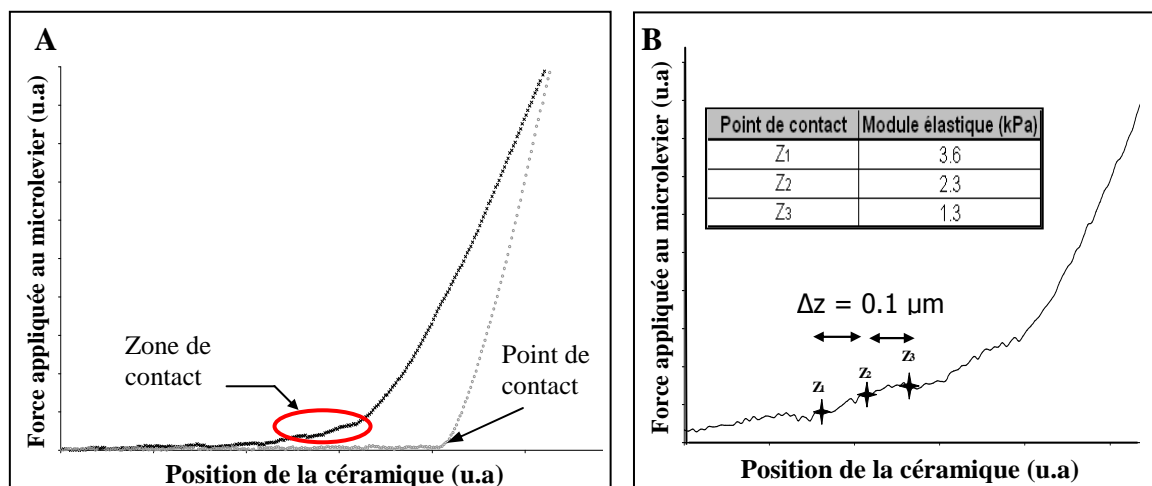


Fig 3.1 : Exemples de courbes de forces obtenues sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V (A) et détermination du module élastique associé à différents points de contact entre la pointe et la cellule (B).

Dans le cas de la courbe noire, une augmentation progressive de la force avec l'approche de la cellule se traduit par une difficulté dans la détermination du point de contact

pointe - cellule. Il n'existe pas un point de contact précis, mais une zone où le contact peut avoir lieu. En découle une détermination imprécise du module élastique comme le démontrent les résultats présentés sur la figure 3.1B. Sur cette figure, on peut choisir pour Z_0 3 positions espacées de $0.1\mu\text{m}$ dans la zone de contact (Z_1 , Z_2 et Z_3). Pour chacune d'elles le module élastique est évalué. Malgré le faible espacement des positions choisies, on observe un différentiel de module important (de 1.3 à 3.6 kPa). Afin de ne pas commettre des erreurs trop importantes sur l'évaluation des modules élastiques, la reproductibilité et la répétitivité de la détermination du point de contact n'étant pas assurées, nous avons fait le choix de ne pas exploiter ces courbes par la suite.

Les causes exactes de l'augmentation progressive de la force appliquée à la pointe lors de l'approche n'ont pu être déterminées. L'hypothèse d'interactions à distance entre la cellule et la pointe AFM a été confirmée par l'étude de courbes de force réalisées sur TA6V ou hydroxyapatite sans tapis cellulaire. Sur ces matériaux non recouverts, aucune courbe de forces présentant une augmentation progressive de la force n'a été observée. Le milieu dans lequel les expérimentations sont faites a aussi été mis en cause. Ses nombreux constituants pouvant aider à la création d'artefacts. Malheureusement la réalisation de courbes de forces dans un tampon phosphate (DPBS) ou dans différents milieu de culture apporta toujours quelques courbes présentant une augmentation progressive de la force.

Au total, ce sont environ 75% des courbes de force réalisées qui présentent une rupture de pente nette, permettant leur exploitation.

3.2. Indentation de cellules modèles

Des « cellules modèles » sont des cellules dont nous maîtrisons à priori l'évolution la rigidité. En surdéveloppant ou en sous développant le réseau d'actine, la contractilité cellulaire s'en trouve respectivement accrue ou diminuée. Il est alors attendu que les modules élastiques cellulaires correspondant soient respectivement plus élevés ou plus faibles que la modules élastiques des cellules basales.

3.2.1. Méthode utilisée

Comme référence nous avons évalué le module élastique d'ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 24h.

Le recours à de nombreux agents biochimiques est envisageable pour modifier le cytosquelette. Classiquement, la jasplakinolide, un peptide cyclique isolé à partir d'une éponge marine, est utilisée dans le but d'accroître la contractilité cellulaire. Après 20h de culture sur TA6V, nous préparons du milieu de culture dans lequel nous rajoutons une solution de jasplakinolide à $0.01 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Nous incubons alors les cultures cellulaires pendant 20 minutes dans ce milieu. Les mesures du module élastique seront faites 24h après ensemencement.

Pour obtenir des contractilités cellulaires plus faibles que celles de cellules adhérentes, nous avons préféré utiliser une méthode plus originale. Nous nous sommes basés sur le faible développement du cytosquelette juste après la phase d'adhésion (attachement) sur un substrat. La rigidité des cellules peu adhérentes doit donc être plus faible que celles de cellules adhérentes. En partant de ce principe, nous avons indenté des cellules déposées sur TA6V après seulement 45 minutes.

La force et la vitesse d'indentation sont fixées respectivement à 3nN et $0.1\mu\text{m}.\text{s}^{-1}$. Le volume de milieu dans lequel les expériences sont réalisées est fixé à $100\mu\text{L}$.

A partir des données recueillies, nous présenterons les résultats suivant deux types d'approche. Premièrement, nous évaluerons la profondeur d'indentation en fonction de la force d'indentation pour chaque cellule modèle. Cette information renseigne directement sur la rigidité de la cellule. A une force d'indentation donnée, plus une cellule est rigide plus la profondeur d'indentation est faible. Dans un deuxième temps, nous évaluerons les modules élastiques des cellules indentées en appliquant la théorie de Sneddon. La comparaison de ces résultats avec les évolutions de la profondeur d'indentation permettra de conclure sur la pertinence de notre méthode de quantification de la rigidité cellulaire.

3.2.2. Résultats

- Morphologie cellulaire

Préalablement à l'indentation, les ostéoblastes sont imagés. Cependant les ostéoblastes ensemencés depuis seulement 45min ne le sont pas car les interactions entre la pointe et la cellule risqueraient de les détacher de la surface, ou de modifier l'état du cytosquelette.

Les figures 3.2 A, B et C présentent respectivement un ostéoblaste ensemencé depuis 24h sur TA6V, et deux ostéoblastes ensemencés depuis 24h puis traités à la Jasplakinolide. Ces ostéoblastes présentent la morphologie cellulaire typiquement attendue.

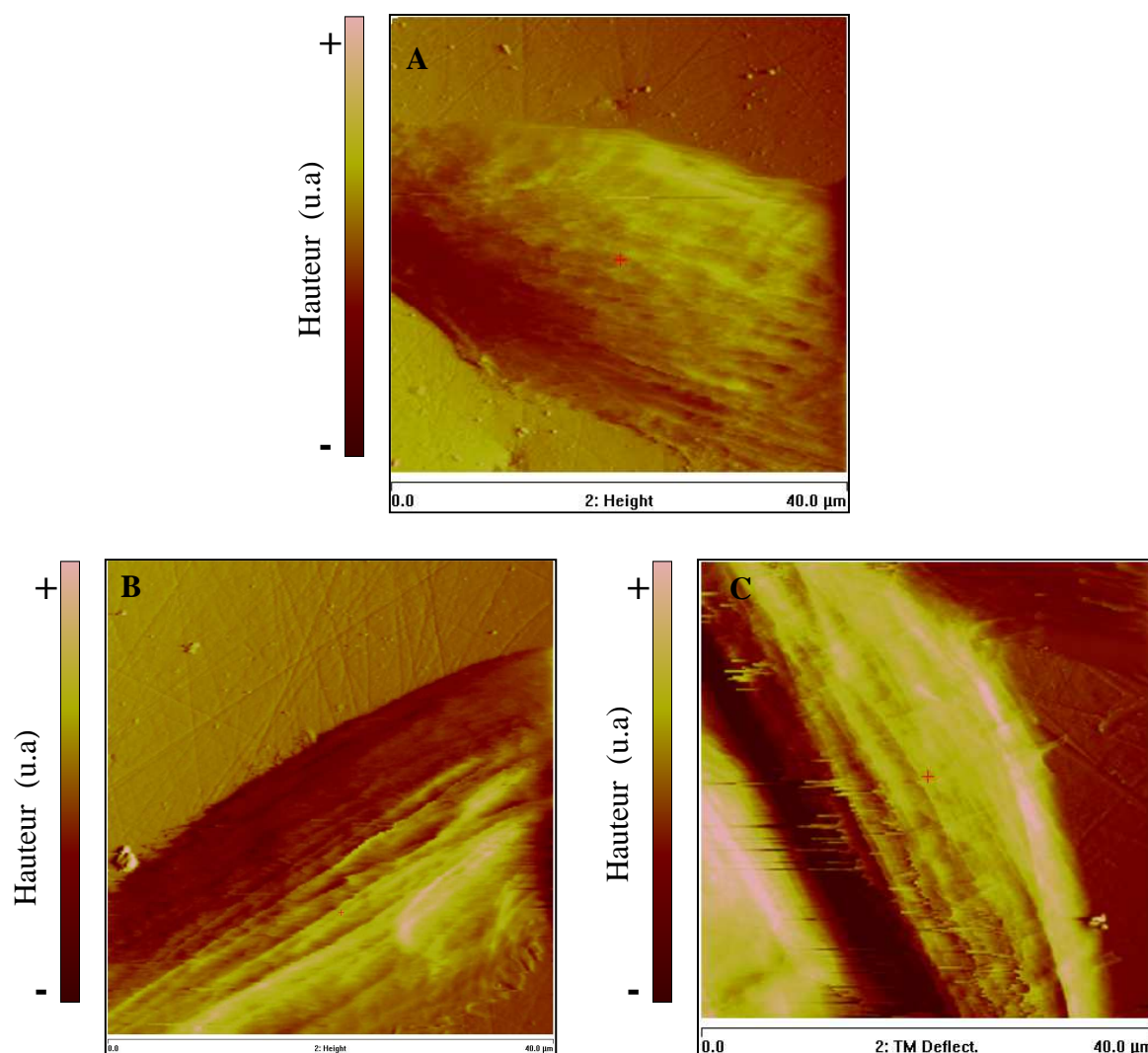


Fig 3.2 : Morphologie d'ostéoblastes ensemencés depuis 24h sur TA6V (A) et traités à la Jasplakinolide (B et C).

Les ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 24h sont assez allongés. Sur ces cellules, des fibres de stress peuvent être distinguées sous la membrane cellulaire. Les ostéoblastes traités à la Jasplakinolide apparaissent plus allongés. Sur ces cellules les fibres de stress sont beaucoup plus visibles. Des « câbles » semblent traverser les cellules suivant leur grand axe. Lors du scan, la pointe peut accrocher ces fibres, on observe alors des images troublées (figure 3.3 C).

- Mesure de la profondeur d'indentation

Dans cette étude, pour chaque condition une dizaine de pastilles a été utilisée. A raison de 2 ou 3 cellules testées par pastilles, environ trente cellules ont été sollicitées. Il est réalisé 5 indentations par cellule, nous avons donc obtenu environ 150 courbes d'indentation pour chaque condition expérimentale. Nous avons choisi de représenter la distribution des profondeurs d'indentation pour 3 valeurs de la force (figure 3.4). Ces valeurs sont fixées à 0.25, 1.25 et 2.5nN. Elles permettent une vision complète de la réponse cellulaire. Les distributions sont présentées de façon à obtenir 20 classes de profondeur d'indentation. L'évolution des profondeurs d'indentation en fonction des forces montre que plus la force est élevée, plus la profondeur d'indentation est élevée. Pour une force de 0.25nN, la profondeur moyenne d'indentation est d'environ 400 nm. A 1.25nN, la moyenne est au alentour de 800 nm et à 2.5 nN, la profondeur d'indentation est majoritairement supérieure à 1 μ m (tableau 3.1 A et B).

La modélisation (via l'outil d'analyse XLSTAT®) montre que seuls les résultats provenant des cellules ensemencées depuis 45min suivent une loi d'évolution de type normale. Dans les deux autres cas (ensemencées depuis 24h avec ou sans traitement à la jasplakinolide), quelle que soit la force d'indentation envisagée, le test du Khi-2¹ montre que les résultats obtenus ne suivent pas parfaitement une évolution de type loi Normale (tableau 3.1 et figure 3.4)

¹ Le test de Khi-2 est un test d'hypothèse qui sert à la comparaison d'un couple d'effectifs observés, et plus généralement à la comparaison de deux distributions observées. Dans notre cas, nous l'utilisons pour tester l'adéquation entre une loi de probabilité et un échantillon d'observations.

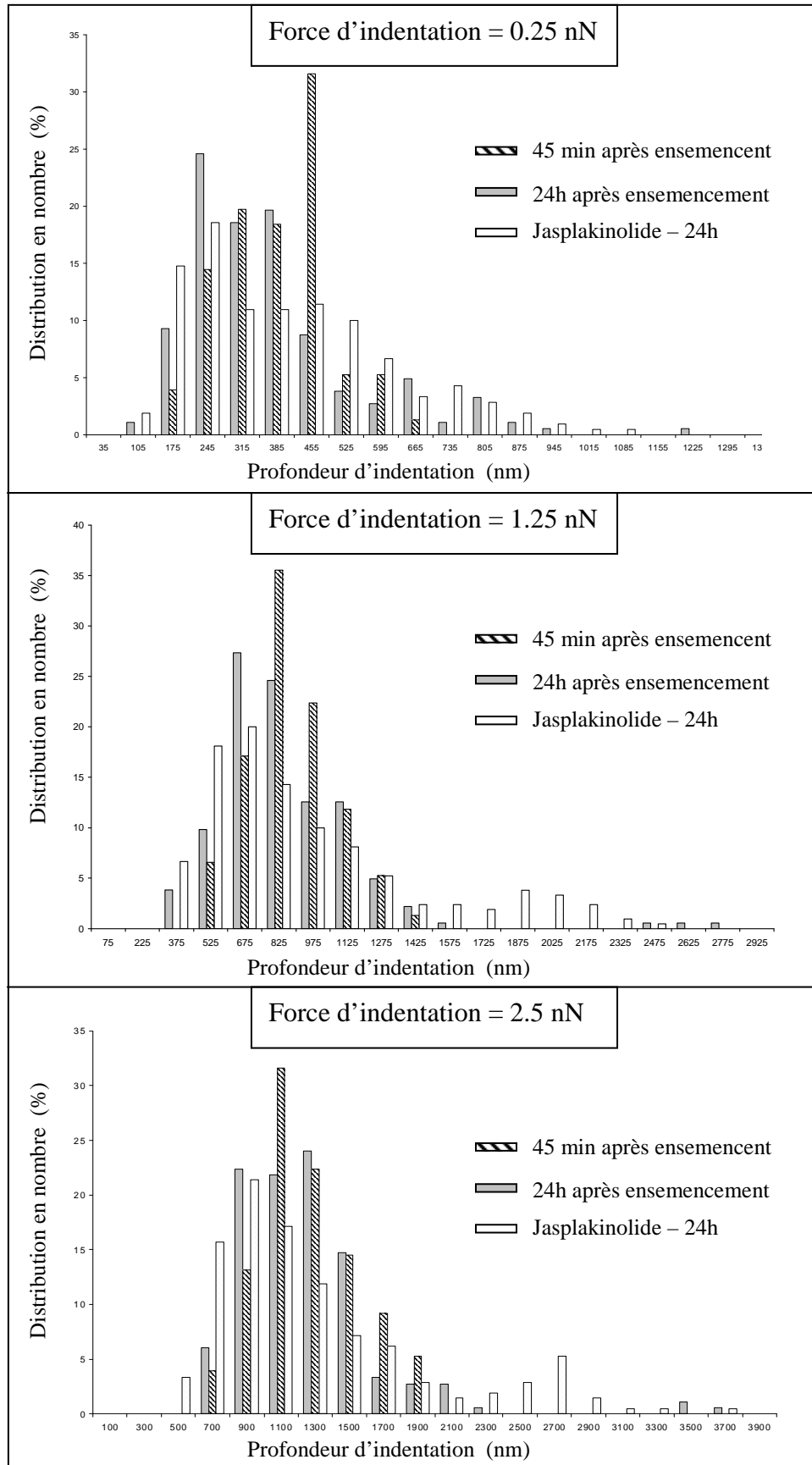


Fig 3.3 : Distribution des profondeurs d'indentation en fonction de la force d'indentation pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45 min, et 24h avec ou sans traitement à la jasplakinolide

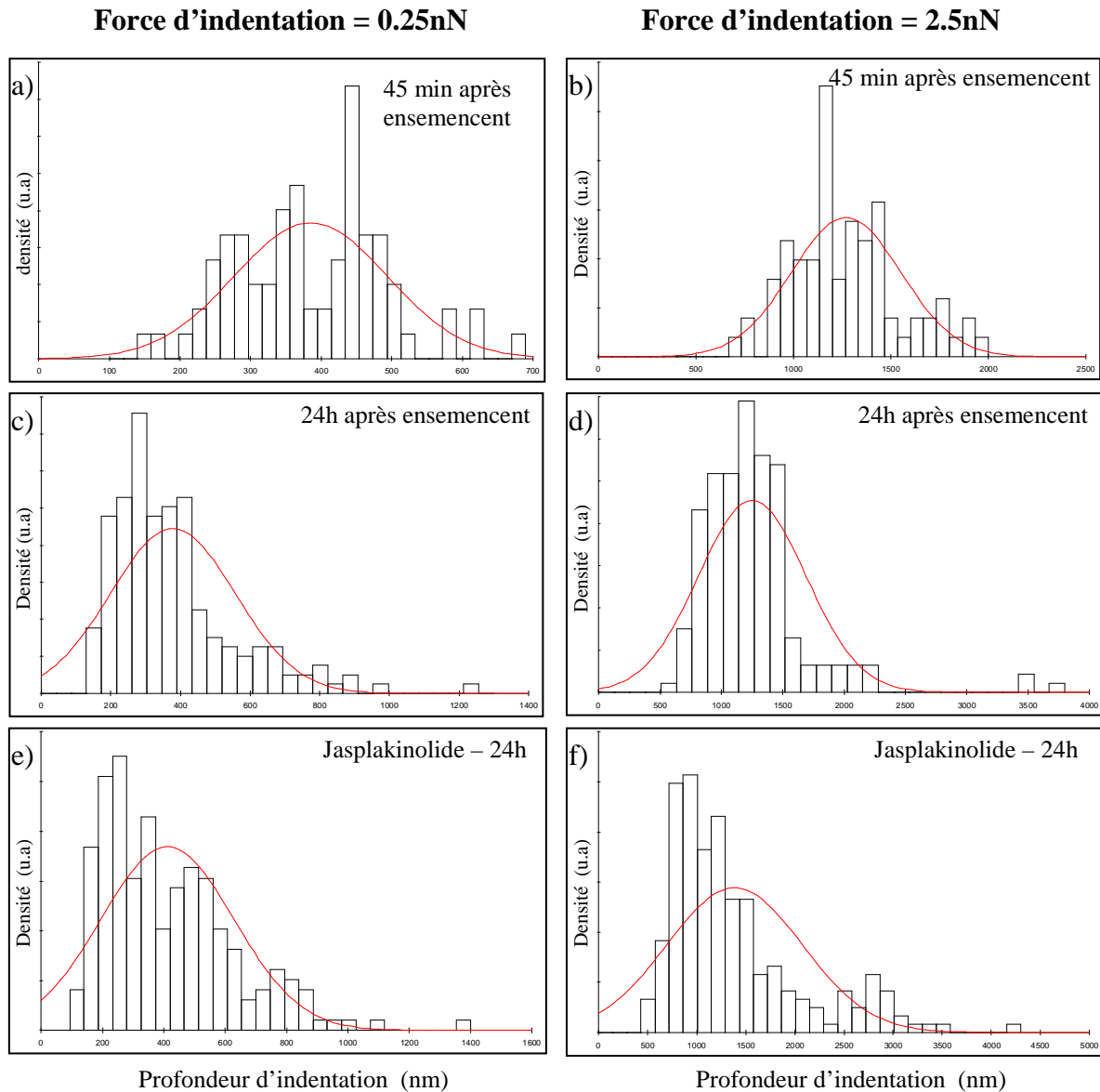


Fig 3.4 : Modélisation des distributions des profondeurs d'indentation par une loi Normale pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45min (a et b), 24h (c et d) et des ostéoblastes traités à la jasplakinolide (e et f). Force d'indentation de 0.25 (a, c et e) et 2.5nN (b, d et f).

Les tableaux 3.1 A, B et C regroupent l'ensemble des caractéristiques des distributions des profondeurs d'indentation pour des forces de 0.25, 1.25 et 2.5 nN. On observe que le coefficient d'asymétrie des distributions provenant des cellules ensemencées depuis 24h et des cellules traitées à la jasplakinolide est élevé quelle que soit la force appliquée.

Tableau A – Force d'indentation de 0.25nN

Type de cellules	Paramètre de la distribution	Profondeur d'indentation moyenne (nm)	Ecart type observé (nm)	Test du Khi-2	Coefficient d'asymétrie (Pearson) ²
45 min après ensemencement		385	109	Positif	0.215
24h après ensemencement		378	179	Négatif	1.507
Jasplakinolide – 24h		412	216	Négatif	1.089

Tableau B – Force d'indentation de 1.25nN

Type de cellules	Paramètre de la distribution	Profondeur d'indentation moyenne (nm)	Ecart type observé (nm)	Test du Khi-2	Coefficient d'asymétrie (Pearson)
45 min après ensemencement		883	180	Positif	0.38
24h après ensemencement		865	327	Négatif	2.579
Jasplakinolide – 24h		956	493	Négatif	1.160

Tableau C – Force d'indentation de 2.5nN

Type de cellules	Paramètre de la distribution	Profondeur d'indentation moyenne (nm)	Ecart type observé (nm)	Test du Khi-2 avec une loi Normale	Coefficient d'asymétrie (Pearson) ²
45 min après ensemencement		1270	281	Positif	0.57
24h après ensemencement		1251	438	Négatif	2.646
Jasplakinolide – 24h		1384	690	Négatif	1.371

Tabl. 3.1 : Paramètres des distributions des profondeurs d'indentation pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45min et 24h avec ou sans traitement à la jasplakinolide. Force d'indentation de 0.25nN (Tableau A), 1.25nN (Tableau B) et 2.5nN (Tableau C).

Au contraire, ce paramètre est faible pour des cellules ensemencées depuis 45 min. L'existence d'une distribution conduit à des valeurs moyennes qui ne sont alors pas significatives de la distribution. La comparaison statistique des distributions ne peut pas alors se faire en utilisant le test paramétrique classique de Student. Nous utilisons un test non

² Ce coefficient caractérise le degré d'asymétrie d'une distribution par rapport à sa moyenne. Pour une distribution gaussienne (loi Normale), l'asymétrie vaut 0. Une valeur négative correspond à la présence d'une queue de distribution vers la gauche tandis qu'une valeur positive correspond à une queue de distribution vers la droite

paramétrique de Kolmogorov-Smirnov³. Suivant le niveau de signification choisi (ici 5%), ce test permet de conclure sur la différence significative entre les distributions. Si la probabilité que les distributions ne soient pas significativement différentes est inférieure à 5% ($p > 0.05$) alors nous concluerons que les deux distributions sont significativement différentes. On regroupe dans le tableau 3.2 l'ensemble des résultats provenant des tests comparatifs des distributions.

Force d'indentation Comparaison	0.25 nN	1.25 nN	2.5 nN
45min après ensemencement vs 24h après ensemencement	0.04	0.007	0.124
24h après ensemencement vs Jasplakinolide – 24h	0.004	0.022	0.10
Jasplakinolide – 24h vs 45min après ensemencement	0.009	0.0003	0.004

Tabl. 3.2 : Résultats du test de Kolmogorov-Smirnov pour la comparaison des différentes distributions des profondeurs d'indentation. Les valeurs représentent la probabilité que les deux distributions soient identiques.

Ce test montre que très majoritairement, les résultats obtenus sur les trois types de cellules sont différenciables les uns des autres quelle que soit la force d'indentation envisagée. Les deux cas où les distributions ne sont pas significativement différentes apparaissent pour une force d'indentation de 2.5nN, des cellules ensemencées depuis 24h d'une part, et pour des cellules traitées à la jasplakinolide ou des cellules ensemencées depuis 45 min d'autre part. La rigidité cellulaire semble donc semblable dans ces conditions là.

- Evaluation du module élastique

A partir de toutes les indentations réalisées, nous évaluons le module élastique en utilisant la méthode décrite au chapitre II. Les courbes présentant une augmentation progressive de la force avant le contact entre la pointe AFM et la cellule n'ont pas été

³ En statistiques, le **test de Kolmogorov-Smirnov** est un test d'hypothèse utilisé pour déterminer si un échantillon suit bien une loi donnée connue par sa fonction de répartition continue, ou bien si deux échantillons suivent la même loi.

retenues. Au final, environ 75% des courbes d'indentation ont été exploitées. Nous présentons sur la figure 3.5 les distributions des modules élastiques obtenus sur les trois types de cellules.

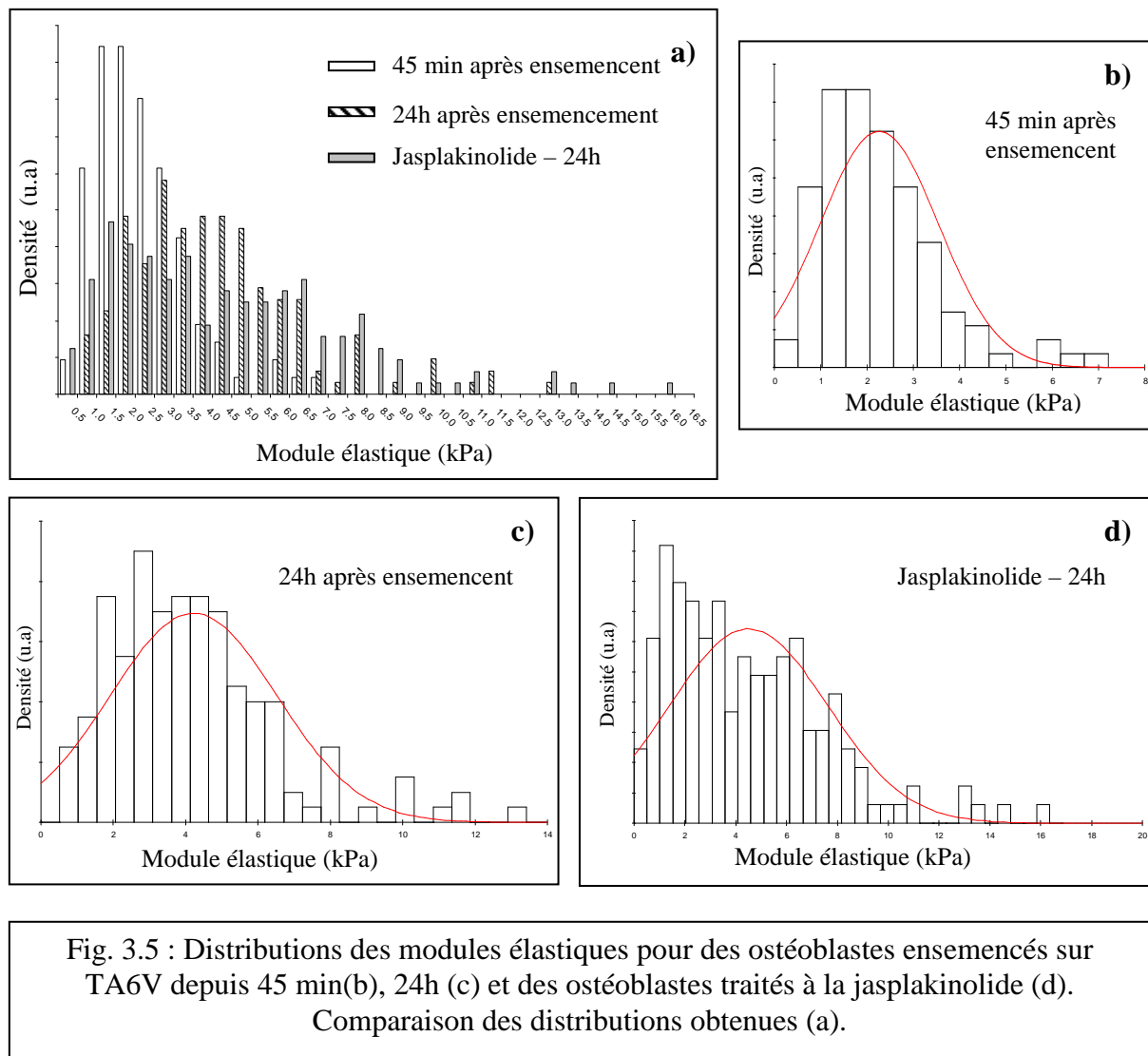


Fig. 3.5 : Distributions des modules élastiques pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45 min (b), 24h (c) et des ostéoblastes traités à la jasplakinolide (d). Comparaison des distributions obtenues (a).

On regroupe dans le tableau 3.3 l'ensemble des caractéristiques provenant des distributions des modules élastiques. Les modules élastiques moyens sont respectivement de 2.27, 4.22, 4.51 kPa pour des ostéoblastes ensemencés depuis 45 min, 24h et traités à la jasplakinolide. Les moyennes des distributions sont donc d'autant plus élevées que le cytosquelette est développé. Par ailleurs, on observe que les écart-types augmentent avec le développement du cytosquelette. Il est le plus élevé pour les cellules traitées à la jasplakinolide (3.1 kPa).

Néanmoins, le test du Khi-2 montre là encore que seule la distribution provenant des cellules ensemencées depuis 45 min suit une évolution de type loi Normale. Les coefficients d'asymétrie des distributions sont semblables et proches de 1.

Paramètre de la distribution Type de cellules	Module élastique moyen (kPa)	Ecart type observé (kPa)	Test du Khi-2	Coefficient d'asymétrie (Pearson)
45 min après ensemencement	2.27	1.28	Positif	0.98
24h après ensemencement	4.22	2.3	Négatif	1.176
Jasplakinolide – 24h	4.51	3.1	Négatif	1.034

Tabl. 3.3 : Paramètres de la distribution des modules élastiques évalués sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45min et 24h avec ou sans traitement à la jasplakinolide

On regroupe dans le tableau 3.4 l'ensemble des résultats provenant des tests comparatifs de Kolmogorov-Smirnov vis à vis des distributions. Ce test montre que toutes les distributions des modules élastiques sont différenciables.

Comparaison	45min après ensemencement vs 24h après ensemencement	24h après ensemencement vs Jasplakinolide – 24h	Jasplakinolide – 24h vs 45min après ensemencement
Test de Kolmogorov-Smirnov	< 0.0001	0.046	< 0.0001

Tabl. 3.4 : Résultats du test de Kolmogorov-Smirnov pour la comparaison des différentes distributions des modules élastiques. Les valeurs représentent la probabilité que les deux distributions soient identiques.

3.3. Discussion à propos de la dispersion de la réponse mécanique cellulaire

Nous venons de voir que la réponse mécanique des trois types d'ostéoblastes est majoritairement différenciable statistiquement. Les trois types de cellules envisagées dans cette étude présentent donc bien une rigidité différente. Les ostéoblastes traités à la jasplakinolide présentent une profondeur moyenne d'indentation plus faible que les autres, associée à un module élastique plus élevé.

De plus une différence existe entre la forme de la distribution provenant des ostéoblastes peu adhérents et les deux autres types d'ostéoblastes : dans le cas des cellulesensemencées depuis 45 min (ostéoblastes peu adhérents), les résultats suivent une évolution de type loi Normale, ce qui démontre un caractère homogène de la réponse cellulaire face à une indentation. Au contraire, les résultats obtenus sur les ostéoblastesensemencés depuis 24h (cellules adhérentes), et sur les ostéoblastes traités à la jasplakinolide ne montrent pas une évolution « Normale ». Les distributions des profondeurs d'indentation de ces deux derniers types de cellules comportent une forte asymétrie. Celle-ci est provoquée par une surexpression des profondeurs d'indentation faibles. Il en est de même pour les distributions des modules élastiques.

L'existence d'une distribution peut avoir deux origines :

- Une population de cellules hétérogène, ce qui devrait conduire à une loi Normale.
- Une cellule individuelle non uniforme, pouvant donner 5 réponses différentes sur les 5 indentations.

Afin de préciser le premier point, nous avons repris les résultats précédents en les présentant d'une façon différente. Pour chaque condition, une trentaine d'ostéoblastes avait été étudiée. A partir des 5 indentations réalisées sur chaque cellule, il est possible d'évaluer un module élastique moyen par cellule. Certaines courbes de forces n'étant pas exploitables, nous avons limité l'étude aux ostéoblastes présentant au moins 4 courbes de forces exploitables afin de maintenir une étude statistique correcte. Les distributions des modules élastiques moyens sont donnés sur la figure 3.6. Le module élastique moyen d'un ostéoblaste peut varier de 1 à une dizaine de kiloPascal. Ceci montre que les populations cellulaires sont effectivement hétérogènes, les cellules ne sont donc pas toutes dans le même état.

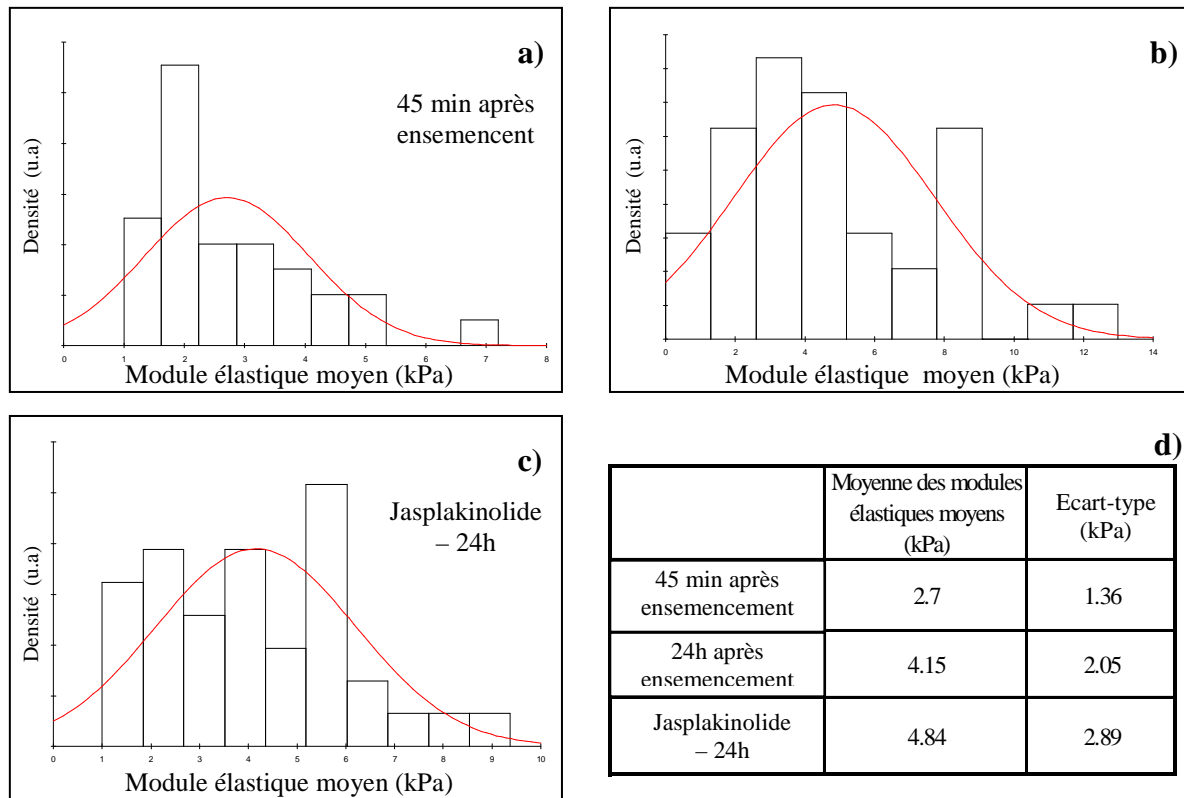


Fig. 3.6 : Distribution des modules élastiques moyens observés sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45 min (a), 24h (b) et des cellules traitées à la jasplakinolide (c). Récapitulatif des paramètres des distributions (d).

Pour apporter des compléments d'informations sur la deuxième hypothèse, nous avons évalué la dispersion du module élastique au sein même d'une cellule en utilisant les données acquises lors de l'étude précédente. La dispersion sur un ostéoblaste est déterminée par l'écart entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse de module mesuré sur l'ostéoblaste ($\text{dispersion} = E_{\text{max}} - E_{\text{min}}$). Les fonctions de répartition des dispersions de modules élastiques sur les centaines d'ostéoblastes étudiés sont représentées sur la figure 3.7. Celles-ci montrent une non uniformité de la réponse mécanique intracellulaire dépendante du lieu d'indentation. Une étude plus spécifique sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 24h confirme cette observation. Sur ces cellules, une dizaine d'indentations est réalisée aléatoirement. A partir de ces courbes de force, le module élastique est déterminé.

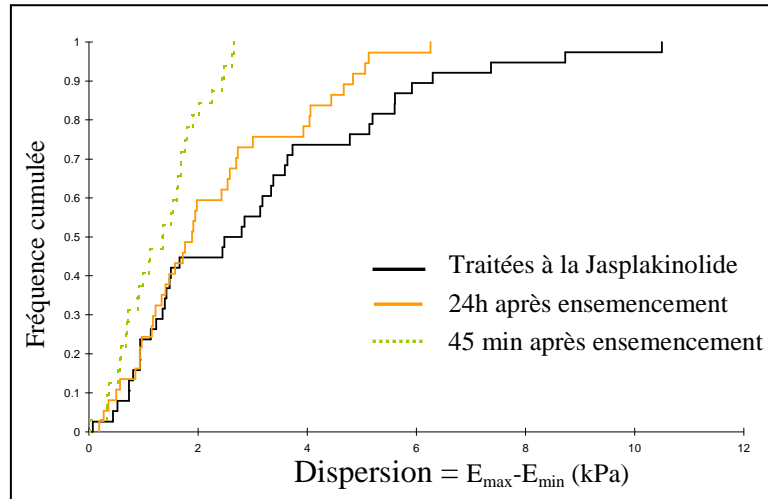


Fig. 3.7 : Fonction de répartition de la dispersion des modules élastiques sur les ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 45min et 24h avec ou sans traitement à la jasplakinolide

Sur la figure 3.8 sont montrés deux exemples d'ostéoblastes étudiés. Des croix symbolisent les lieux d'indentation. Pour ces deux exemples, bien que les modules élastiques moyens ainsi que les écart-types soient semblables, il est observé une forte variation de la valeur du module élastique en fonction de la zone indentée.

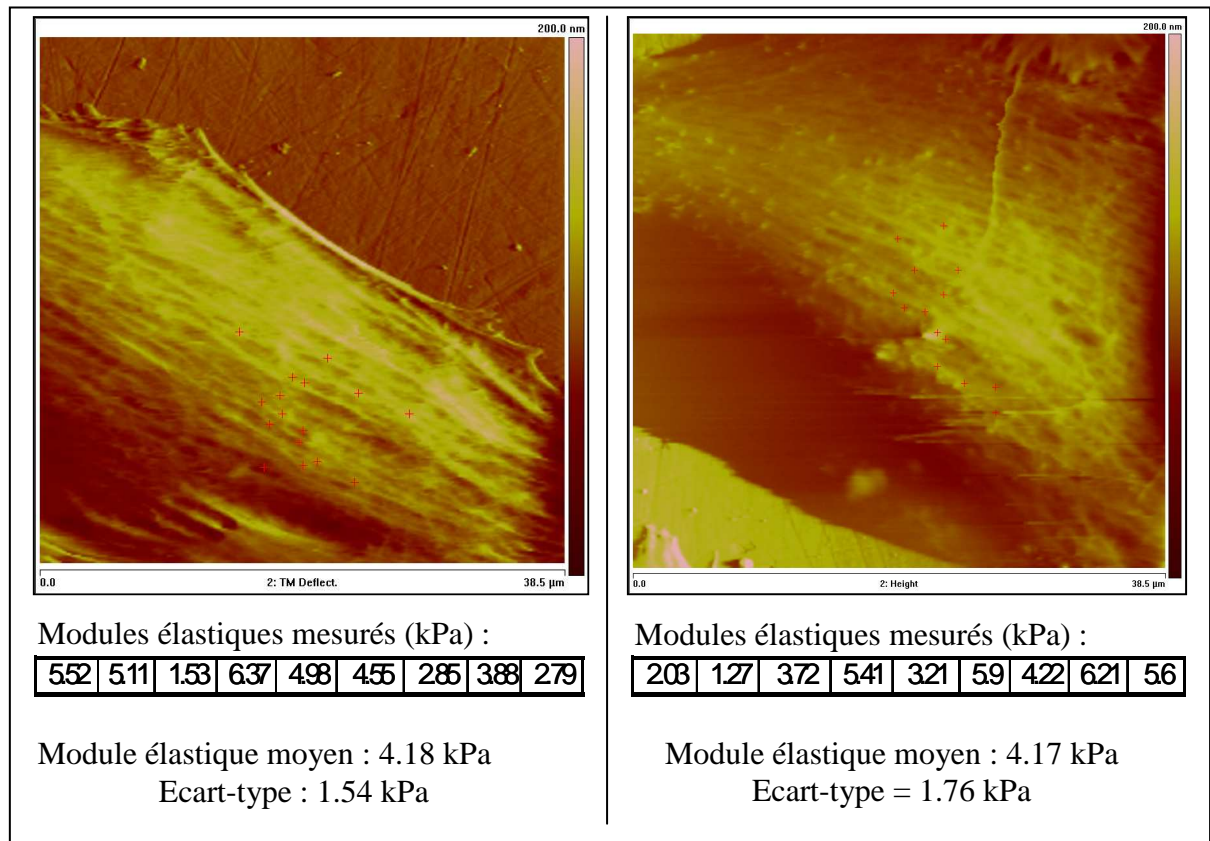


Fig. 3.8 : Images de deux ostéoblastes ensemencés sur TA6V depuis 24h ainsi que les modules élastiques associés.

D'autre part la figure 3.7 montre que la dispersion des modules élastiques est la plus élevée sur des ostéoblastes traités à la Jasplakinolide (jusqu'à plus de 10 kPa). La dispersion des modules élastiques provenant des ostéoblastes ensemencés depuis 24h est intermédiaire (6kPa maximum). Elle est faible sur les ostéoblastes ensemencés depuis 45 min (environ 2kPa au maximum). La non uniformité de la réponse mécanique intracellulaire est donc liée au développement du cytosquelette. La pointe AFM peut, soit indenter une fibre d'actine (rigide), soit indenter la membrane (peu rigide) (figure 3.9).

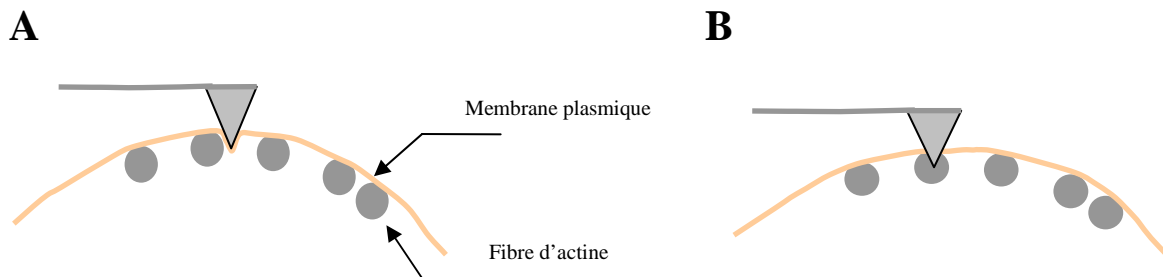


Fig. 3.9 : Indentation d'une pointe AFM dans la membrane (A) ou dans une fibre d'actine (B).

Pour de faibles forces d'indentation, la partie supérieure de la cellule est sollicitée. La structure sous membranaire est alors principalement responsable de la réponse mécanique de la cellule (figure 3.10A). C'est pourquoi la présence du cytosquelette a alors une très forte importance dans les mesures de rigidités.

A – Force d'indentation faible



B – Force d'indentation élevée

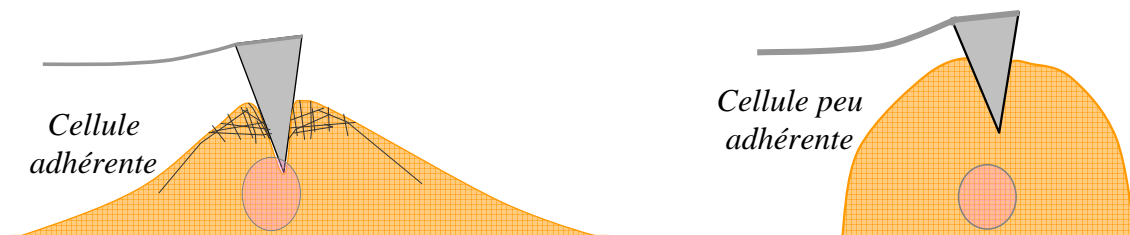


Fig. 3.10 : Indentations d'ostéoblastes peu adhérents et adhérents pour des forces d'indentation faibles (A) ou élevées (B). Schéma de principe.

En revanche, une force d'indentation élevée masque la non uniformité de la cellule (figure 3.10 B). La cellule est sollicitée beaucoup plus globalement, ce qui conduit à une homogénéisation des réponses. En conséquence, pour une force de 2.5 nN, seules les distributions provenant des deux types de cellules extrêmes (ensemencées depuis 45 min et traitées à la jasplakinolide) sont différenciables.

L'hypothèse d'une distribution de la réponse mécanique causée par la présence du cytosquelette d'actine a déjà été proposée par différents auteurs [DOM 00] [COS 06]. Domke a visualisé la surface et le cytosquelette sous membranaire d'ostéoblastes par microscopie de force atomique en mode contact [DOM 00]. Des courbes de force ont été enregistrées sur toute la surface de la cellule, la cartographie obtenue montre des différences d'élasticité entre 30 ou même jusqu'à 60 points différents de la cellule. De forts écarts de modules élastiques ont été constatés et ils ont été attribués à l'organisation intracellulaire sous-jacente (figure 3.11 A). Les modules élastiques les plus élevés correspondent aux fibres de stress. En utilisant le même type de méthode, Costa montra que les distributions des modules élastiques présentaient deux populations dès lors que les zones étudiées contenaient une fibre de stress ou une zone membranaire (figure 3.11 B). Il montra que des ostéoblastes traités à la cytochalasine B (drogue induisant la dépolymérisation des fibres d'actine) ne présentaient pas cette double population.

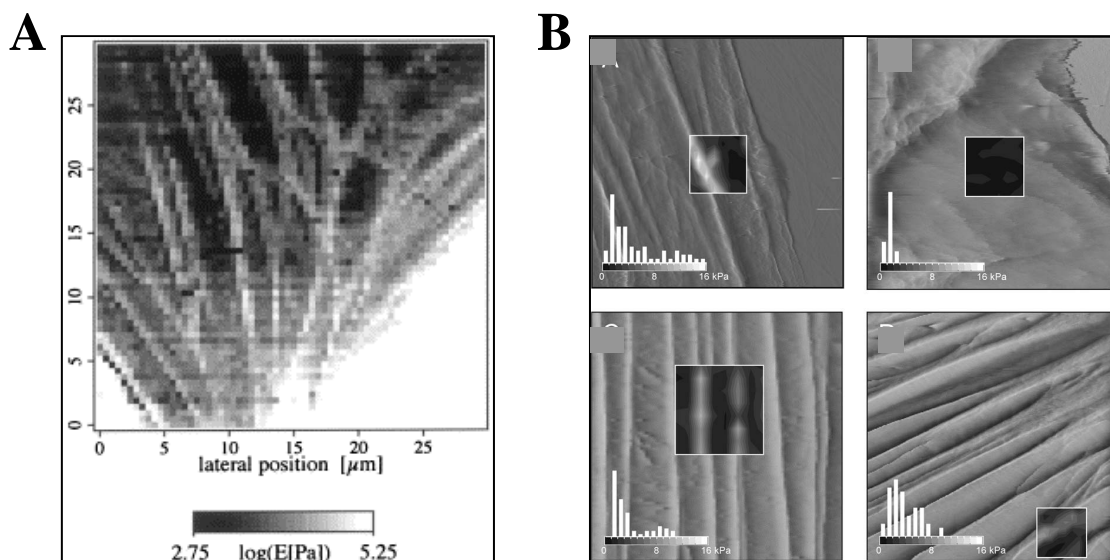


Fig. 3.11 : Variation du module élastique sur un ostéoblaste (A) [DOM 00]. Images cellulaires avec la distribution des modules élastiques associés (B) [COS 06].

3.4. Conclusion de l'étude

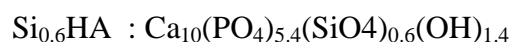
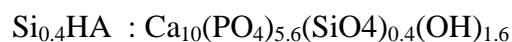
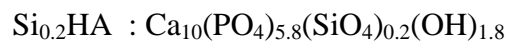
Cette étude a permis de valider la méthode d'évaluation de la rigidité cellulaire par indentation à l'aide d'une pointe AFM. Les modules élastiques les plus élevés ont été évalués sur les ostéoblastes présentant les profondeurs d'indentations les plus faibles. Ces cellules avaient été traitées préalablement à la Jasplakinolide, une drogue conduisant à la surpolymérisation des fibres d'actine. L'observation de la morphologie cellulaire confirme le rôle de cette drogue : les cellules traitées possèdent le réseau de fibres le plus développé.

Les valeurs des modules élastiques sur des ostéoblastes ensemencés depuis 24h sur TA6V (4kPa) sont cohérentes avec les valeurs trouvées dans la littérature [SIM 05] [COS 06]. En accord également avec la littérature, les ostéoblastes peu adhérents présentent les modules élastiques les plus faibles [BAC08]. L'évaluation de la rigidité cellulaire comme indicateur de l'adhésion cellulaire semble donc judicieux.

La variation du module élastique d'un point à l'autre de la cellule est d'autant plus élevée que le cytosquelette est développé. On en conclut donc que le cytosquelette est responsable de la non uniformité de la réponse mécanique des cellules. Le module élastique moyen des ostéoblastes ne peut pas refléter la non uniformité de la structure d'une cellule. La largeur et la dysymétrie de la distribution des modules élastiques complètent alors cette approche.

Chapitre 4 : Etude de la rigidité et de l'adhésion cellulaires sur les hydroxyapatites substituées

Dans ce chapitre nous présentons les résultats portant sur l'étude de la bioactivité de différents substrats apatitiques, notamment d'évaluer l'effet du silicium. Les pastilles d'hydroxyapatites silicatées testées ont les formules chimiques suivantes (Chap. 2) :

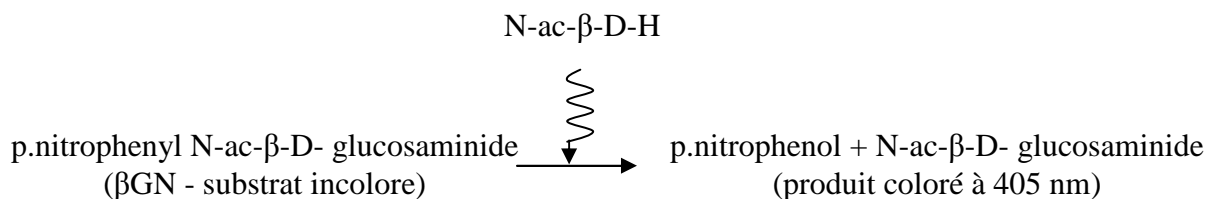


Dans un premier temps, des tests biologiques classiques ont été effectués : dynamique de la population cellulaire, observation du cytosquelette et des contacts focaux. Dans un deuxième temps, nos travaux ont porté sur l'évaluation de la rigidité cellulaire. En complément, l'évaluation de la rigidité d'ostéoblastes déposés sur des hydroxyapatites carbonatées permettra de conclure quant à l'influence de la composition chimique sur l'adhésion cellulaire. La formule chimique des apatites carbonatées notées $\text{C}_{0,25}\text{HA}$ est proche de celle-ci : $\text{Ca}_{9,35}(\text{PO}_4)_{5,35}(\text{CO}_3)_{0,65}(\text{OH})_{1,35}$

4.1. Dynamique de la population cellulaire

4.1.1. Principe

Pour évaluer la viabilité des cellules osseuses humaines MG 63ensemencées sur les substrats différents, nous avons mesuré le nombre de cellules vivantes présentes sur l'échantillon au cours du temps. Dans nos conditions (population nombreuse), pour avoir une détermination précise du nombre de cellules, nous avons opté pour une mesure de l'activité enzymatique de la N-acétyl- β -D-Hexosaminidase lysosomiale (N-ac- β -D-H). Cette enzyme ubiquitaire, présente dans de nombreux tissus est notamment impliquée dans la dégradation des constituants cellulaires glycosylés. Le para nitrophenyl N-acétyl- β -D-glucosaminide (β GN), substrat de la réaction, peut être utilisé pour déterminer son activité catalytique par technique spectrophotométrique. La dégradation de cette molécule, caractérisée par une augmentation de l'absorbance à 405 nm est directement liée à l'activité N-acétyl- β -D-Hexosaminidase, c'est à dire proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans les cultures. Une calibration était faite au préalable.



Cette technique a été adaptée à partir d'une étude précédente [PAL05] et le protocole a été mis au point de sorte que l'activité enzymatique soit proportionnelle au nombre de cellules. Nous avons suivi la cinétique entre 2 et 8 jours.

4.1.2. Protocole

Les cultures sont rincées avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) et incubées à 37°C en présence de 0.8 mL de la solution de substrat réactif. Cette dernière est composée du βGN de concentration 3.74 mmol.L^{-1} , dilué dans une solution tampon de citrate à 50 mmol.L^{-1} (pH = 5) et d'une solution de Triton à 0.25% (détergent de formule $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{C}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_9\text{OH}$ pour la perméabilisation des cellules). La réaction est arrêtée après 60 min par addition de 1 mL de tampon bloquant composé de glycine à 50 mmol.L^{-1} et d'EDTA à 5 mmol.L^{-1} à pH 10.4. Les mesures de densité optique sont effectuées à 405 nm par un spectrophotomètre (Thermo Electron Corporation Multiskan Spectrum / logiciel : scanIt RE for MSS 2.1).

4.1.3. Résultats

La figure 4.1 présente l'évolution du nombre d'ostéoblastes MG-63 vivants sur différents substrats (TA6V, HA et SixHA, $0.2 \leq x \leq 0.6$) en fonction du temps de culture. Le nombre de cellules vivantes sur les substrats augmente avec le temps de culture de 2 à 5 jours ; il est multiplié par 3 environ . Après 8 jours de culture, le nombre de cellules ne varie plus (environ $2500 \text{ cellules.mm}^{-2}$) par rapport au 5ème jour. A confluence, les cellules arrêtent de se multiplier, c'est l'inhibition de contact. La confluence, moment où les cellules entrent en contact, est donc atteinte après 5 jours de culture.

A 2 jours de culture, le nombre moyen d'ostéoblastes est d'environ $800 \text{ cellules.mm}^{-2}$ pour tous les matériaux. Le maximum de cellules apparaît pour le substrat $\text{Si}_{0.2}\text{HA}$ (aux alentours de 1000). Les résultats obtenus avec les substrats $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0.6}\text{HA}$ montrent que le

nombre de cellules est légèrement inférieur à cette valeur, mais aucune différence significative n'est observée entre les substrats.

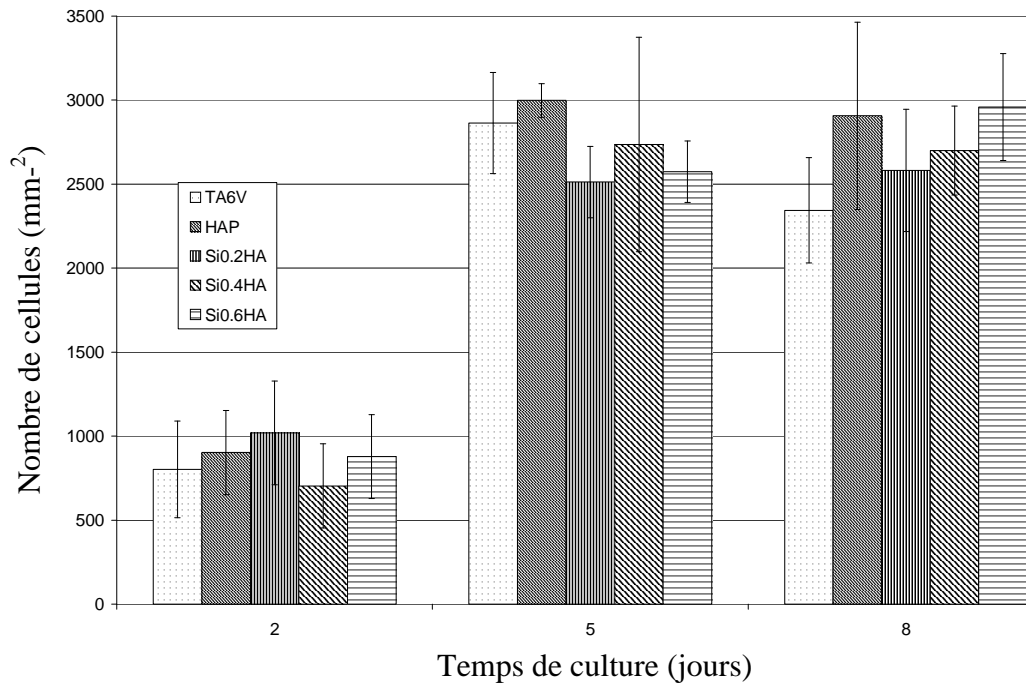


Fig. 4.1 : Evolution de la population cellulaire sur différents substrats en fonction du temps de culture

A 5 jours de culture, le nombre moyen de cellules est de 2700 cellules.mm⁻². Le maximum de cellules est atteint pour le substrat HA (environ 3000) et est significativement plus élevé que pour Si_{0.2}HA et Si_{0.6}HA. Il n'y a pas de relation entre le nombre de cellules vivantes et le taux de silicium dans les matériaux, puisque le nombre de cellules vivantes sur Si_{0.4}HA n'est pas significativement différent de celui sur HA.

Enfin à 8 jours de culture, malgré une légère tendance à l'augmentation du nombre de cellules avec le taux de silicium, aucune différence significative ne peut être observée entre les différentes apatites.

4.2. Etude par marquages fluorescents de l'adhésion des ostéoblastes sur les hydroxyapatites substituées

Deux protéines cellulaires ont été marquées par fluorescence ou par immunofluorescence : la paxilline et l'actine. Le marquage de la paxilline permet une observation directe des sites d'adhésion. La visualisation de l'actine, et en particulier de l'actineF, apportera une information indirecte de l'adhésion. En effet, il a été montré dans le

chapitre I que l'organisation du réseau d'actine est intimement lié à l'adhésion cellulaire. Les observations sont faites 24h après ensemencement.

4.2.1. Principe

L'observation de l'actine est effectuée par un marquage fluorescent à la phalloïdine-rhodamine. Cette dernière est une toxine provenant des amanites phalloïdes, ayant une grande affinité pour les filaments d'actine. Elle est couplée à un fluorochrome rouge qui est un dérivé de la rhodamine, le TRITC (Tetramethyl Rhodamine Iso Thio Cyanate). Simultanément, les noyaux des cellules sont visualisés grâce à l'utilisation d'un composé fluorochrome bleu marquant les acides nucléiques, le DAPI (4,6-diamido-2-phénylindole hydrochloride).

Le marquage immunofluorescent de la paxilline nécessite l'utilisation de deux anticorps, un primaire et un secondaire pour la révélation. L'anticorps primaire est un anticorps anti-paxilline. Il s'agit d'anticorps IgG (Immunoglobulines G) monoclonaux de souris. Après incubation et rinçage, on ajoute la solution d'anticorps secondaire dirigée contre les anticorps primaires, ce sont les anticorps secondaires. Ces derniers sont des anticorps anti-IgG de souris. Ces deux solutions sont couplées à un fluorochrome blanc afin de pouvoir visualiser leur présence en microscopie à fluorescence.

4.2.2. Protocole

- Marquage fluorescent de l'actine et du noyau

La solution réactive est préparée en diluant au dixième du DAPI à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SIGMA D9542-5MG) dans du PBS (SIGMA P3813, pH 7.4 ; 0.01 mol.L^{-1}) puis en rajoutant du sérum de veau fœtal dilué au centième et de la phalloïdine-rhodamine (Invitrogen - Molecular Probes - R415) diluée au cinquantième. Les cellules sont lavées dans du PBS puis fixées pendant 20 min à 4°C avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Après un second lavage au PBS, la perméabilisation des cellules est effectuée par addition de 0,1% de Triton dans du PBS pendant 4 min. A la suite de trois lavages successifs dans le PBS, 30 μL de la solution sont déposés par pastille. Chaque pastille est recouverte de parafilm pour homogénéiser la surface. En maintenant une atmosphère humide, les pastilles sont mises en incubation à 37°C pendant 30 min. A la suite d'un nouveau rinçage au PBS, une goutte de fluoprep (milieu de montage pour immunofluorescence – BioMérieux 75521) est déposée sur

les pastilles pour conserver la fluorescence. La préparation est recouverte d'une lamelle de microscope et laissée une nuit à température ambiante pour sa fixation avant l'observation au microscope à fluorescence (Leica Leitz DMRB).

- Marquage immunofluorescent de la paxilline

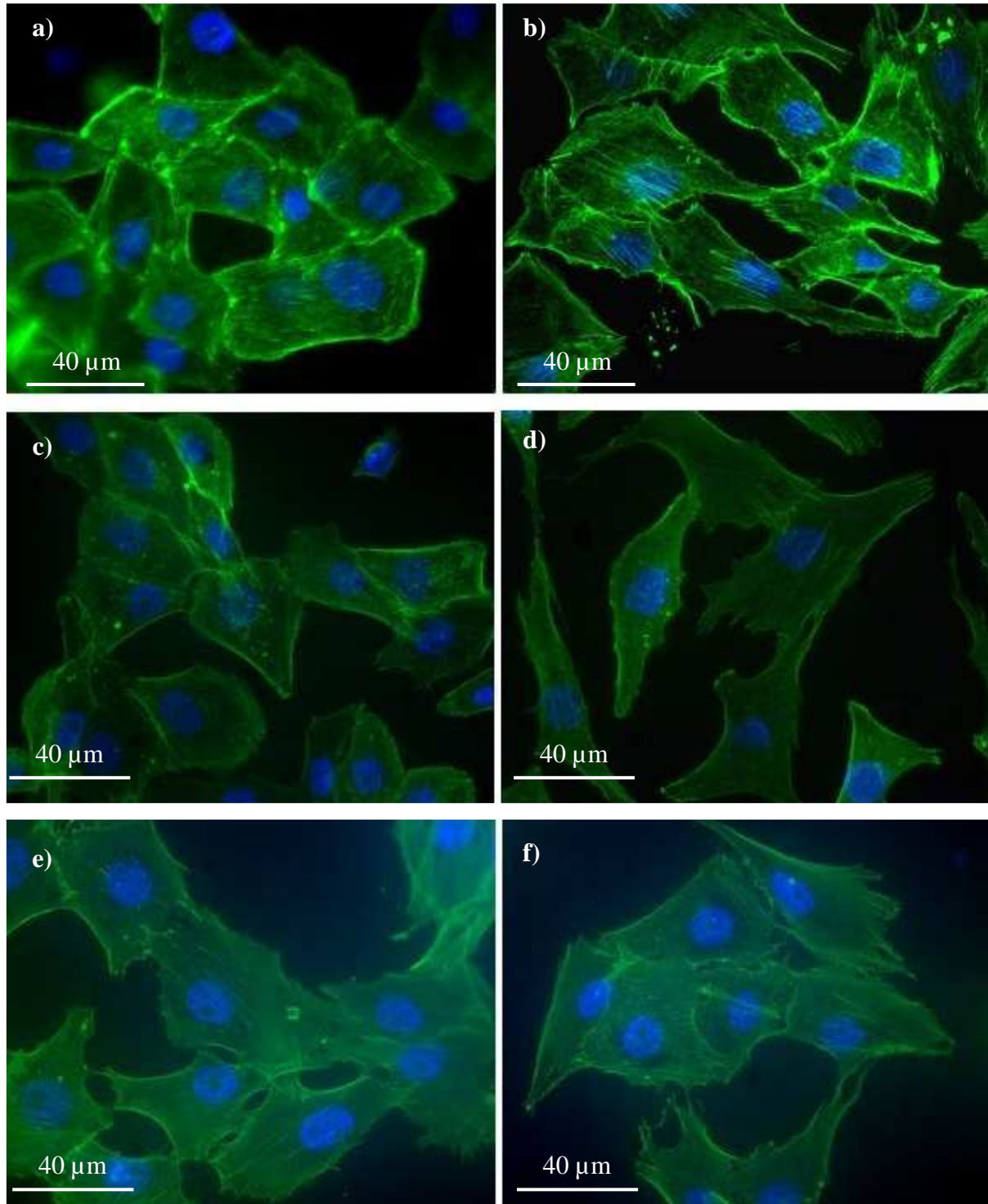
Deux solutions sont préparées. Dans la première solution, l'anticorps primaire est dilué au centième (Upstate – Anti-paxillin – 05-417) dans du PBS. Dans la seconde solution, l'anticorps secondaire est dilué au cinquantième (Molecular Probes - Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG – A11029) dans du PBS. Après rinçage des cultures au PBS, les cultures sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4 % pendant 15 min à 4°C. Elles sont ensuite rincées au PBS avant d'être perméabilisées pendant 3 min grâce à une solution de Triton à 0.1%. Un nouveau rinçage au PBS est effectué. Puis 30 µL de la solution d'anticorps primaire sont déposés sur chaque pastille et recouverts de parafilm (empêchant l'évaporation de la gouttelette de solution). Tout en maintenant une atmosphère humide, les pastilles sont incubées à 37°C pendant 1 h 30. Après rinçage au PBS, 30 µL de la solution d'anticorps secondaire sont déposés sur chaque pastille et recouverts de parafilm. L'opération d'incubation est ensuite renouvelée (à 37°C pendant 1 h 30). Après rinçage au PBS, une goutte de fluoprep ainsi qu'une lamelle de verre sont déposées sur les pastilles. Avant observation au microscope, les préparations sont laissées à température ambiante pendant une nuit.

4.2.3. Résultats

Sur la figure 4.2 sont visualisés des ostéoblastes ensemencés sur les différents substrats. Le marquage de l'actine est vert et celui des noyaux est bleu. La superposition des deux images permet d'avoir les deux informations simultanément.

La taille et la forme des noyaux sont sensiblement les mêmes sur le TA6V, l'hydroxyapatite et les hydroxyapatites silicatées. La taille des ostéoblastes et le cytosquelette d'actine sont quasi identiques quel que soit le matériau. Lorsqu'elles sont regroupées en amas, les cellules sont majoritairement de forme rectangulaire ou hexagonale. Elles ne présentent pas d'orientation préférentielle. Isolées, leur forme est beaucoup plus allongée, caractéristique d'un étalement beaucoup plus grand. La coloration verte ténue uniforme montre la présence d'actine sous forme libre (sous forme globulaire) dans l'ensemble de la cellule.

On observe des fibres de stress bien définies (segments verts d'intensité plus forte) au centre des cellules. Ces fibres semblent plus nombreuses, et leur coloration plus intense sur TA6V. En périphérie de la cellule est observée de l'actine corticale, responsable de la forme cellulaire.



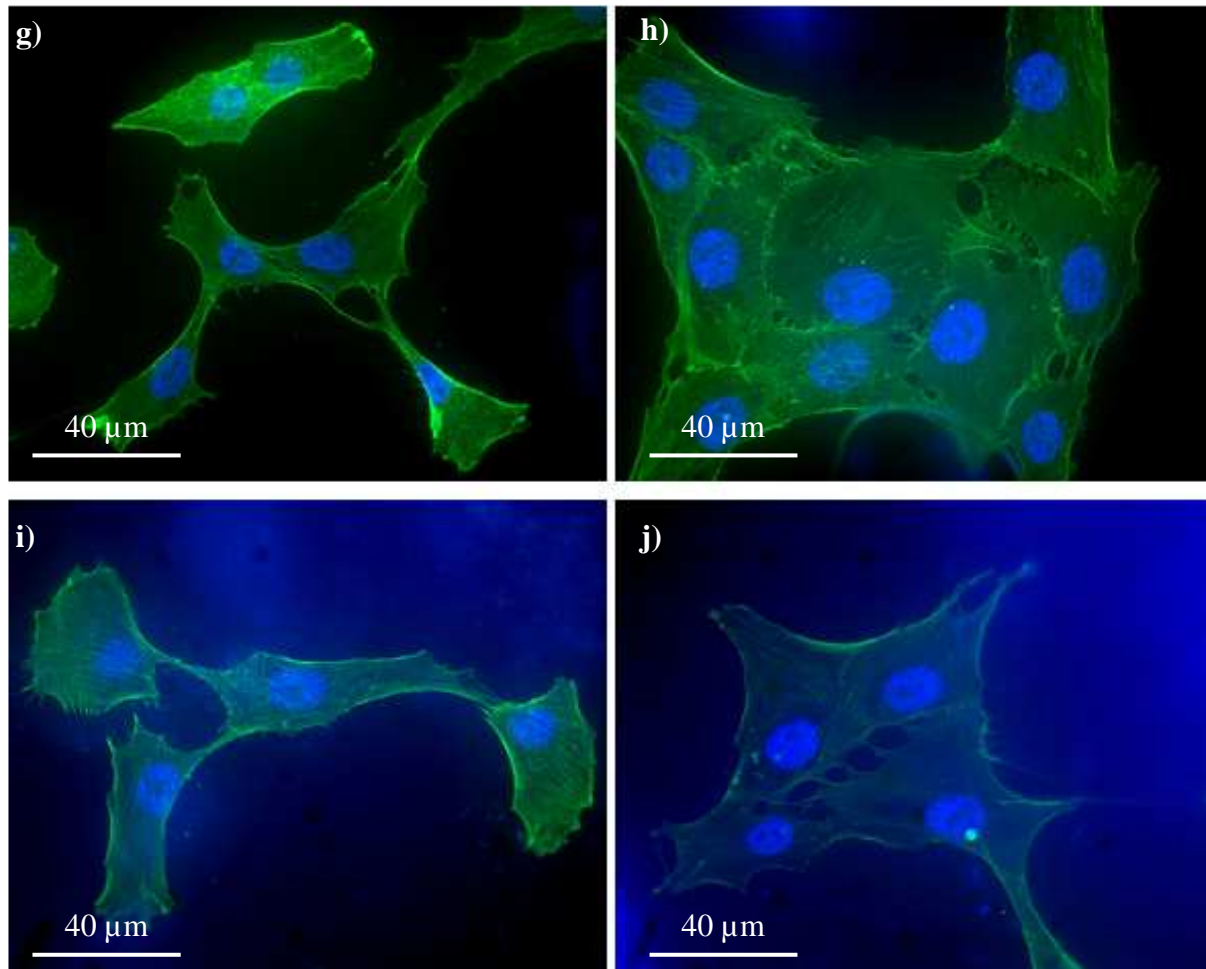
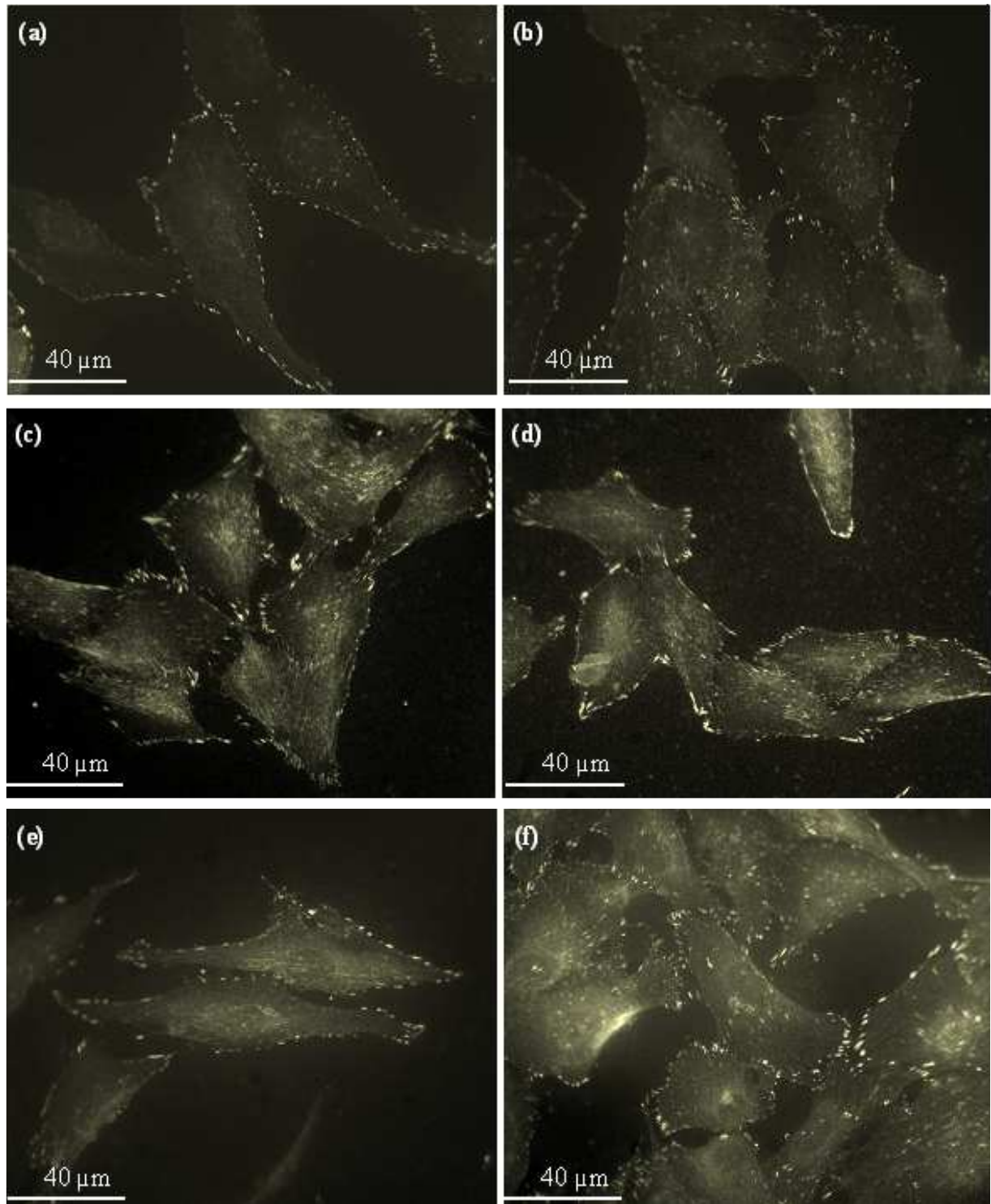


Fig. 4.2 : Images d'ostéoblastes MG-63 à 24 h déposés sur différents substrats (a-b) TA6V, (c-d) HA, (e-f) $\text{Si}_{0,2}\text{HA}$, (g-h) $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ et (i-j) $\text{Si}_{0,6}\text{HA}$ (marquage des noyaux en bleu et actine en vert)

La figure 4.3 montre la répartition de la paxilline dans les ostéoblastes ensemencés sur les différents substrats. Les contacts sont représentés par les zones blanches discontinues en corticale et au cœur des cellules, ces dernières étant moins intenses. L'adhésion cellulaire est donc majoritairement en corticale. La comparaison entre les substrats montre que la répartition et la densité des contacts focaux sont semblables pour des cellules sur TA6V ou sur les différentes hydroxyapatites.

L'observation de cellules en migration (cellules allongées), montre des zones de contacts focaux plus intenses à une extrémité. En effet, la migration cellulaire procède par une stabilisation de l'interaction cellule/substrat grâce à des regroupements coopératifs des récepteurs, en coordination avec la réorganisation du cytosquelette. Cependant, au cours de la migration, cette réorganisation se produit de manière asymétrique. Elle entraîne ainsi une extension cytoplasmique vers un côté de la cellule, le front de migration. La cellule envoie

une projection cytoplasmique vers l'avant, stabilise la prise par un regroupement des récepteurs, puis exerce une traction sur cette prise afin de se hisser vers elle, avant de libérer les prises arrières et de procéder à un nouveau cycle extension/glissement/rétraction.



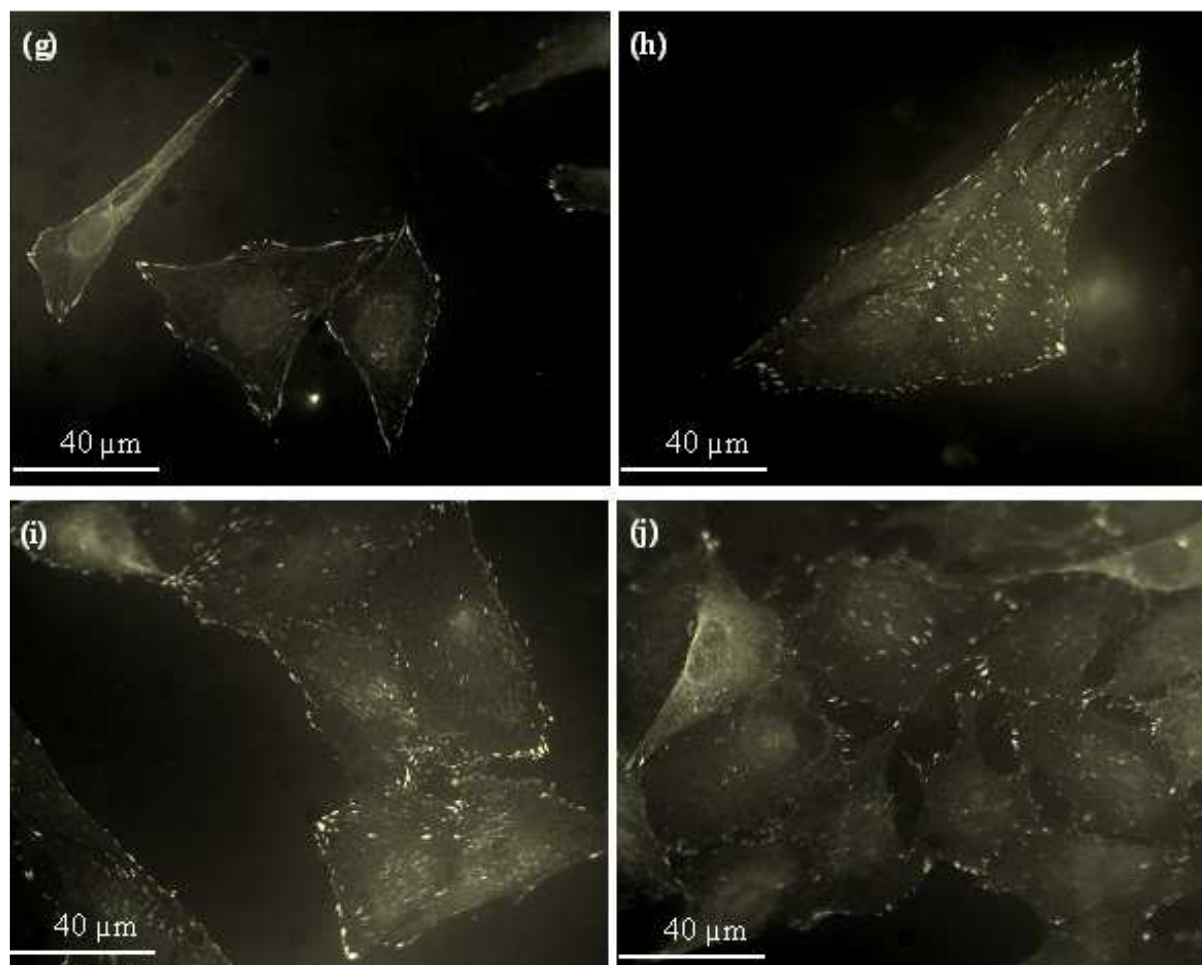


Fig. 4.3 : Images d'ostéoblastes MG-63 à 24 h déposés sur différents substrats (a-b) TA6V, (c-d) HA, (e-f) $\text{Si}_{0,2}\text{HA}$, (g-h) $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ et (i-j) $\text{Si}_{0,6}\text{HA}$ (marquage de la paxilline en blanc)

4.3. Détermination par indentation à l'aide d'une pointe AFM de la rigidité d'ostéoblastes adhérents sur les hydroxyapatites substituées

L'étude de la rigidité des ostéoblastes déposés sur les différentes apatites a été réalisée dans les conditions standard d'essais d'indentations AFM. Les cellules sont testées 24h après ensemencement, à température ambiante et sous pression atmosphérique. La force et la vitesse d'indentation sont fixées respectivement à 3nN et $0.1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Le volume de milieu dans lequel les expériences sont réalisées est de $100\mu\text{L}$.

Pour chaque type de matériau, une dizaine de pastilles a été utilisée, sur chaque pastille une ou plusieurs cellules ont été testées (suivant leur état), sur chaque cellule 5 indentations ont été faites. Parmi ces essais, tous n'ont pas été exploitables, cela conduit à approximativement une centaine de courbes de force.

4.3.1. Résultats

- Comparaison des rigidités cellulaires observées sur TA6V et Hydroxyapatite stœchiométrique

Sur la figure 4.4 sont regroupées les distributions des modules élastiques des cellules ensemencées sur TA6V et HA. Les modules élastiques moyens valent respectivement 4.16 et 3.08 kPa sur TA6V et HA. Ces deux distributions sont statistiquement différentes (tableau 4.1). La distribution des modules élastiques sur TA6V montre une plus forte proportion de modules élevés (figure 4.4c). Les ostéoblastes sont donc plus rigides sur TA6V que sur HA.

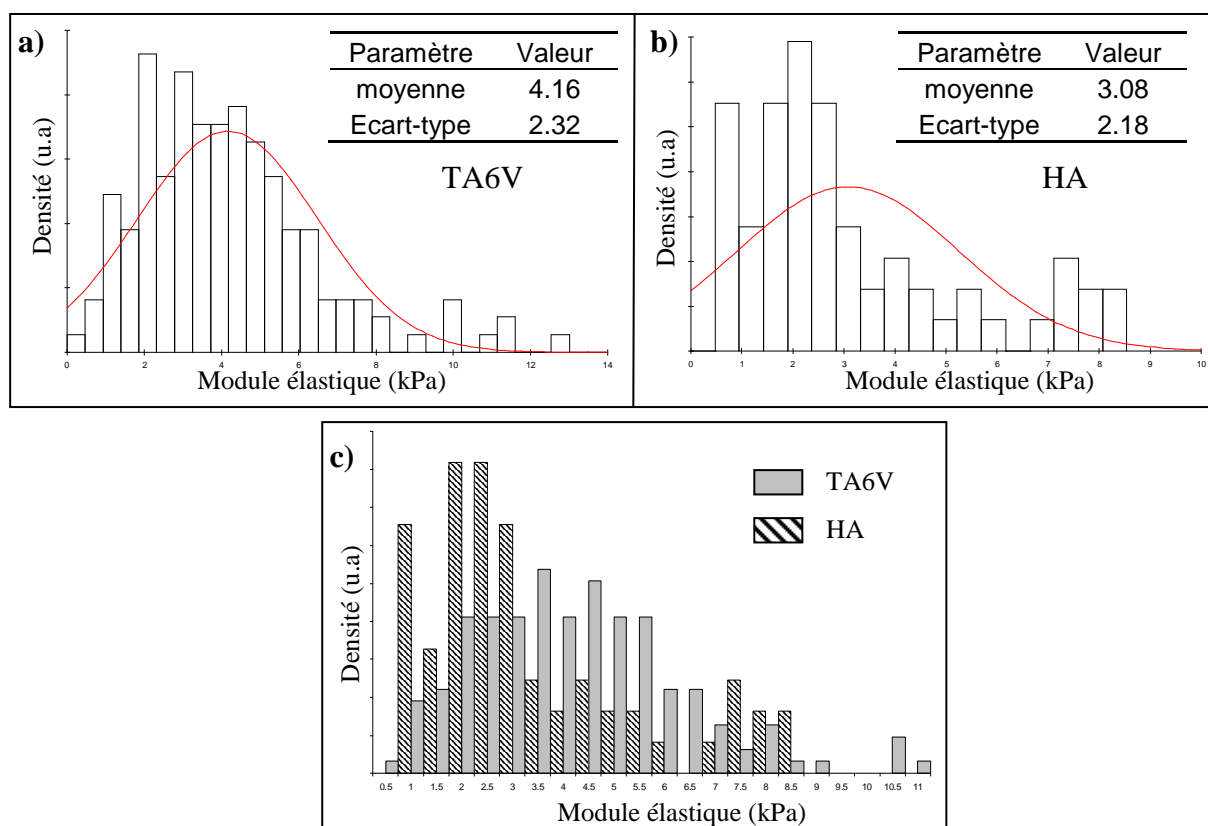


Fig. 4.4 : Distributions des modules élastiques obtenus sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V (a) et HA (b). Comparaison des deux distributions (c).

- Comparaison des rigidités cellulaires observées sur les hydroxyapatites silicatés

Sur la figure 4.5 sont représentées les distributions des modules élastiques des ostéoblastes ensemencés sur les trois hydroxyapatites silicatées. Les modules élastiques

moyens valent respectivement 2.85, 2.99 et 2.97 kPa sur Si_{0,2}HA, Si_{0,4}HA et Si_{0,6}HA. Ces trois distributions ne sont pas significativement différentes (tableau 4.1).

Comparaison des matériaux	HA vs TA6V	HA vs Si _{0,2} HA	HA vs Si _{0,4} HA	HA vs Si _{0,6} HA	Si _{0,2} HA vs Si _{0,4} HA	Si _{0,2} HA vs Si _{0,6} HA	Si _{0,4} HA vs Si _{0,6} HA	B-CHA vs Si _{0,4} HA	B-CHA vs HA
Test de Kolmogorov-Smirnov	< 0.0001	0.591	0.700	0.470	0.282	0.852	0.181	0.617	0.817

Tabl. 4.1 : Résultats du test de Kolmogorov-Smirnov pour la comparaison des différentes distributions. Les valeurs représentent la probabilité que les deux distributions soient identiques.

La comparaison visuelle des distributions des modules élastiques confirme cette observation : les résultats provenant des trois substrats sont apparemment très proches (figure 4.5d).

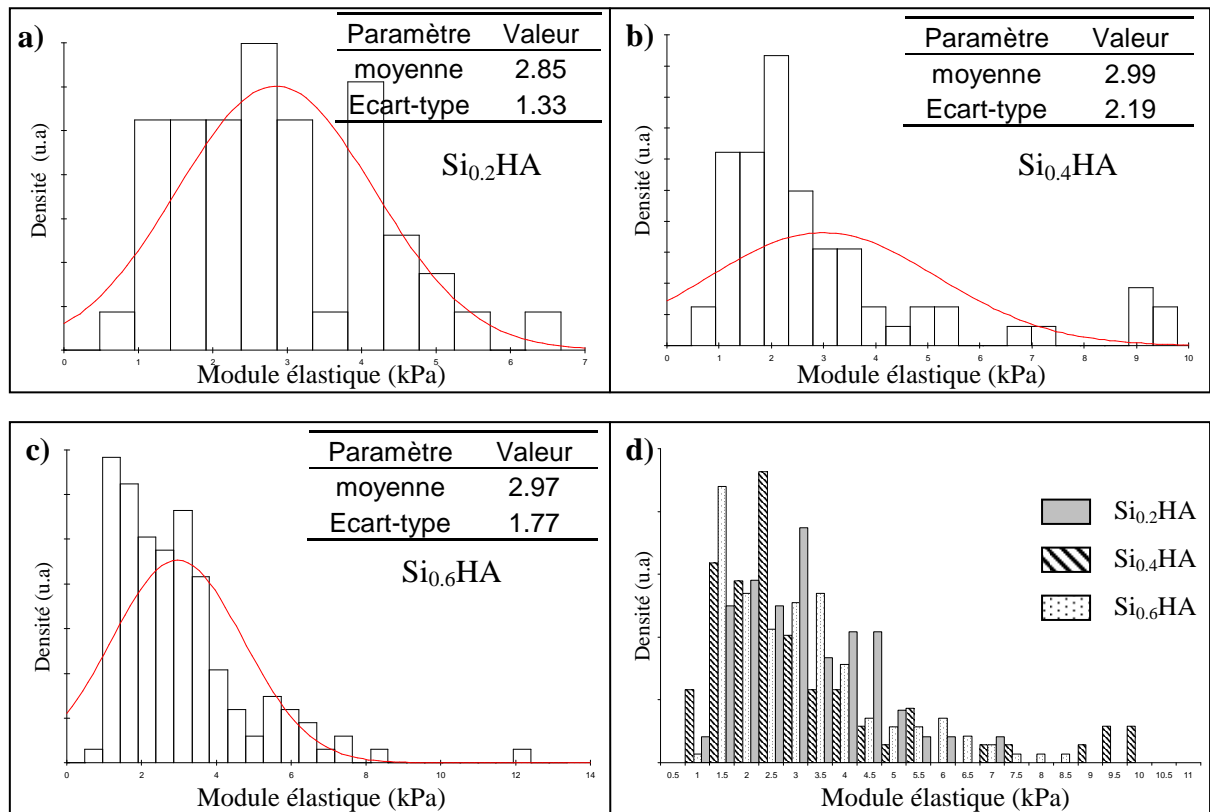


Fig. 4.5 : Distributions des modules élastiques obtenus sur des ostéoblastes ensemencés sur Si_{0,2}HA (a), Si_{0,4}HA (b) et Si_{0,6}HA (c). Comparaison des trois distributions (d).

- Comparaison des rigidités cellulaires observées sur hydroxyapatites silicatées et stœchiométrique.

Nous représentons sur trois figures d'une part les distributions des modules élastiques des ostéoblastes ensemencés sur les hydroxyapatites silicatées, et d'autre part la distribution des résultats obtenus sur l'hydroxyapatite stœchiométrique (figure 4.6 a, b et c). La comparaison de ces distributions montre une similitude de l'ensemble des résultats. Ceci est confirmé par l'étude statistique : les distributions obtenues sur les hydroxyapatites silicatées ne sont pas statistiquement différentes de celle obtenues sur l'hydroxyapatite stœchiométrique (tableau 4.1).

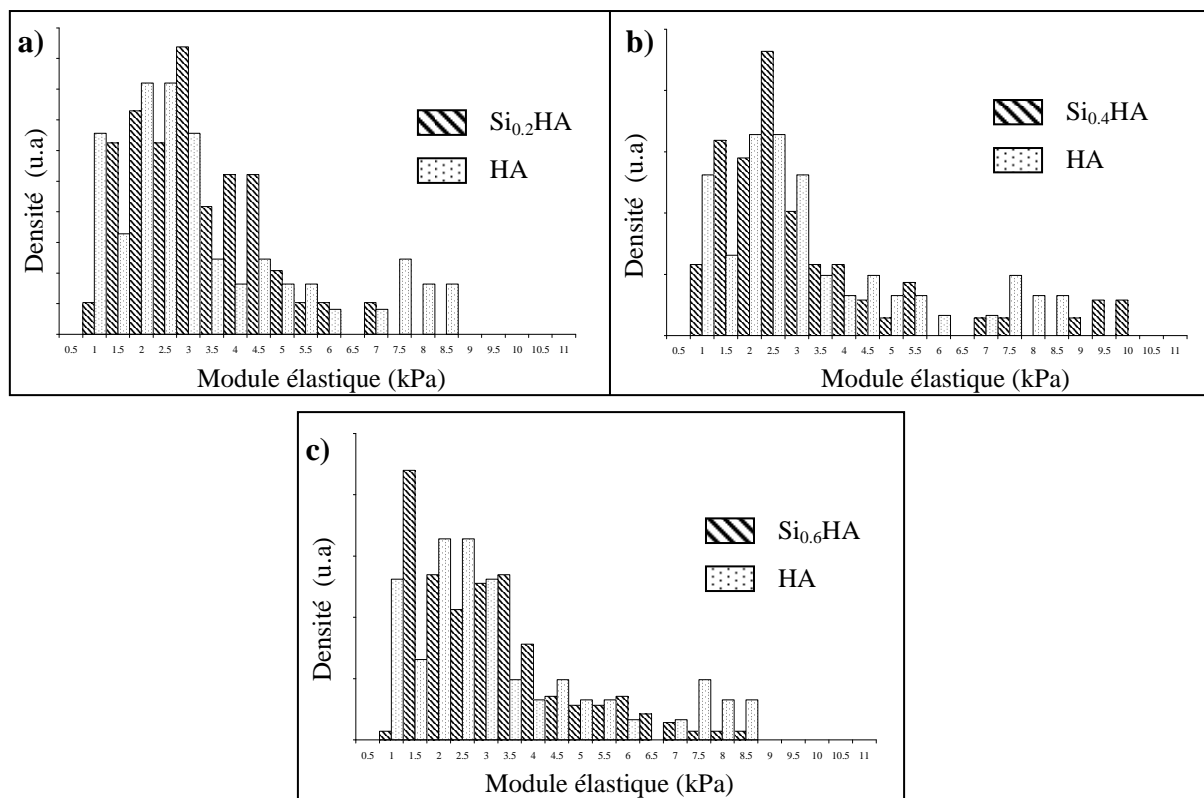


Fig. 4.6 : Distribution des modules élastiques obtenus sur des ostéoblastes ensemencés sur Si_{0,2}HA(a), Si_{0,4}HA(b) et Si_{0,6}HA(c)

- Comparaison des rigidités cellulaires observées sur hydroxyapatites silicatés, stœchiométrique et carbonatée

Sur la figure 4.7a est montrée la distribution des modules élastiques des ostéoblastes ensemencés sur l'hydroxyapatite carbonatée C_{0,25}HA. Le module élastique moyen est évalué à 3.53 kPa. Nous comparons la distribution des modules élastiques évalués sur C_{0,25}HA avec la

distribution obtenue sur les hydroxyapatites silicatées et stœchiométrique (figure 4.7 b). Pour ne pas surcharger la figure, seule la distribution obtenue sur $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ est représentée. Les trois distributions sont semblables. Résultat confirmé par l'étude statistique : les distributions ne sont pas significativement différentes (tableau 4.1). Plus généralement, les distributions obtenues sur les trois hydroxyapatites silicatées ne sont pas significativement différentes de la distribution obtenue sur l'hydroxyapatite carbonatée.

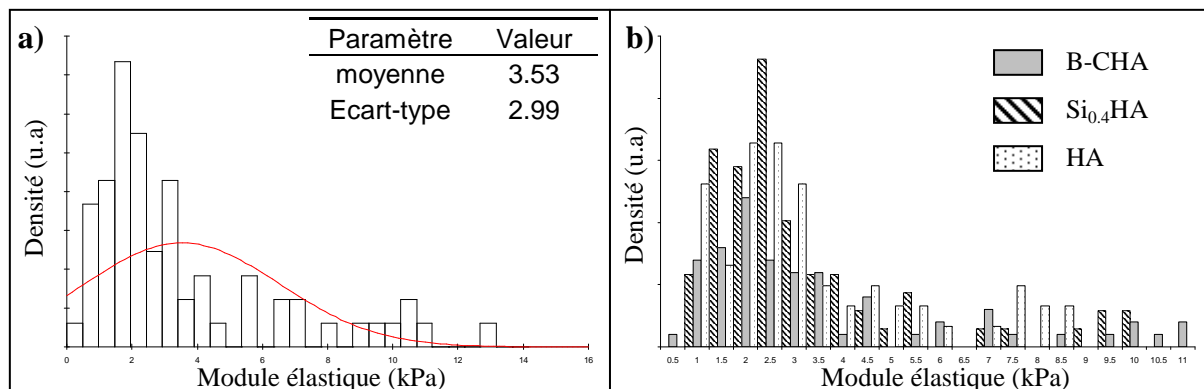


Fig. 4.7 : Distributions des modules élastiques obtenus sur des ostéoblastesensemencés sur B-CHA (a). Comparaison des distributions obtenues sur B-CHA, $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ et HA (b).

4.4. Discussion

L'augmentation du nombre de cellules en fonction du temps de culture indique que les matériaux ne sont pas toxiques pour les cellules ostéoblastiques MG-63. Ils sont donc tous biocompatibles. Ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées sur la culture de cellules sur substrats en apatite silicatée [KIM03-a] [HUA05] [THI07]. Cependant, quel que soit le temps de culture, le faible écart du nombre de cellules entre les différents matériaux ne permet pas réellement de les différencier. L'influence de la teneur en silicium sur la prolifération cellulaire n'a donc pu être mise en évidence. Finalement, les différentes observations effectuées par microscopie à fluorescence témoignent d'un bon étalement et d'une bonne accroche cellulaire quel que soit le substrat. La morphologie cellulaire ainsi que le réseau de fibre d'actine semblent en tout point semblables. La comparaison avec les cellulesensemencées sur TA6V montre que celles-ci présentent un réseau de fibres d'actine plus dense. De ce point de vue, il semble que l'adhésion cellulaire sur TA6V soit plus forte que sur les apatites.

La mesure de la rigidité cellulaire confirme cette observation. L'évaluation du module élastique des ostéoblastesensemencés sur hydroxyapatite stœchiométrique et TA6V montre

que les cellules sont significativement plus rigides sur TA6V. On en conclut ici que le réseau de fibres de stress est plus développé dans des cellulesensemencées sur TA6V par rapport aux cellulesensemencées sur apatites témoignent d'une meilleure adhésion.

Dans notre cas l'introduction d'ions silicates dans la structure apatitique ne semble pas avoir d'effet sur le comportement cellulaire. [KIM03-a] [HUA05] [VAL05] [THI06-c] [THI06-d] [XU07]. Les expériences menées sur les dépôts de titane recouverts d'apatite silicatée relatent une augmentation du nombre de cellules avec le taux de silicium [HUA05] [THI06-c] [THI06-d]. Le procédé d'élaboration de tels substrats fait intervenir un traitement thermique à 600°C pendant 3 h sous atmosphère eau-argon. Aucune donnée n'est avancée quant à la localisation du silicium. De plus, la température du traitement thermique étant faible, la cristallisation des dépôts n'est pas comparable à celle de matériaux massifs. En effet, les affinements Rietveld réalisés montrent que les valeurs sont très proches de celles obtenues dans ce présent travail pour les poudres brutes moins cristallisées que les poudres calcinées. Les expériences de cultures cellulaires sur des matériaux frittés par SPS montrent que le nombre de cellules augmente avec le taux de silicium à 4 jours [XU 07]. Cependant, si ces échantillons sont denses à plus de 95%, la caractérisation par diffraction des rayons X a montré la présence de phosphate tricalcique β . La proportion de cette phase augmente avec la teneur initiale en silicium. La forte résorbabilité de ce composé peut avoir des conséquences sur le taux de porosité du matériau après plusieurs jours de culture, et ainsi influencer la réponse des cellules.

En fait, seul Kim a réalisé des études de culture cellulaire sur des matériaux contenant 0.47 mol de silicium par mole d'apatite, denses à plus de 95% sans phase secondaire [KIM03-a]. La prolifération cellulaire sur l'HA et les apatites silicatées semblait identique de 3 à 24 h. Cependant, une seule teneur en silicium a été étudiée, ce qui ne permet pas de comparer leurs résultats avec les nôtres. Par contre, nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par Gibson [GIB99-b]. Les apatites silicatées ne sont pas toxiques vis à vis des cellules ostéosarcomes humaines (HOC), et l'activité des cellules est très similaire à l'activité de cellules cultivées sur l'HA. L'incorporation de silicium dans l'apatite n'affecte donc pas sa bioréactivité.

Une explication à toutes les différences visibles dans la littérature tient au fait que la préparation des matériaux n'est jamais identique. Rouahi montra récemment que l'adhésion

cellulaire était grandement liée à la microstructure du matériau [ROU 06]. Le but de son étude était d'évaluer la cinétique d'adhésion d'ostéoblastes sur des hydroxyapatites microporeuses ou denses, en comparaison à du titane pur poli. Elle montra que entre 30 min et 24h de culture, l'attachement cellulaire était supérieur sur l'hydroxyapatite microporeuse, bien que la prolifération cellulaire soit la plus faible après 4 jours. Les cellules déposées sur l'hydroxyapatite microporeuse présentaient plus de contacts focaux que les cellules déposées sur les autres matériaux après 4h d'ensemencement, mais en présentaient moins après 24h de culture. Elle montra aussi qu'après 24h de culture, l'expression de l'intégrine αv était significativement plus élevée sur le titane que sur l'hydroxyapatite non microporeuse. Une moins bonne adsorption du sérum présent dans le milieu de culture pourrait en être la raison. En effet, Matsuura montra une adsorption plus faible de la fibronectine sur l'hydroxyapatite dense en comparaison de celle observée sur le titane [Mat 00]. La fibronectine étant une protéine proadhésive, la différence d'adhésion cellulaire sur deux matériaux ne serait alors qu'une illustration de la différence de capacité de ces matériaux à adsorber des protéines du sérum de culture. L'adsorption est fonction de la chimie, mais aussi de l'état de surface du matériau et de son étendue. Des paramètres tels que la cristallinité ou la rugosité sont donc des facteurs influençant fortement le comportement cellulaire. L'influence de l'un de ces paramètres doit être étudiée en fixant les autres. Ceci n'est pas toujours le cas, c'est pourquoi les nombreux résultats provenant de la littérature sont très dispersés.

Enfin, Rouahi montra que l'expression du gène de la phosphatase alcaline (PAL) était plus faible sur une hydroxyapatite microporeuse que sur une hydroxyapatite non microporeuse après 4 jours de culture [ROU06]. Ceci prouve que la microstructure de cette hydroxyapatite n'était pas favorable à la différenciation cellulaire. Cette microstructure était pourtant celle qui favorisait la plus grande adhésion après 24h de culture. Une forte adhésion à court terme n'est pas donc synonyme d'un meilleur comportement cellulaire à long terme.

4.5. Conclusion

Ces premiers résultats ont permis de montrer que les différentes hydroxyapatites silicatées testées sont biocompatibles : il n'a été observé aucune toxicité de ces matériaux envers les cellules ostéoblastiques. Les ostéoblastes adhèrent et prolifèrent à leur surface.

Cependant, nos observations ne montrent pas de différence entre le comportement des ostéoblastes ensemencés sur les différentes hydroxyapatites denses : la dynamique des

populations cellulaires, le développement du réseau d'actine et la répartition des contacts focaux sont semblables sur tous les substrats apatitiques. La nature du substituant (silicium ou carbonate) ne joue aucun rôle dans l'adhésion cellulaire.

La comparaison du comportement cellulaire sur TA6V et sur les hydroxyapatites révèle que l'adhésion est plus forte sur le substrat métallique. Le réseau d'actine y est plus développé, et les modules élastiques les plus élevés. L'adhésion cellulaire est bien dépendante de la nature du matériau. Néanmoins, cette adhésion ne serait qu'une illustration de la capacité d'adsorption des protéines du sérum par ce matériau. Nous démontrons pour notre part que la chimie de surface des hydroxyapatites que nous avons testées n'influence pas l'adhésion cellulaire, et donc sans doute ne modifie pas leur capacité d'adsorption.

Chapitre 5 : Etude de la relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents

Nous utiliserons la microscopie à force atomique pour solliciter mécaniquement les cellules. Si cette technique est aujourd'hui classiquement utilisée en régime fréquentiel pour l'étude de la viscoélasticité, nous proposons une méthode originale pour l'évaluation de la relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents.

Les forces appliquées dans notre méthode sont plus élevées que celles utilisées en régime fréquentiel. De quelques centaines de pN en régime fréquentiel, la force appliquée passe ici à quelques nN. En effet, divers artefacts expérimentaux venant perturber les mesures à long terme, il a été nécessaire d'utiliser des forces élevées. Ceci sera justifié par la suite. La forte indentation qui découle de l'application de ces forces (supérieure à 20% de la hauteur cellulaire) implique alors une forte perturbation locale de la cellule. Notre objectif est de comprendre la réaction cellulaire, suite à cette perturbation, par l'étude de l'évolution de la force appliquée par la cellule à la pointe. La cellule va-t-elle réagir biologiquement, c'est-à-dire activer des cascades d'événements qui impliqueront une réorganisation de son cytosquelette, ou au contraire, va-t-elle se relaxer physiquement, d'une façon passive, comme pourrait le faire un matériau polymère classique. Un objectif complémentaire est d'identifier d'éventuelles différences de comportement entre des cellules déposées sur l'alliage TA6V et sur l'hydroxyapatite (HA).

5.1. Protocole expérimental

Le lieu de l'indentation est choisi dans la zone la plus élevée de cellule. Sous cette zone apicale se trouve le noyau cellulaire. La comparaison des courbes de relaxation des différentes cellules testées nécessite que la déformation appliquée à ces cellules soit la même. Cela sous entend de connaître à tout moment la distance entre la pointe et la cellule, ce qui n'est évidemment pas simple. En effet, avant l'indentation, la pointe est supposée en contact avec la cellule. Malheureusement, le contact dans le système de microscopie à force atomique est défini comme l'existence d'interactions suffisantes pour prétendre à l'imagerie. En aucun cas il ne s'agit d'un contact « physique » entre la pointe et une surface. Il semble difficile alors d'imposer une déformation précise à la cellule. La distance initiale entre la pointe et la cellule pouvant fluctuer, imposer un déplacement constant au micro-levier ne garantit pas une déformation cellulaire invariable. Le pilotage en force du micro-levier autorise par contre à imposer une force constante.

D'autre part, le microscope à force atomique que nous utilisons ne permet pas le suivi en continu de la force appliquée au micro-levier. En effet, celui-ci mesure la force lorsque la pointe est en mouvement. Nous ne pouvons donc avoir accès à la force que lors de la charge et de la décharge. Ne pouvant donc pas avoir accès en continu à la relaxation cellulaire, une méthode a été mise en place pour la mesurer de façon indirecte. Une fois la charge effectuée, la pointe est maintenue en position pendant une durée t après laquelle la décharge est amorcée. La mesure de l'écart entre la force appliquée à la pointe à la fin de la charge (début du palier) et au début de la décharge (fin du palier) évalue la relaxation cellulaire pour la durée t . Des indentations successives avec des maintiens de plus en plus long autorisent la reconstitution de la courbe de relaxation de la cellule étudiée.

Certaines contraintes liées aux conditions expérimentales ont orienté le choix du protocole d'indentation :

- Tout d'abord, les limites technologiques du microscope n'autorisent pas un palier d'une durée supérieure de 200 s. La relaxation cellulaire ne pourra pas être étudiée au delà de cette durée.
- L'essai étant réalisé dans le milieu de culture (100 μ L), à température et atmosphère ambiantes, la durée d'une étude a été limitée à 1h de façon à maintenir la vie cellulaire. Cette durée est d'une part classiquement acceptée par les chercheurs du domaine [ICA 07], et a d'autre part été vérifiée par nos soins. Nous avons pour cela suivi le changement de coloration du milieu de culture grâce à un indicateur de pH. Lorsque le milieu est à 37°C et au pH assurant la viabilité cellulaire, sa coloration est rosé ténu, alors qu'une diminution de température et une augmentation du pH le font virer vers un rouge foncé. Dépendante des conditions météorologiques, la coloration rose (synonyme de viabilité cellulaire) persiste rarement au delà de 90 minutes.

La prise en compte de ces différentes conditions ainsi que de la volonté de séparer les indentations de plusieurs minutes a conduit au protocole suivant :

- L'évaluation de la relaxation sera faite en **7 cycles de charge/décharge** pour des paliers de **2, 10, 20, 50, 100, 150 et 200 sec**, effectués au même endroit
- Le **temps de « repos »** entre chaque indentation est fixé à **5 minutes**.

Ce protocole permet l'évaluation de la relaxation cellulaire entre deux et deux cents secondes, et les 5 minutes d'attente entre sollicitations est un compromis qui laisse le temps au cytosquelette de se réorganiser, tout en permettant un nombre de points de mesure satisfaisant sur la durée totale. Le resserrement des points de mesures aux temps courts est justifié par la volonté d'observer le comportement passif de la cellule.

Enfin, la prise en compte du temps nécessaire à la mise en place de l'échantillon, et à la réalisation de l'image de la cellule (10-15 min), amène à un temps d'essai inférieur à 1 heure (figure 5.1).

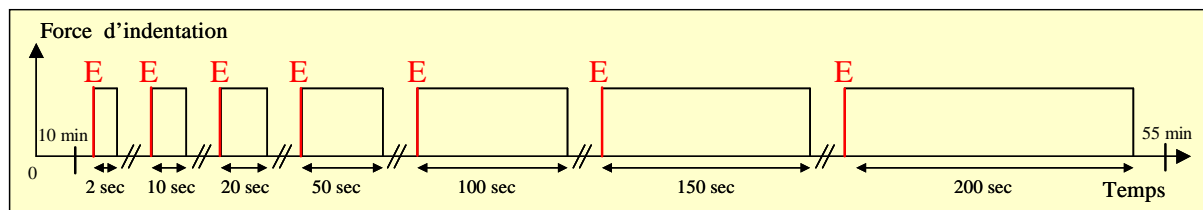


Fig. 5.1 : Protocole de mesure de la relaxation cellulaire. Entre les sollicitations, une attente 5 min est appliquée. A chaque indentation le module élastique de la cellule est déterminé.

Par ailleurs, la vie cellulaire est vérifiée au cours des expériences. Outre le changement de coloration du milieu de culture, le contrôle visuel au microscope de la morphologie cellulaire a été utilisé. En effet, la pratique nous a apporté la reconnaissance de cellules en « bon état ». Même si ce contrôle très qualitatif reste peu rigoureux, il s'avère très efficace. L'apparition d'une périphérie noire autour de cellules s'arrondissant était synonyme de cellules en mauvais état, et donc de non-expérimentation.

Il n'a pas encore été discuté de la valeur de la force d'indentation qui sera appliquée. L'objectif étant d'évaluer la relaxation cellulaire pour différentes déformations, un compromis à dû à nouveau être fait. D'une part, une force trop élevée pourrait amener à terme à la perforation de la membrane cellulaire. D'autre part, des indentations trop faibles seraient sujettes à erreur puisqu'une déviation du tube piezoélectrique a été observée au court du temps. La question serait alors de savoir si les mesures réalisées représentent bien la relaxation cellulaire, ou plutôt la déviation du tube piezoélectrique. Nous y reviendrons plus tard. Enfin, et pour aller dans le même sens, des forces faibles ne solliciteraient pas assez le cytosquelette pour espérer avoir des déformations représentatives des différents substrats utilisés. En définitive, **des forces d'indentations de 3nN et 2nN** ont été sélectionnées.

5.2. Acquisition des courbes de relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents

Sur la figure 5.2 est représenté l'ensemble des courbes typiquement obtenues lors d'un essai de relaxation pour une force d'indentation de 3 nN.

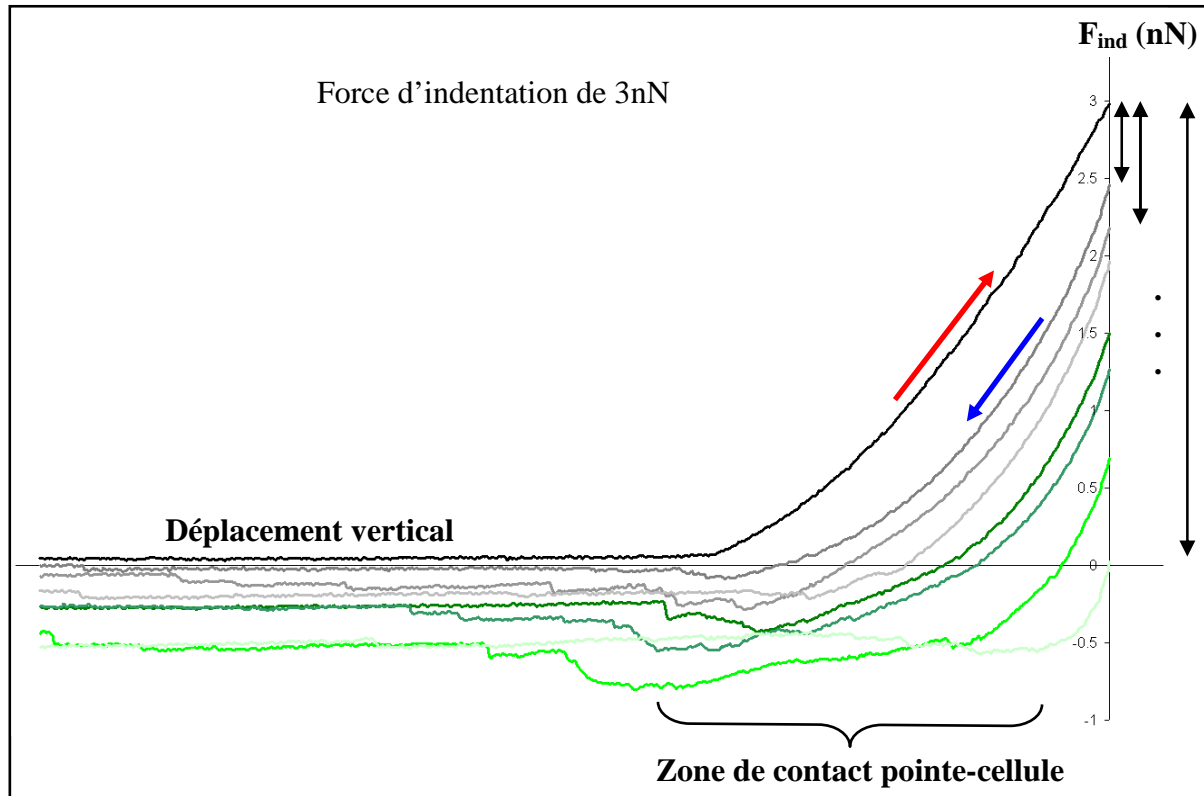


Fig. 5.2 : Courbes obtenues lors d'un essai de relaxation pour une force d'indentation de 3nN. Courbe de charge et les courbes de décharge suivant la durée de l'indentation. Diminution de la force appliquée avec le temps d'indentation.

On y retrouve une courbe de charge et les différentes courbes de décharges pour des temps de maintien de 2 à 200 secondes. Dans un souci de clarté, toutes les courbes de charge ne sont pas représentées. Celles-ci ne sont cependant pas parfaitement reproductibles pour des raisons discutées par la suite. Néanmoins, la force appliquée à la pointe en fin de charge est toujours la même, égale à la valeur de consigne (ici 3nN).

On observe bien une diminution substantielle de la force appliquée à la pointe en fonction du temps d'indentation. Dans le cas présent, la force appliquée après un maintien de 200 secondes est même quasiment nulle. Si l'on reporte en fonction du temps de palier la différence entre la force en fin de charge et la force appliquée au début de la décharge, la courbe présentée sur la figure 5.3 est obtenue. Nous appellerons relaxation le différentiel de

force entre la fin de la charge et le début de la décharge. On retrouve une évolution en loi puissance caractéristique des matériaux viscoélastiques. La relaxation évolue rapidement aux temps courts (60 s) et ne présente qu'une variation minimale aux temps long.

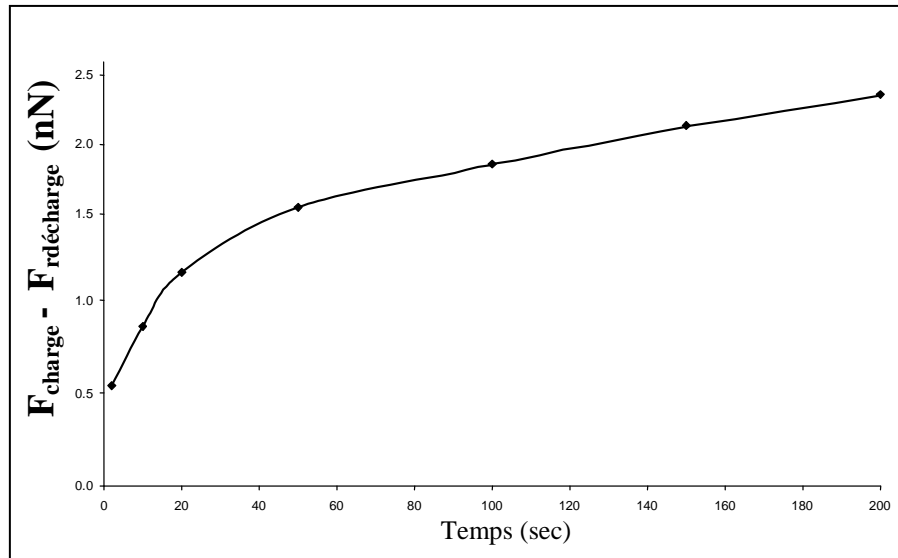


Fig. 5.3: Evolution du différentiel de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_{\text{charge}} - F_{\text{décharge}}$) en fonction de la durée du palier d'indentation.

Pour une force de 3nN, nous avons testé 25 échantillons de TA6V et 20 échantillons d'hydroxyapatite à raison de 1 cellule par échantillon. Pour les essais à 2 nN les quantités sont respectivement 18 et 16 échantillons. Les résultats moyens pour ces quatre conditions sont présentés sur la figure 5.4. La représentation de ces évolutions par une loi puissance conduit aux expressions du tableau 5.1:

	$F_{\text{consigne}} = 2 \text{ nN}$	$F_{\text{consigne}} = 3 \text{ nN}$
TA6V	$\Delta F = 0.419 \cdot t^{0.2466} \quad r^2 > 0.99$	$\Delta F = 0.425 \cdot t^{0.2824} \quad r^2 > 0.99$
HA	$\Delta F = 0.334 \cdot t^{0.2743} \quad r^2 > 0.99$	$\Delta F = 0.4418 \cdot t^{0.263} \quad r^2 > 0.99$

Tableau 5.1 : Expression de l'évolution de la relaxation en fonction du temps lors des essais de relaxation sur TA6V et Hydroxyapatite.

La diminution de la force appliquée à la pointe au cours des essais de relaxation montre une évolution en loi puissance en fonction du temps ($r^2 > 0.99$). Les exposants sont compris entre 0.24 et 0.28 suivant la force d'indentation et le type de support. Ces valeurs sont en accord avec celles observées dans la littérature lors des essais de fluage de cellules adhérentes.

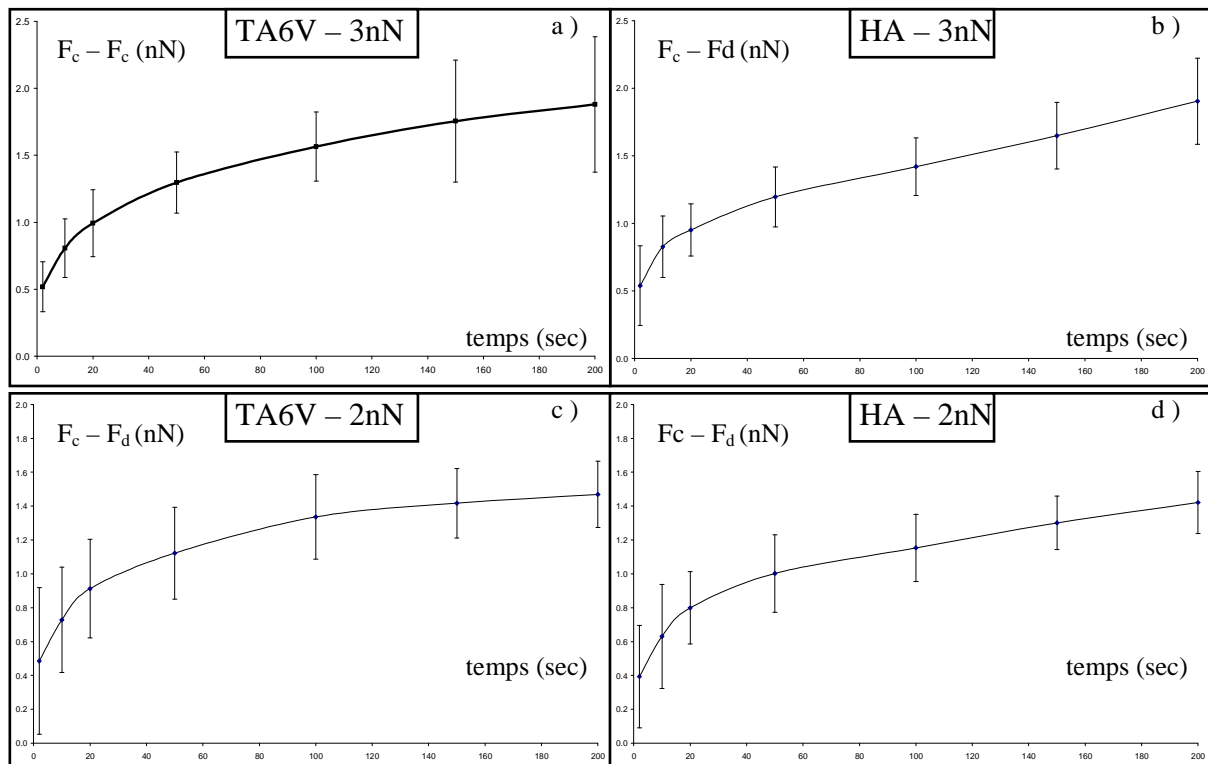


Fig. 5.4: Evolution du différentiel moyen de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_c - F_d$) en fonction du temps de palier lors des essais à 3 nN (a et b) et à 2 nN (c et d) pour des ostéoblastes ensemençés sur TA6V (a et c) et sur HA (b et d).

La comparaison des courbes de relaxation (figure 5.5) pour des cellules déposées sur TA6V et HA, soumises à la même force d'indentation, montre que le comportement cellulaire diffère suivant le substrat : ce différentiel de force est globalement plus élevé pour des cellules déposées sur TA6V. L'étude statistique des données tirées de l'ensemble des essais le confirme (tableau 5.2).

Un $t < 0.1$ dans le test de student montre pour des temps intermédiaires (20, 50, 100 et 150 secondes) que les cellules déposées sur TA6V se relaxent significativement plus que sur HA.

	2 sec	10 sec	20 sec	50 sec	100 sec	150 sec	200 sec
TA6Vvs HA 3nN	0.36	0.17	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.19	0.29
TA6Vvs HA 2nN	0.49	0.46	0.48	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.25

Tableau 5.2: Résultat du test de student pour la comparaison des résultats obtenus sur TA6V et HA.

Pour les temps courts (2, 10 sec) et pour le temps le plus long (200 sec), la différence entre les séries de données n'est pas significative. Il aurait été difficile d'apporter des conclusions fermes sur ce phénomène s'il n'avait été observé que pour une seule force d'indentation. Le retrouver pour les deux sollicitations le crédibilise

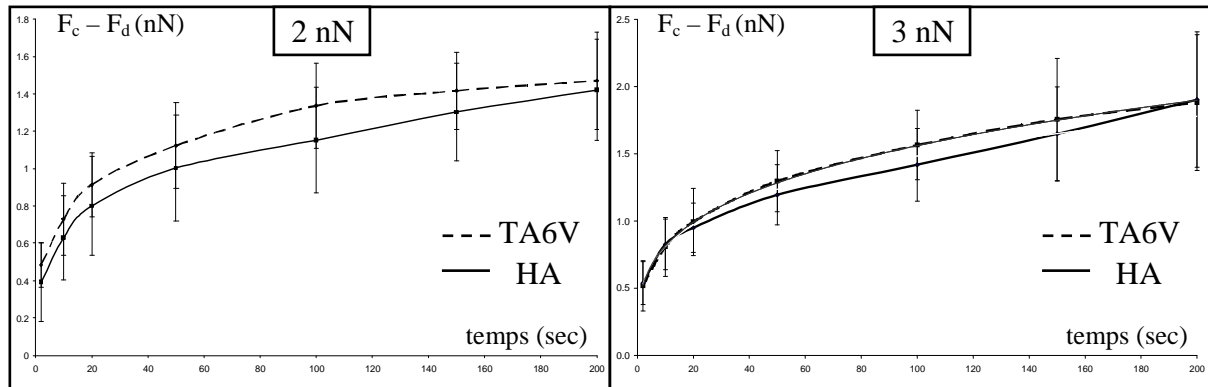


Fig. 5.5 : Evolution du différentiel moyen de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_c - F_d$) en fonction de la durée d'indentation lors des essais à 2 nN (a) et à 3 nN (b) pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V (pointillé) et sur HA (trait plein).

Attardons nous un peu plus en détails sur ce que représentent les mesures de différentiel de force au court du temps. En effet, même si la diminution de la force est a priori une image du comportement cellulaire, des artefacts dans l'acquisition des données viennent la perturber, et une étude plus aboutie de ceux-ci est nécessaire. On remarquera par exemple que la force appliquée à la pointe en fin de rétraction n'est pas nulle mais négative et augmente avec la durée de l'indentation. Une explication possible à ce phénomène : la dérive du tube piézoélectrique.

5.2.1. La déviation du tube piézoélectrique

Les systèmes piézoélectriques sont des systèmes actifs qui ne permettent pas d'effectuer des mesures véritablement statiques. Une dérive de ces systèmes est observée au court du temps [GOY 98]. Nos mesures sont donc clairement sujettes à ces dérives. La problématique a été de quantifier cette dérive afin de la soustraire à nos mesures.

Une méthode indirecte a due être employée : nous avons réalisé des essais d'indentation sur TA6V seul, dans les mêmes conditions expérimentales (température, atmosphère et milieu de culture) que lors des essais d'indentations cellulaires. Toute diminution de la force appliquée à la pointe durant l'essai pourra alors être attribuée à la

dérive du tube piézoélectrique. Les courbes obtenues lors de cinq essais sont présentés sur la figure 5.7a et la courbe moyenne sur la figure 5.7b.

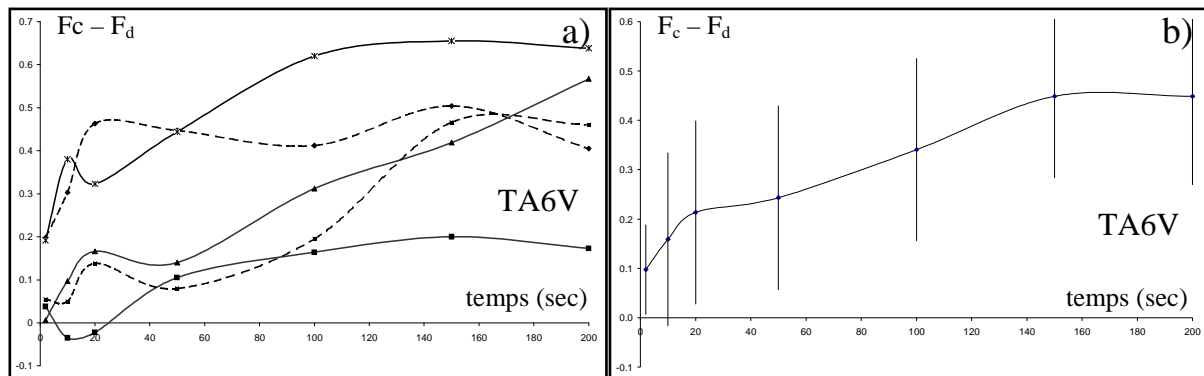


Fig. 5.7: Evolution du différentiel de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_c - F_d$) en fonction de la durée d'indentation lors de 5 essais à 3 nN sur TA6V **a)** et la courbe moyenne obtenue à partir de ces 5 essais **b)**.

Contrairement à ce que nous attendions, il apparaît que la diminution de la force appliquée à la pointe au court du temps n'est pas identique suivant les essais. La dérive n'est pas reproductible. Toujours est-il que la dérive n'excède pas 0.7nN, ce qui est très clairement inférieur au différentiel mesuré lors des essais sur cellule. La représentation de l'évolution du différentiel de force auquel a été soustraite la dérive moyenne du tube piézoélectrique le confirme (figure 5.8).

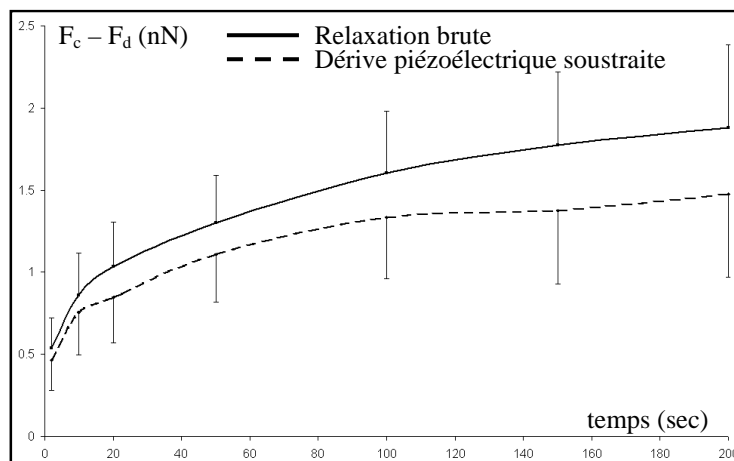


Fig. 5.8: Différentiel moyen de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_c - F_d$) en fonction de la durée d'indentation lors des essais à 3 nN pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V. En pointillé la courbe moyenne obtenue après soustraction de la dérive piézoélectrique au cours des essais.

La non-reproductibilité de la dérive ne permet pas de l'intégrer aux résultats de relaxation. Elle est non négligeable, mais difficile à quantifier.

Suite aux résultats obtenus sur cet artefact expérimental, il a été décidé de ne rien décider... Ne pouvant pas quantifier la dérive du piézoélectrique, il est impossible de soustraire une incertitude théorique de mesure. Par prudence, nous resterons dans des gammes de sollicitations impliquant des déformations significativement plus élevées que la dérive du tube piézoélectrique. C'est le cas pour des forces d'indentations de 2 et 3 nN. La figure 5.9, montre clairement que lors d'essais de relaxation avec une force d'indentation faible de 0.5 nN sur des ostéoblastesensemencés sur TA6V (13 cellules), la différentiation entre la dérive du tube piézoélectrique et la relaxation cellulaire est impossible. La similitude des deux courbes est d'ailleurs troublante et sous entend que, pour des efforts aussi faibles, la relaxation cellulaire est négligeable devant la dérive du tube piézoélectrique.

Le nombre de cellules testées étant assez élevé, nous gageons que les fluctuations des erreurs de mesures s'équilibrent finalement, et autorisent la comparaison des courbes de relaxation cellulaire.

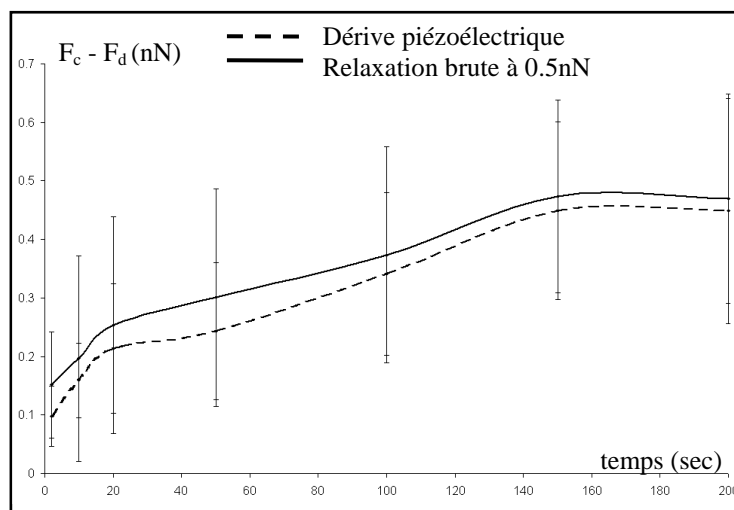


Fig. 5.9: Différentiel moyen de force entre la fin de la charge et le début de la décharge ($F_c - F_d$) en fonction de la durée d'indentation lors des essais à 0.5 nN pour des ostéoblastesensemencés sur TA6V, courbe moyenne de la dérive du tube piézoélectrique au cours des essais.

5.2.2. Conclusion

La réalisation d'une vingtaine d'essais de relaxation pour chaque couple force-substrat permet d'obtenir des comportements moyens assez représentatifs.

L'utilisation de la méthode proposée pour évaluer la viscoélasticité cellulaire apporte des résultats convaincants puisque, comme décrit dans la littérature (§1.2), une relaxation en loi puissance peut être observée. Les exposants, compris entre 0.24 et 0.28 suivant les

conditions, sont du même ordre que ceux observés dans la littérature sur différents types cellulaires. Nous confirmons donc que notre méthode est adaptée pour la mesure de la relaxation viscoélastique cellulaire.

Nous avons la volonté de discriminer le comportement cellulaire suivant l'intensité de la sollicitation mécanique et la nature du substrat de culture. Cela est difficilement réalisable avec les résultats présentés. Même si il semble que pour des temps de relaxation compris entre 20 et 150 secondes, les comportements puissent être différents, un approfondissement s'avère nécessaire. En effet, pour les mêmes conditions expérimentales, nous observons une forte dispersion des courbes de relaxation.

Deux causes possible à cela :

- La relaxation est différente suivant le lieu d'indentation : cytosquelette, membrane ou mixte.
- Pour un temps de culture identique, les cellules ne sont pas toutes au même stade de développement. Elles peuvent être rigides ou souples.
- Une rigidification ou un assouplissement peut s'opérer au cours des indentations successives d'une même cellule. L'évolution observée de la courbe de charge entre 2 indentations laisse supposer une évolution du comportement mécanique de la cellule après n indentation successives.

5.3. Influence du lieu d'indentation sur la relaxation viscoélastique d'ostéoblastes adhérents.

Nous l'avons vu lors de l'étude de la rigidité d'ostéoblastes adhérents sur les différents substrats apatitiques (§4.3), la variabilité des modules élastiques est non seulement forte entre les cellules testées, mais est aussi très importante selon le lieu d'indentation sur une même cellule. Nous avons montré que la non uniformité intracellulaire provenait de la présence ou non des fibres d'actine sous le lieu de l'indentation. Après indentation, il peut donc être observé la relaxation soit des fibres d'actine, soit d'une zone de la membrane où les fibres d'actine ont une influence, soit de la membrane seule. Ces trois cas se manifestant respectivement par une rigidité élevée, moyenne et faible. Nous avons discriminé les courbes de relaxation avec comme seul critère le lieu d'indentation. Pour faciliter la lisibilité, nous appellerons « cytosquelette » le cytosquelette d'actine.

Pour choisir les bornes de rigidité de ces trois classes (membrane seule, membrane sous influence du cytosquelette et cytosquelette), nous nous sommes aidés des travaux de Costa [COS 06]. Dans son étude, il montra que les cellules endothéliales adhérentes présentaient une non uniformité mécanique qui pouvait être modélisée par une double population du module élastique : 1.5 kPa pour la membrane seule, et 5 kPa pour les fibres d'actine. A partir de ces valeurs nous avons défini les classes de module élastique suivantes :

- **< 2 kPa** : indentation de la membrane seule.
- **2 → 4.5 kPa** : indentation de la membrane sous influence du cytosquelette.
- **> 4.5 kPa** : indentation du cytosquelette.

Ces classes sont représentées sur la distribution des rigidités des cellules déposées sur TA6V et HA (figure 5.10). Elles montrent une probabilité forte d'indenter les cellules dans le groupe « moyen », là où l'influence du cytosquelette et de la membrane sont difficilement dissociables (que nous appellerons indentations *mixtes*).

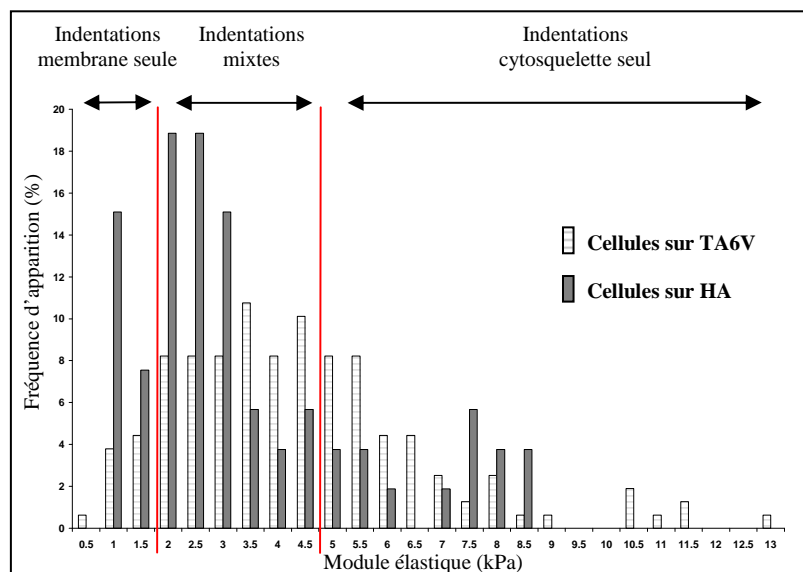


Fig. 5.10 : Distribution des modules élastiques pour des ostéoblastes ensemencés sur HA et TA6V et représentation des limites associées aux trois types d'indentations : membrane seule, mixte et cytosquelette seul.

5.3.1. Influence du lieu d'indentation sans distinction du substrat

Dans un premier temps, nous avons mis en commun toutes les courbes de relaxation réalisées sur des cellules déposées sur TA6V et HA. Pour les deux forces d'indentations (2nN

et 3nN), nous dissocions alors les indentations de la membrane, mixte et du cytosquelette. Nous évaluons les courbes de relaxation moyenne pour chaque catégorie et les représentons sur la figure 5.11. Dans un souci de clarté, nous ne représentons pas les écarts type sur ces courbes. Ceux-ci étant élevés (jusqu'à plus de 35% du différentiel de force), ils ne nous permettent pas d'observer de différences significatives entre les trois types d'indentations. De ce point de vue, il semble que la relaxation cellulaire ne soit pas dépendante du lieu d'indentation. Un stimulus mécanique appliqué localement à la cellule impliquerait donc une réaction globale de cette dernière.

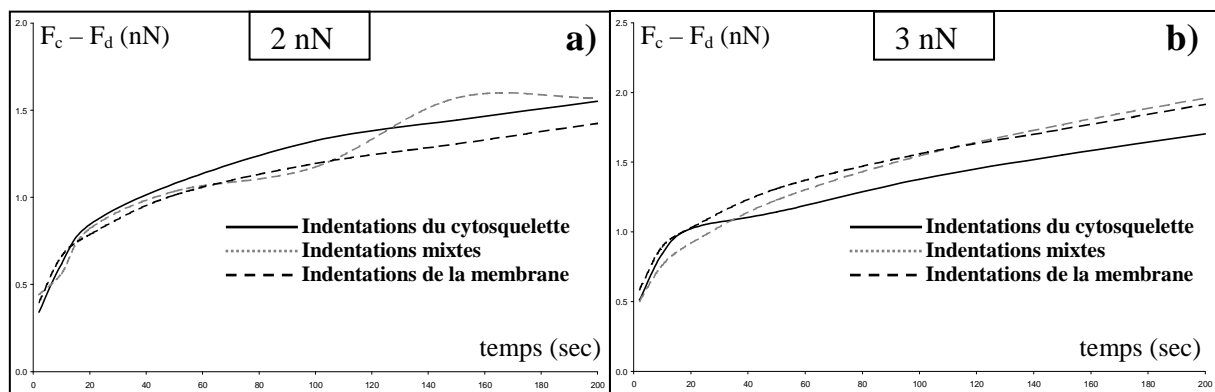


Fig. 5.11 : Courbes de relaxation moyenne pour des indentations de la membrane, mixte et du cytosquelette pour des forces d'indentations de 2nN (a) et de 3nN (b).

Afin de préciser cette hypothèse, nous avons reproduit cette étude mais en dissociant les substrats. En effet, les relaxations cellulaires obtenues sur TA6V et HA sont apparues différentes. Cette variation intrinsèque des relaxations contribue considérablement aux forts écarts types que nous observons lors de la mise en commun de toutes les courbes de relaxation. Distinguer les relaxations cellulaires vis-à-vis du substrat était donc nécessaire.

5.3.2. Influence du lieu d'indentation avec distinction du substrat

Pour chaque force d'indentation, nous évaluons les relaxations du cytosquelette, mixte et de la membrane obtenues sur chaque matériau.

5.3.2.1. Force d'indentation de 2nN

Sur la figure 5.12 est représentée l'évolution des courbes de relaxation d'ostéoblastes ensemencés sur TA6V d'une part, et HA d'autre part pour une force d'indentation de 2nN.

Comme pour les courbes de relaxation tous substrats confondus, nous ne retrouvons pas de différences significatives entre les relaxations du cytosquelette, mixtes et de la membrane. Nous observons que les courbes de relaxation mixtes ne suivent pas une évolution classique, de type loi puissance, mais une évolution irrégulière difficilement exploitable.

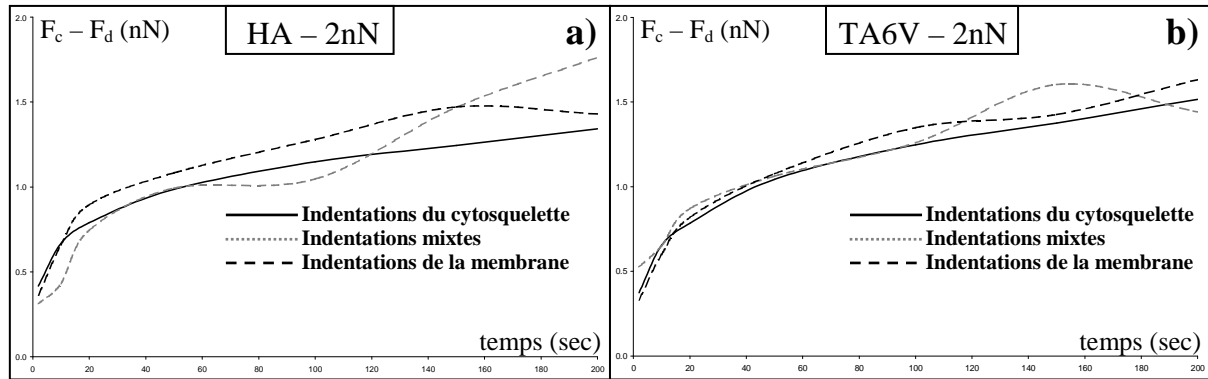


Fig. 5.12 : Courbes de relaxation moyennes pour des indentations membranaire, mixte et du cortex d'actine pour une force d'indentation de 2nN sur des cellules déposées sur HA (a) et sur TA6V (b).

La comparaison des courbes de relaxation du cytosquelette et de la membrane pour des ostéoblastesensemencés sur les deux substrats apporte une information nouvelle (figure 5.13) : pour une force d'indentation de 2nN, ces relaxations sont semblables pour des ostéoblastesensemencés sur HA et sur TA6V. Nous confirmons donc que pour cette force d'indentation, la relaxation viscoélastique de la cellule est, d'une part indépendante du substrat, et d'autre part indépendante du lieu d'indentation (membrane/mixte/cytosquelette).

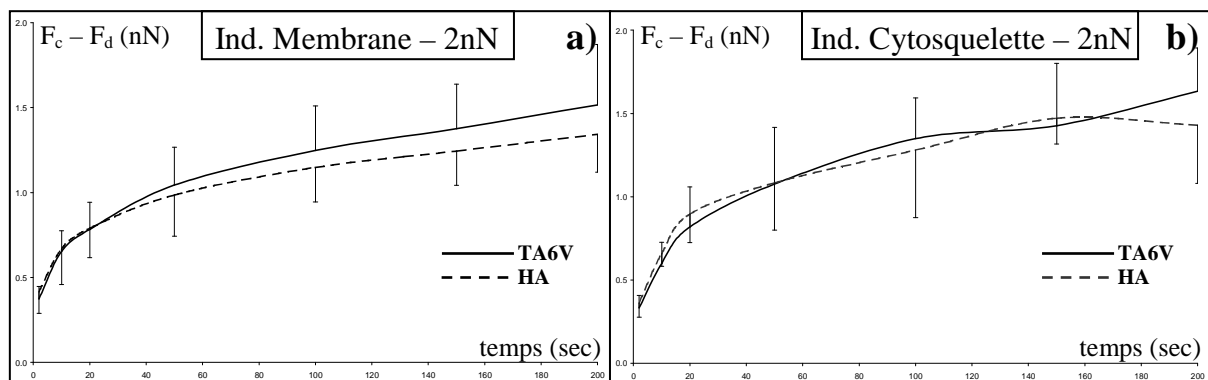


Fig. 5.13 : Courbes de relaxation moyennes pour des indentations de la membrane (a) et du cytosquelette (b) pour une force d'indentation de 2nN sur des ostéoblastesensemencés sur HA et sur TA6V.

5.3.2.2. Force d'indentation de 3nN

Nous présentons ci dessous les trois courbes de relaxation obtenues sur les deux substrats pour la force d'indentation de 3nN (figure 5.14). Pour des temps supérieurs à 20 secondes, les relaxations de la membrane et du cytosquelette sont différentes pour un même substrat. Cette différence est clairement significative pour les cellules déposées sur TA6V ($p < 0.05$), elle l'est un peu moins pour les cellules déposées sur hydroxyapatite ($p < 0.12$). Ceci peut s'expliquer par le faible nombre de relaxation du cytosquelette sur HA ($n = 4$). Comme pour l'indentation à 2nN, la relaxation mixte n'est pas statistiquement différente des deux autres, et ce pour les deux substrats.

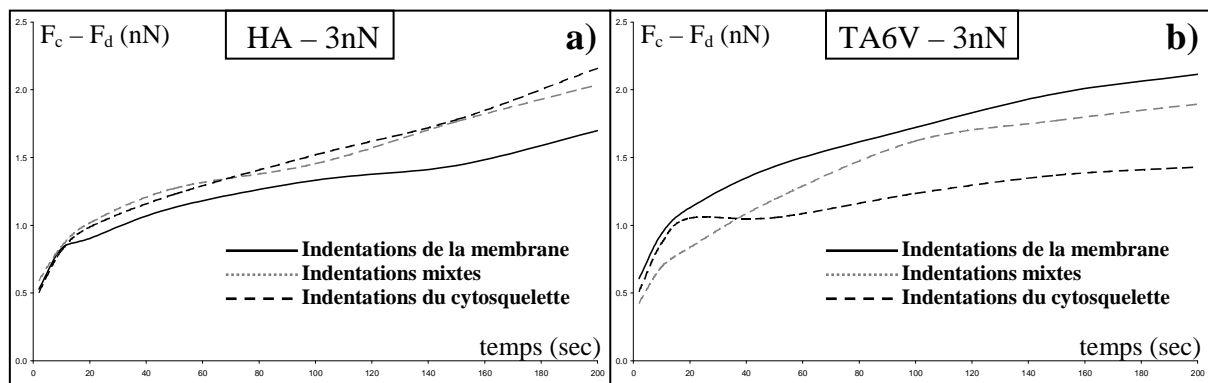


Fig. 5.14 : Courbes de relaxation moyennes pour des indentations de la membrane, mixte et du cytosquelette pour une force d'indentation de 3nN sur des ostéoblastes ensemencés sur HA (a) et sur TA6V (b).

Les évolutions des courbes de relaxation de la membrane et du cytosquelette révèlent un comportement différent, selon la nature du substrat. Pour des ostéoblastes ensemencés sur TA6V et pour des temps supérieurs à 20 sec, la relaxation de la membrane est plus importante que la relaxation du cytosquelette. Le cytosquelette étant moins viscoélastique que la membrane, cette évolution était attendue. Au contraire, les relaxations provenant de cellules déposées sur HA montrent une évolution surprenante. Pour des temps supérieurs à 20 sec la relaxation de la membrane est inférieure à la relaxation du cytosquelette. Sur HA la force appliquée à la pointe diminue plus lentement lorsque la membrane est indentée. Cela sous entendrait un caractère viscoélastique plus faible de la membrane par rapport aux fibres d'actine.

A l'aide d'autres représentations, la comparaison des courbes de relaxation du cytosquelette d'une part, et de la membrane d'autre part, obtenues sur les deux matériaux

confirme cette observation (figure 5.15). Pour des temps supérieurs à 20 secondes, la relaxation du cytosquelette sur TA6V est significativement différente de celle obtenue sur HA. Il en est de même pour lorsque la membrane est sollicitée. Par contre, aucune différence significative n'est observée pour des temps inférieurs à 20 secondes.

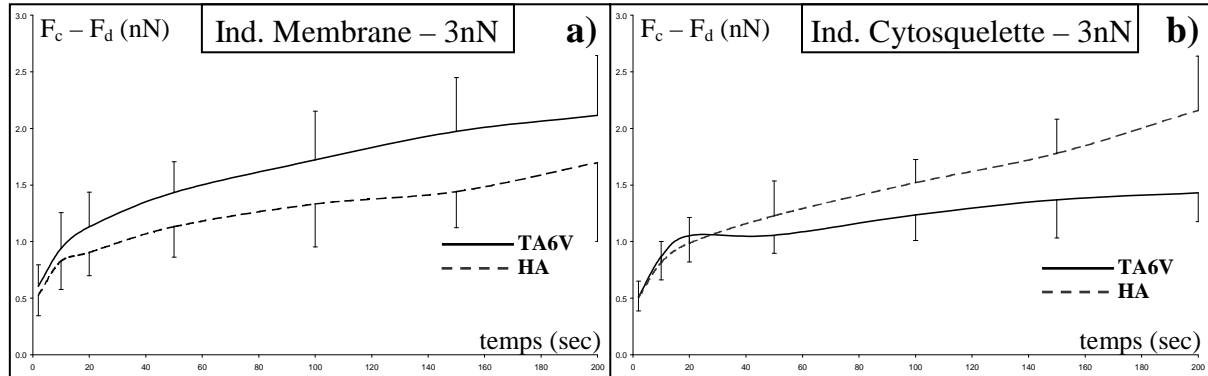


Fig. 5.15: Courbes de relaxation moyennes pour des indentations de la membrane (a) et du cytosquelette (b) pour une force d'indentation de 3nN sur des ostéoblastes ensemencés sur HA et sur TA6V.

L'assimilation à des lois puissance des courbes de relaxation permet de quantifier ces observations (tableau 5.3). Sur TA6V, l'exposant de la relaxation de la membrane, plus élevé que celui du cytosquelette, confirme que la relaxation est plus forte lorsque l'on indente la membrane. Par contre sur HA, un exposant plus faible pour la relaxation du cytosquelette que pour la membrane témoigne d'un comportement inverse, non classique (relaxation plus forte du cytosquelette).

	Indentations de la membrane	Indentations du cytosquelette
TA6V	$\Delta F = 0.502 \cdot t^{0.2706} \quad r^2 > 0.99$	$\Delta F = 0.495 \cdot t^{0.2056} \quad r^2 > 0.94$
HA	$\Delta F = 0.453 \cdot t^{0.2379} \quad r^2 > 0.99$	$\Delta F = 0.4049 \cdot t^{0.2893} \quad r^2 > 0.99$

Tableau 5.3 : Expression de l'évolution de la diminution de la force appliquée à la pointe AFM (ΔF) en fonction du temps lors des essais de relaxation du cytosquelette et de la membrane pour une force d'indentation de 3nN .

5.4. Evolution de la rigidité des ostéoblastes au cours des essais de relaxation

Nous venons de voir que pour une force d'indentation de 3nN, les relaxations des ostéoblastes ensemencés sur TA6V ou HA n'étaient pas semblables. De plus, nous avons remarqué que les courbes de charges successives n'étaient pas parfaitement reproductibles, laissant supposer une modification de la cellule, assouplissement ou rigidification après chaque indentation. Pour étayer cette hypothèse, nous avons déterminé l'évolution du module élastique au cours des essais. En utilisant la méthode exposée dans les chapitres III et IV, le module élastique est évalué lors des 7 charges précédant les 7 relaxations. Au total, ce sont donc 7 mesures de rigidité qui sont obtenues, correspondantes au 7 paliers.

5.4.1. Evolution de la rigidité après indentation du cytosquelette

Nous représentons l'évolution du module élastique comme suit : le module élastique évalué lors d'une charge sera affecté à la durée du palier qui suit la charge. Par exemple, la 7ième, et dernière mesure de rigidité sera donc affectée à une durée de 200 secondes. Cette représentation permet de réaliser un parallèle entre la relaxation et l'évolution des modules élastiques.

Dans le cas de l'indentation du cytosquelette, l'évolution du module élastique est variable suivant les cellules testées. Des tendances peuvent tout de même être observées pour chaque substrat :

- Sur TA6V deux types d'évolutions du module élastique du cytosquelette ont été observées :
 - Augmentation légère en début d'essai (jusqu'à 20 secondes) puis ensuite diminution.
 - Diminution dès le début de l'essai puis ensuite stagnation.

Deux exemples d'évolutions obtenues sur TA6V sont données sur la figure 5.16a.

➤ Sur HA, le module élastique du cytosquelette peut suivre également deux types d'évolutions :

- Augmentation légère en début d'essai (jusqu'à 20 secondes) puis ensuite diminution.
- Diminution dès le début de l'essai puis ensuite augmentation.

Deux exemples d'évolutions obtenues sur HA sont donnée sur la figure 5.16b.

Nous concluons donc qu'en fin d'expérience, les comportements cellulaires diffèrent d'un matériau à l'autre : le cytosquelette des ostéoblastesensemencés sur TA6V a tendance à se rigidifier, alors que le cytosquelette des ostéoblastesensemencés sur HA a tendance à s'assouplir.

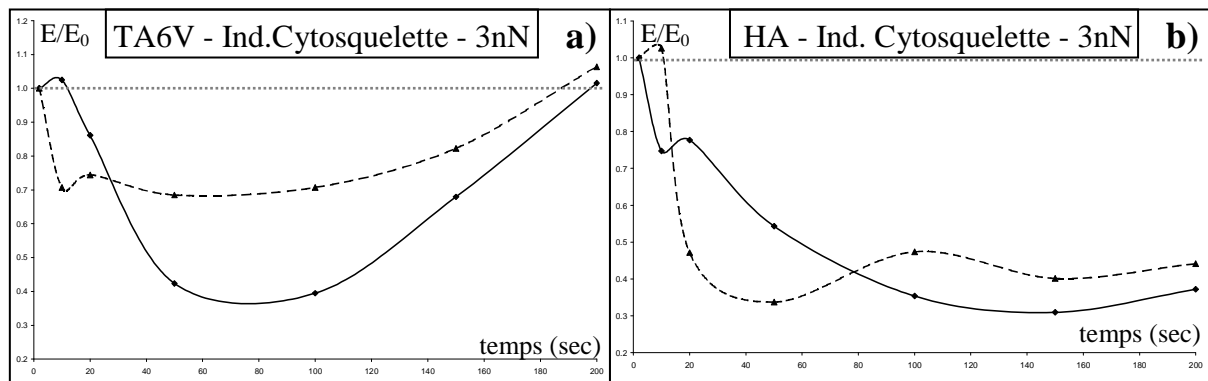


Fig. 5.16 : Evolution du module élastique en fonction du temps de palier pour des indentations du cytosquelette pour une force d'indentation de 3nN sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V (a) et HA (b).

5.4.2. Evolution de la rigidité après indentation de la membrane

Comme dans le cas précédent, l'évolution du module élastique après indentation de la membrane est variable suivant les cellules testées. Malgré tout, des tendances peuvent aussi être observées. Quel que soit le substrat, deux évolutions sont possibles :

- Forte augmentation du module élastique dès les premières secondes (jusqu'à 6 fois la valeur initiale) puis stabilisation. Le module élastique final est plus élevé que celui initial.
- Fluctuation du module élastique aux alentours de la valeur initiale.

Là encore, nous donnons pour chaque substrat deux exemples d'évolutions obtenus (figure 5.17).

Dans le cas des ostéoblastes ensemencés sur TA6V, les fluctuations du module élastique de la membrane conduisent à des rigidités (6 fois sur 8) inférieures à la valeur initiale, alors que celles observées sur des ostéoblastes ensemencés sur HA conduisent à des rigidités de la membrane (3 fois sur 4) supérieures (figure 5.17). Ceci confirme une différence de comportement des ostéoblastes sur les deux substrats.

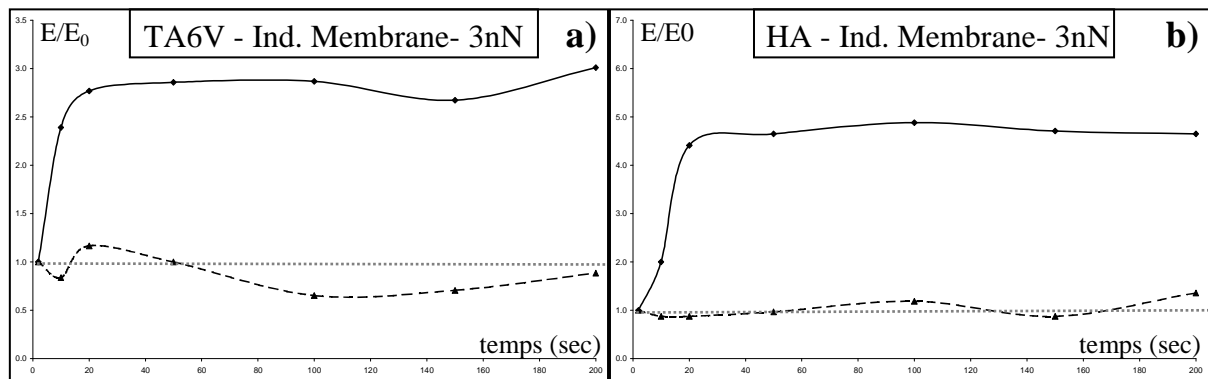


Fig.5.17 : Evolution du module élastique en fonction de la rigidité initiale (E_0) pour des indentations de la membrane pour une force d'indentation de 3nN sur des ostéoblastes ensemencés sur TA6V (a) et HA (b).

5.5. Discussion

Nous pouvons dire que l'évolution de la relaxation cellulaire est corrélée à l'évolution de la rigidité.

- Pour le cytosquelette sollicité sous 3nN, on observe une relaxation plus forte sur HA que sur TA6V ; dans le même temps la rigidité du squelette des cellules cultivées sur HA diminue régulièrement au cours des indentations successives (assouplissement), alors qu'elle augmente pour les cellules cultivées sur TA6V (rigidification).
- Pour la membrane sollicitée sous 3nN, la relaxation observée est plus faible sur HA que sur TA6V ; simultanément le module élastique de la membrane augmente très fortement pour les cellules cultivées sur HA (rigidification importante lors des indentations successives), alors qu'il tend à diminuer (assouplissement de la membrane), voir à augmenter légèrement pour les cellules cultivées sur TA6V

Une étude réalisée en utilisant des traceurs contenus dans le cytoplasme cellulaire ou attachés à la membrane a permis de sonder le cytosquelette sous la membrane, et le

cytosquelette profond de cellules épithéliales [VAN 06]. L'auteur montre que les exposants des lois puissance n'ont significativement pas les mêmes pour ces deux domaines. L'exposant valait 0.17 et 0.26 respectivement pour l'actine corticale et le cytosquelette profond.

Dans notre étude de la relaxation du cytosquelette, ce sont les fibres du cytosquelette profond qui sont sollicitées. Ces relaxations ont respectivement un exposant de 0.28 sur HA et 0.20 sur TA6V. Avec un exposant de 0.20, la relaxation du cytosquelette sur TA6V s'éloigne donc du comportement attendu.

Cependant, nous avons vu une augmentation du module élastique au cours des essais de relaxation du cytosquelette sur TA6V. Cette rigidification ne peut s'opérer que par le biais de l'actine corticale, cette dernière ayant un caractère hautement dynamique. Le caractère élastique de l'actine corticale peut être alors une explication à la diminution du caractère visqueux du cytosquelette profond.

Par ailleurs, l'étude de la relaxation de la membrane confirme cette hypothèse. La rigidification de la membrane sur HA s'accompagne d'un exposant plus faible (0.23) que l'exposant correspondant à un assouplissement de la membrane sur TA6V (0.26). La création d'actine cortical autour des lieux d'indentation impliquerait d'une part l'augmentation de la rigidité et d'autre part la diminution du caractère viscoélastique de la zone indentée.

Enfin, on notera que pour des temps inférieurs à 20 secondes, tant au niveau de la relaxation qu'au niveau de l'évolution de la rigidité, la distinction entre les deux substrats est impossible. Cette dernière observation confirme le lien étroit entre la rigidité et la relaxation cellulaire.

La non distinction possible de comportement pour des temps inférieurs à 20 secondes pose la question de la réaction d'une cellule. Aux temps courts il est possible d'observer soit la diminution soit l'augmentation du module élastique de façon aléatoire. On observe dans tous les cas un changement fort de rigidité. Aux temps plus longs, le module élastique suit une évolution régulière. La comparaison des relaxations sur TA6V et HA a montré des différences pour des temps supérieurs à 20 secondes.

La réaction immédiate et aléatoire de la cellule ne serait-elle pas qu'une phase précédant une réorganisation cytosquelettique plus fondamentale - celle-ci pouvant être différente suivant le substrat - ? Apporter une réponse à cette question n'est évidemment pas aisé. Elle implique nombre de questions en rapport avec notre méthode expérimentale.

Est-ce la cellule qui, après la première indentation, réagit de façon à induire une rigidification ou un assouplissement ? Est-ce la répétition des indentations qui implique une

hypothétique réaction ? Le temps de maintien en charge serait il un facteur influençant cette réaction ?

Toutes ces questions se rapportent à la mécanotransduction, c'est à dire les liens unissant facteurs mécaniques et phénomènes biochimiques. Au niveau des cellules toute variation des contraintes est perçue par de nombreux récepteurs et se traduit par des modifications fonctionnelles. Les intégrines, reliant la matrice extracellulaire aux sites d'adhérence focale et au cytosquelette, peuvent transmettre et moduler la tension mécanique dans la cellule. Par ailleurs, les contraintes mécaniques agissent sur les canaux ioniques, stimulent des récepteurs membranaires et induisent des cascades complexes d'événements biochimiques [HUA 04]. Une durée a priori inconnue entre le moment de la sollicitation et la mise en route de la réaction cellulaire rend difficile l'observation de cette dernière.

5.6. Conclusion de l'étude

Pour une force d'indentation de 2 nN, la relaxation cellulaire semble ne pas dépendre du substrat ni du lieu d'indentation. Malheureusement, le peu d'essais de relaxation du cytosquelette (4 sur TA6V et 3 sur HA) ne nous permet pas de tirer des conclusions définitives.

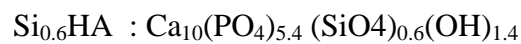
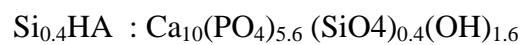
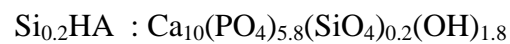
Au contraire, pour une force d'indentation de 3 nN, une distinction est possible entre la relaxation du cytosquelette et la relaxation de la membrane. La relaxation de la membrane est plus forte sur TA6V que sur HA, c'est l'inverse pour le cytosquelette. Nous avons montré au chapitre IV que le cytosquelette était plus organisé sur TA6V, se traduisant par une rigidité plus forte et une relaxation plus faible.

Il est par contre étonnant de trouver une relaxation de la membrane plus forte sur TA6V. La membrane des cellules déposées sur TA6V serait plus viscoélastique que celles déposées sur HA. L'évolution de la rigidité au cours des essais apporte une explication. Dans le cas de l'HA, le module élastique suit différentes évolutions mais ne diminue jamais au cours du temps. Au contraire, sur TA6V, trois quart des cellules (6 sur 8) montre une diminution du module élastique. Ceci pourrait expliquer la différence de comportement au cours des essais de relaxations. La membrane des ostéoblastes ensemencés sur TA6V aurait tendance à s'assouplir après chaque indentation, alors que la membrane des ostéoblastes ensemencés sur HA aurait tendance à se rigidifier. Nous ne sommes pas en mesure d'apporter des explications biochimiques sur ces phénomènes. Des études plus poussées, notamment en biologie cellulaire, pourraient aider à leur compréhension.

Conclusion générale

L'évaluation biologique de nouvelles hydroxyapatites substituées a été l'élément central de notre travail. L'objectif était de mettre en évidence le rôle éventuel de deux substituants, le carbonate et le silicate, sur le métabolisme des cellules ostéoformatrices de type MG-63.

Pour cela des échantillons denses et monophasés d'apatites carbonatées de composition chimique $\text{Ca}_{9.35}(\text{PO}_4)_{5.35}(\text{CO}_3)_{0.65}(\text{OH})_{1.35}$ ont été élaborés par nos soins alors que des pastilles d'apatites silicatées nous ont été fournies. Leurs formules chimiques sont les suivantes :



Le suivi de la dynamique des populations cellulaires à la surface de ces matériaux a permis d'en évaluer la biocompatibilité. L'adhésion cellulaire a été utilisée comme information complémentaire. Elle a été évaluée d'une part, directement par l'observation des contacts focaux et d'autre part, indirectement par la mesure des rigidités des cellules.

Les mesures de rigidités n'étant pas totalement descriptives du comportement mécanique des cellules adhérentes, nous avons procédé à l'étude du caractère viscoélastique d'ostéoblastes ensemencés sur 2 matériaux classiquement utilisés en chirurgie orthopédique, l'hydroxyapatite stoechiométrique (HA) et le TA6V.

L'évaluation biologique des différentes hydroxyapatites silicatées a montré que celles-ci sont biocompatibles. Les ostéoblastes prolifèrent et adhèrent à la surface de ces matériaux. Malheureusement, nos résultats montrent peu de différence entre le comportement des ostéoblastes ensemencés sur les différentes hydroxyapatites denses. La dynamique des populations cellulaires, le développement du réseau d'actine, la répartition des contacts focaux sont semblables sur tous les substrats apatitiques. La nature du substituant ne semble jouer aucun rôle sur l'adhésion cellulaire, puisque aucune différence significative ne peut être observée entre les résultats obtenus sur apatites silicatées et carbonatée. En revanche, la comparaison du comportement cellulaire sur TA6V et sur les hydroxyapatites montre que l'adhésion est plus forte sur le substrat métallique. Le réseau d'actine y est plus développé et les modules élastiques les plus élevés y sont observés.

Nous montrons donc que l'adhésion cellulaire est bien dépendante de la nature du matériau, mais que la chimie de surface des différentes hydroxyapatites que nous avons testées ne l'influence pas.

Grâce aux liaisons Si-O développées par la substitution phosphates – silicates, la fonctionnalisation de surface des hydroxyapatites silicatées peut être envisagée. Ainsi, le greffage de principes actifs ou de molécules organiques capables de fixer par la suite une séquence d'acides aminés reconnue par les ostéoblastes pourrait être envisagé sur ces matériaux. L'hydroxyapatite substituée par des ions carbonates serait résorbable [DOI 98]. L'étude du comportement d'ostéoclastes à leur surface semble alors judicieuse.

Préalablement, une étude avait permis de valider la méthode d'évaluation de la rigidité cellulaire par indentation à l'aide d'une pointe AFM. Les modules élastiques les plus élevés ont été évalués sur les ostéoblastes traités préalablement à la Jasplakinolide, une drogue conduisant à la surpolymérisation des fibres d'actine. Il a donc été observé que les cellules les plus rigides possédaient le réseau de fibres d'actine le plus développé.

Par ailleurs, les ostéoblastes peu adhérents présentent les modules élastiques les plus faibles. Nous avons donc montré que l'évaluation de la rigidité cellulaire comme indicateur de l'adhésion cellulaire est judicieux.

La variation du module élastique d'un point à l'autre de la cellule est d'autant plus élevée que le cytosquelette est développé. On en conclut donc que le cytosquelette est responsable de la non uniformité de la réponse mécanique des cellules. Le module élastique moyen des ostéoblastes ne peut pas refléter la non uniformité de la structure d'une cellule. La largeur et la dissymétrie des distributions des modules élastiques complète alors cette approche.

Les cellules adhérentes ayant un comportement viscoélastique complexe, des travaux sur la relaxation cellulaire ont été réalisés. Pour cela, nous avons mis en place une méthode originale basée sur une succession d'indentations, chaque indentation étant suivie d'une relaxation. La mise en commun des données obtenues lors des différentes relaxations permet la reconstitution d'une courbe de relaxation entre deux et deux cents secondes.

En premier lieu, il a été montré que notre méthode apporte des résultats convaincants. Comme décrit dans la littérature une diminution de la force appliquée à la pointe en loi puissance peut être observée. L'exposant de cette loi étant proche de 0.2.

De plus, pour une force d'indentation de 3 nN et pour des temps de relaxation supérieurs à 20 secondes, une distinction est possible entre la relaxation du cytosquelette et la relaxation de la membrane. Pour des temps inférieurs à 20 secondes, une distinction n'est pas possible. Par ailleurs, la relaxation semble intimement liée à l'évolution de la rigidité au cours des essais. Une rigidification ou un assouplissement du lieu d'indentation étant corrélés respectivement avec une relaxation plus forte ou plus faible de la cellule.

Aux temps courts il est possible d'observer un fort changement de rigidité. Aux temps plus long, le module élastique suit une évolution régulière. Se posent alors deux questions :

- Quel est le temps nécessaire à la cellule pour se réadapter après une sollicitation
- Quelle est la capacité d'une cellule à réagir après de multiples indentations

Notre méthode étant basée sur une succession d'indentations de plus en plus longue, il est difficile de conclure sur ces deux facteurs.

Le « challenge » serait de confirmer ces observations lors d'essais plus formels. La vitesse de sollicitation, le palier de relaxation ainsi que le temps d'attente entre indentations pourraient être des paramètres influençant le comportement cellulaire, en particulier les phénomènes de rigidification ou d'assouplissement.

Références bibliographiques

- [AFN 98] AFNOR ; Détermination quantitative du rapport Ca/P de phosphates de calcium ; NF S 94-066, 1998.
- [ANS 00-a] Anselme K ; Osteoblast adhesion on biomaterials ; *Biomaterials*, 21(7):667-81. Review, Apr 2000.
- [ANS 00-b] Anselme K ; The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour ; *Biomaterials*.;21(15):1567-77, Aug 2000.
- [ANS 00-c] Anselme K ; Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses ; *J Biomed Mater Res*. 49(2):155-66. Feb 2000.
- [ARE 91] Arena N ; Characterization of the cytoskeleton in human normal and otosclerotic osteoblast-like cells ; *Acta Anat (Basel)*, 141(4):311-5. 1991.
- [BAC 08] Bacabac R. G ; Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing ; *Journal of Biomechanics* Volume 41, Issue 7, Pages 1590-1598, 2008.
- [BAN 95] Banes A.J, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, et al. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol*. 1995 Jul-Aug;73(7-8):349-65
- [BAN 99] Baneyx G. ; Self-assembly of fibronectin into fibrillar networks underneath dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers: role of lipid matrix and tensile forces ; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12518-23.
- [BAN 02] Baneyx G ; Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension ; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5139-43.
- [BAR 00-A] Barralet J.E ; Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats; *Journal of Biomedical Materials Research*49 (2): 176 – 182, 2000.
- [BAU 06] A bottom-up approach to cell mechanics ; *Nature Physics* 2006, 2:231-238 ; Bausch AR, Kroy K.
- [BEI 03] Beil, M ; Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells ; *Nat Cell Biol*, 5(9):803_11, 2003.
- [BER 03] Bernache-Assolant D ; Les biomatériaux ; *Laboratoire des matériaux céramiques et traitement de surface* ; 2003.
- [BOY 95] Boyan B.D ; Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro ; *Cells and Materials*, 5(4):323-35. Dec 1995.
- [BRA 06] Brandwynne C.P ; Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement ; *J Cell Biol*, 5;173 (5):733-41 16754957, Jun 2006.
- [BRE 91] Bretscher A ; Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*.;7:337-74, 1991.

- [BUR 89] Burridge, K ; Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton ; *Bioessays*. 10:104-8, 1989.
- [BUR 05] Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell ; *Nat Mater*. 2005 Jul; 4(7):557-61. Epub 2005 Jun 5; Bursac P, Lenormand G, Fabry B, Oliver M, Weitz DA, Viasnoff V, Butler JP, Fredberg JJ.
- [BUT 05] Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications ; *Surface Science Reports*, Volume 59, Issues 1-6, October 2005, Pages 1-152; Hans-Jürgen Butt, Brunero Cappella, Michael Kappl.
- [CAN 03] Canadas P. ; Modele de tenségrité viscoélastique pour l'étude de la réponse dynamique des cellules adhérentes ; thèse de doctorat, université Paris XII, 2003.
- [COU 03] Coughlin M F. ; A Prestressed Cable Network Model of the Adherent Cell Cytoskeleton ; *Biophysical Journal* 84:1328-1336, 2003.
- [COS 04] Costa K.D. ; Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope ; *Dis Markers*.;19(2-3):139-54. Review, 2004.
- [COS 06] Costa K.D ; Non-Hertzian approach to analyzing mechanical properties of endothelial cells probed by atomic force microscopy ; *J Biomech Eng*. Apr;128(2):176-84, 2006.
- [DAH 92] Dahlstrand, J ; Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments ; *J Cell Sci*, 103 (Pt 2):589_97, 1992.
- [DAI 98] Dai J. ; Membrane tension in swelling and shrinking molluscan neurons ; *J. Neurosci*. 18: 6681–6692, 1998.
- [DEG 01] Deligianni D.D ; Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption ; *Biomaterials*, 22(11):1241-51., Jun 2001.
- [DeM 03] DeMali, K.A ;. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 15:572-82, 2003.
- [DEN 04] Deng L ; localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells ; *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C440-C448, 2004.
- [DES 05] Desprat N. ; Creep function of a single living cell ; *Biophys. J.*, vol. 88, p. 2224-2233 2005.
- [DEW 89] Dewynter G, Montero JL ; Aspects chimiques fondamentaux de la structure et de la biosynthèse du collagène. Ed Theot L, Vidal J, Dossa J. Collection « Biologie de l'appareil locomoteur » Sauramps Medical ; Villeurbanne 1989, pp9-17.

- [DiP 04] DiPalma F. Réponse de cellules ostéoblastiques cultivées sur des biomatériaux métalliques soumis à des contraintes mécaniques physiologiques ; thèse de doctorat, université de Saint-Étienne, France ; 2004.
- [DOI 98] Doi Y ; Sintered carbonated apatites as bioresorbable bone substitutes ; *Journal of Biomedical Materials Research* 39 (4): 603 – 610, 1998.
- [DOM 00] Domke J. ; Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 19, Issue 4, 30 December, Pages 367-379, 2000.
- [DUC 93] Ducheyne P ; The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution ; *Journal of Biomedical Materials Research* 27: 25 – 34, 1993.
- [EIA 03] El-Amin S.F ; Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering ; *Biomaterials*, Mar. 24(7):1213-21, 2003.
- [ELL 94] Elliott J.C ; Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates ; Series Amsterdam, Elsevier. Editor, 1994.
- [ERM 07] Ermilov S.A ; Studies of plasma membrane mechanics and plasma membrane–cytoskeleton interactions using optical tweezers and fluorescence imaging ; *Journal of Biomechanics*, Volume 40, Issue 2, 2007, Pages 476-480.
- [EVA 76] Evans E. A ; Membrane viscoelasticity ; 1976. *Biophys. J.* 16:1–12.
- [EVA 06] Evans E ; Forces and bond dynamics in cell adhesion ; *Science* 316, 1148-1153, 2007.
- [FAB 01] Fabry, B ; Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters.* ; 87 :148102 1-4, 2001.
- [FEL 90] Felder S ; Mechanics of fibroblast locomotion: quantitative analysis of forces and motions at the leading lamellas of fibroblasts. *Journal of Cell Science.*, 111 :2513-2536, 1990.
- [FER 06] Fernández P.; A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts; *Biophys J.* 2006 May 15; 90(10): 3796–3805.
- [FUD 03] Fudge D.S ; The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads ; *Biophys J. Sep*;85(3):2015-27.PMID: 12944314, 2003.
- [GAR 03] Gardel ML ; Microrheology of entangled F-actin solutions ; *Phys Rev Lett* 2003, 91:158302
- [GAR 04a] Gardel ML ; Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks ; *Science* 2004, 304:1301-1305.

- [GAR 04b] Gardel ML ; Scaling of F-actin network rheology to probe single filament elasticity and dynamics ; Phys Rev Lett 2004, 93:188102.
- [GAR 06a] Gardel ML ; Stress-dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior ; Phys Rev Lett 2006, 96:088102.
- [GAR 06b] Gardel ML ; Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells ; Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103:1762-1767.
- [GEI 01] Geiger, B ; Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mo 2:793-805, 2001.
- [GIB 88] Gibson, L.J ; Cellular Solids: Structure and Properties ; Pergamon Press, Oxford 1988.
- [GIB 99] Gibson I. R. ; Chemical characterisation of siliconsubstituted hydroxyapatite, Journal of Biomedical Materials Research, 44, 422- 428. 1999.
- [GIB 99-b] Gibson I. R ; Enhanced in vitro cell activity and surface apatite layer formation on novel silicon-substituted hydroxyapatites, Bioceramics V.12, Nara, Japan, 12, 191-194, 1999.
- [GIR 04] Girdhar, G. ; Membrane tether extraction from human umbilical vein endothelial cells and its implication in leukocyte rolling ; Biophys. J. 87:3561–3568, 2004.
- [GRA 05] Graham John ; Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy Mingzhai Sun ; biophysical journal decembre 2005 volume 89.
- [GOY 98] Goyhenex Gehin C ; Conception et réalisation d'un capteur résonant piézo-électrique pour la mesure de force statique ; Thèse de doctorat ; Université de Chambéry, Chambéry, France ; 1998.
- [HAN 02] Hankermeyer C. R ; Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid ; Biomaterials, 23, 743-750, 2002.
- [HEA 83] Heath JP ; Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface ; Journal of Cell Science, Vol 60, Issue 1 331-354, 1983.
- [HEN 91] Hench L. L. ; Bioceramics: From concept to clinic, Journal of the American Ceramic Society ; 74, 1487-1510, 1991.
- [HER 82] Hertz H. ; On the contact of elastic solids ; Eds Jones and Schott, 1882.
- [HUA 04] Huang H, Kamm RD, Lee RT ; Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology ; Am J Physiol Cell Physiol. 2004.
- [HUA05] Huang J. ; Novel deposition of nano-sized silicon substituted hydroxyapatite by electrostatic spraying, Journal of Materials Science: Materials in Medicine ; 16, 1137-1142, 2005.

- [HOC 93] Hochmuth RM ; Measuring the mechanical properties of individual human blood cells ; J Biomech Eng. 1993 Nov;115(4B):515-9 .
- [HOF 06] Hoffman B.D ; The consensus mechanics of cultured mammalian cells ; Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103:10259-10264.
- [HOT 06] Hotulainen, P. and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. J. Cell Biol. 173, 383-394.
- [HUM 02] Humphrey, D ; Active fluidization of polymer networks through molecular motors ; Nature 416, 413-6, 2002.
- [HYN 87] Hynes R.O ; Integrins: a family of cell surface receptors. Cell. 48(4):549-54, 1987.
- [HYN 90] Hynes, R. O ;. Fibronectins ; New York: Springer-Verlag, 1990.
- [ING 93] Ingber D.E. ; Cellular Tensegrity: Defining New Rules of Biological Design That Govern The Cytoskeleton ; J. Cell Sci., Vol. 104, pp. 613-627, 1993.
- [ING 00] Ingber D.E. ; Opposing views on tensegrity as a structural framework for understanding cell mechanics; J Appl Physiol 89: 1663-1678, 2000.
- [ISA 95] Isambert J ; Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations ; J. Biol. Chem. 270, 11437-11444, 1995.
- [JAN 98] Janmey P.A ; The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling ; PHYSIOLOGICAL REVIEWS Vol. 78 No. 3 July 1998, pp. 763-781.
- [KAN 96] Kano Y ; Macromolecular composition of stress fiber-plasma membrane attachment sites in endothelial cells in situ. Circ Res. Nov;79(5):1000-6, 1996.
- [KAT 95] Katoh K ; Focal adhesion proteins associated with apical stress fibers of human fibroblasts ; Cell Motil Cytoskeleton.31(3):177-95, 1995.
- [KAT 00] Katoh K ; Isolation and in vitro contraction of stress fibers ; Methods Enzymol, 325:369-80, 2000.
- [KAY 64] KAY M.I; Crystal structure of hydroxyapatite ; Nature24.1964.
- [KIM 03] Kim, S. R. ; Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors ; Biomaterials 24: 1389-1398, 2003.
- [KIP 01] Kilpadi K.L ; Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel ; J Biomed Mater Res. Nov;57(2):258-67, 2001.
- [KLE 95] Klein-Nulend J ; Pulsating Fluid Flow Increases Nitric Oxide (NO) Synthesis by Osteocytes but Not Periosteal Fibroblasts - Correlation with Prostaglandin Upregulation ; Biochemical and biophysical research communications, vol. 217, n^o2, pp. 640-648, 1995.

- [KRA 00] Krause A ; Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials ; *J Biomed Mater Res.* Dec 15;52(4):738-47, 2000
- [KRE 07] Kreplak L ; Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back ; *Bioessays.* Jan;29(1):26-35. Review. PMID: 17187357, 2007.
- [LAB 73] Labarthe J.C ; Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phosphocalciques ; *Annales*, 1973.
- [LAF04] Lafon J. P ; Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées ; Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2004.
- [LAN 02] Lange R ; Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material ; *Biomol Eng.* 19(2-6):255-61, Aug 2002.
- [LAN 03] Landi E ; Carbonated hydroxyapatite as bone substitute ; *Journal of the European Ceramic Society*, 23, 2931-2937, 2003.
- [LAU 05] Laurent V. ; Gradient of rigidity in the lamellipodia of migrating cells revealed by atomic force microscopy ; *Biophysical Journal*, vol. 89, num. 1, p. 667-675, 2005.
- [LEE 06] Lee J.S ; Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCKhard cytoplasmic stiffening response to fluid flow ; *J Cell Sci* 2006, 119:1760-1768.
- [LEH 04] Lehoux S, Tedgui A ; Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule ; *MEDECINE/SCIENCES* 2004 ; 20 : 551-6.
- [LIU 98] Liu B. P ; Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and dna synthesis via the gtp-binding protein rho ; *Cell Adhes Commun*, 5(4):249_55, 1998.
- [LIU 06] Liu J ; Microrheology probes length scale dependent rheology ; *Phys Rev Lett* 2006, 96:118104.
- [LOH 00] Lohmann C.H ; Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D3 ; *J Bone Miner Res.* 15(6):1169-80, Jun 2000.
- [MAC 95] MacKintosh F.C ; Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks ; *Phys. Rev. Lett.* 75, 4425, 1995.
- [MAK 00] Maksym G. ; Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz ; *J Appl Physiol* 89: 1619-1632, 2000.
- [MAN 97] Maniotis A. ; Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 849-854, February 1997.

- [MAT 00] Matsuura T ; Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium ; *Biomaterials*. Jun, 21(11):1121-7. 2000.
- [MAT 01] Mathur A.B ; Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy ; *Journal of Biomechanics*, Volume 34, Issue 12, December 2001, Pages 1545-1553.
- [MAT 06] Matthews BD ; Cellular adaptation to mechanical stress : role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels ; *J. Cell Sci.* 119, 508-519. 2006.
- [McG 04] McGarry J.G ; A threedimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell ; *European cells and materials*, 7 :27–34, 2004.
- [McG 07] McGarry J.G ; Stimulation of nitric oxide mechanotransduction in single osteoblasts using atomic force microscopy ; *J Orthop Res.* Apr;26(4):513-21. 2008.
- [MUL 06] Muller J ; Analyse du cytosquelette par des approches bioinformatiques à haut débit de génomique comparative et de transcriptomique ; Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Starsbourg, France ; nov. 2006.
- [MOS 89] Mosher, D. F ; *Fibronectin*, San Diego: Academic Press, Inc. 1989.
- [OKA 98] Okamoto K ; RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium ; *J Dent Res.* Mar;77(3):481-7, 1998
- [PAL 07] Palard M ; Synthèse et frittage d'hydroxyapatite phosphocalciques silicatées ; Thèse de doctorat N° 2007-72, Université de Limoges, France, 2007.
- [PAL 08] Palard M ; Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ceramics ; *Acta Biomaterialia*, 2008 Nov 6.
- [PAN 02] Pankov R ; Fibronectin at a glance ; *J. Cell Sci.*, 115 : 3861-3863 2002, 2002.
- [PAS 05] Paszek M.J ; Tensional homeostasis and the malignant phenotype ; *Cancer Cell*, 8, 241-254, 2005.
- [PEL 07] Pellegrin S ; Actin stress fibres. *J Cell Sci.* Oct 15;120(Pt 20):3491-9, 2007
- [POH 00] Pohler E.M ; Unalloyed titanium for implants in bone surgery ; *Injury.* Dec; 31 Suppl 4:7-13. Review, 2000.
- [POU 98] Pourati J. ; Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells? ; *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C1283-C1289, 1998.
- [POS 87] Posner AS ; The mineral of bone. *Clin Orthop.* 1987 Nov;(200):87-99.
- [RAB 05] Rabinovich Y. ; Atomic force microscopy measurement of the elastic properties of the kidney epithelial cells ; *J Colloid Interface Sci.* 2005 May 125-135, 285.
- [RAU 99] Raucher, D. ; Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension ; 1999. *Biophys. J.* 77:1992–2000.

- [RAY 99] Raynaud S. ; Characterization of hydroxyapatite-tricalcium phosphate bioceramics issued from Ca-deficient hydroxyapatite powders : influence of Ca/P ratio ; Phosphorus Research Bulletin, 10, 214-219, 1999.
- [RAY02-a] Raynaud S. ; Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering, Biomaterials, (2002), 23, 1073-1080
- [RAY02-b] Raynaud S. ; Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders, Biomaterials, (2002), 23, 1065-1072.
- [RAY 02-C] Raynaud S. ; Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics ; Biomaterials 23 (4): 1081 – 1089, 2002.
- [RIV 01] Riveline D ; Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts in an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism ; J. Cell. Biol. 153, 1175-1185, 2001.
- [ROU 06] Rouahi M. ; Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials ; Biomaterials, Volume 27, Issue 14, Pages 2829-2844, May 2006.
- [ROT 00] Rotsch C ; Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts - An Atomic Force Microscopy Study. Biophys. J., 78 520-535, 2000.
- [SAT 07] Sato K ; Measurement of local strain on cell membrane at initiation point of calcium signaling response to applied mechanical stimulus in osteoblastic cells J Biomech.;40(6):1246-55. Epub 2006 Aug 2, 2007 ;.
- [SHA 99] Shah A.K ; High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys ; Bone. May;24(5):499-506, 1999.
- [SIM 02] Simon A. ; Intérêt de la microscopie de force atomique sur la biofonctionnalisation de matériaux : caractérisation du greffage et de l'adhésion cellulaire ; Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2002.
- [SIM 03] Simon A., Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. Cytometry A ; 54(1):36-47, Jul 2003.
- [SIN 96] Sinha R.K ; Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials ; Bone. 1996 May;18(5):451-7.
- [SMA 98] Small, J ; Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. Biochim. Biophys. Acta 1404, 271- 281, 1998.

- [STA 02] Stamenovic D ; Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells ; *Biomech. Model Mechanobiol.* 1: 95-108, 2002.
- [SNE 65] Sneddon I. A. ; The relation between load and penetration in the axisymetrique boussines problem for a punch of arbitrary profile. *International ; J. of Engineering Sciences*, 3 :45–57, 1965.
- [STE 03] Stephens N.L, The biophysics of asthmatic airway smooth muscle, *Respir. Physiol. Neu-robiol* ; 137,125-40, 2003.
- [SOC 86] Société Européenne des Biomatériaux ; Conférence de consensus, Chester (Grande Bretagne), mars 2983.
- [SOL 98] Sollich, P.; Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials ; *Phys. Rev. E* 58: 738-759. 1998.
- [STA 96] Satcher R L Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton ; *Biophysical Journal* 71: 109-118,1996.
- [STA 99] Stamenovic D. ; The Role of Prestress and Architecture of the Cytoskeleton and Deformability of Cytoskeletal Filaments in Mechanics of Adherent Cells: a Quantitative Analysis ; *Journal of Theoretical Biology*, Volume 201, Number 1, November 1999 , pp. 63-74(12).
- [STA 07] Stamenović D. ; Rheological Behavior of Living Cells Is Timescale-Dependent ; *Biophysical Journal* 93:L39-L41, 2007.
- [STO 05] Storm C. ; Nonlinear elasticity in biological gels ; *Nature* 2005, 435:191-194.
- [TAK 05] Takai E. ; Osteoblast elastic modulus measured by atomic force microscopy is substrate dependent ; *Ann Biomed Eng*, Jul;33(7):963-71, 2005.
- [THA 07] Tharmann R. ; Viscoelasticity of Isotropically Cross-Linked Actin Network ; *Phys. Rev. Lett.* 98, 088103, 2007.
- [THI 05] Thian E. S ; Magnetron cosputtered silicon-containing hydroxyapatite thin films - an in vitro study, *Biomaterials* ; 26, 2947-2956, 2005.
- [THI06-a] Thian, E. S. ; The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films ; *Biomaterials* **27**: 2692-2698, 2006.
- [THI06-b] Thian, E. S. ; Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): a novel calcium phosphate coating for biomedical applications ; *Journal of Materials Science* **41**: 709-717, 2006.
- [THI 07] Thian E.S ; Silicon-substituted hydroxyapatite: the next generation of bioactive coatings ; *Materials Sciences & Engineering C*, 27, 251-256, 2007.

- [THO 95] Thoumine ; Elongation of Confluent Endothelial Cells in Culture : The Importance of Fields of Force in the Associated Alterations of Their Cytoskeletal Structure ; *Exp. Cell Res.* 219, 427-441, 1995.
- [TOP 04] Toppetz V ; Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux ; *Ann. Méd. Vét.*, Université de Liège, Belgique, 148, 1-13, 2004.
- [TOZ 96] Tozer E.C ; Ligand binding and affinity modulation of integrins ; *Biochem Cell Biol*, 74(6):785-98. Review. 1996.
- [TRE 05] Trepap ; Thrombin and histamine induce stiffening of alveolar epithelial cells ; *J. Appl. Physiol.* 98, 1567-1574 , 2005.
- [TSE 05] Tseng Y. ; How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response ; *Biochem Biophys Res Commun*, 334:183-192, 2005.
- [VAL 87] Valberg P.A ; Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques ; *Biophysical Journal* 52: 537-550, 1987.
- [VAL 05] Vallet-Regi M ; Silicon substituted hydroxyapatite. A method to upgrade calcium phosphate based implants ; *Journal of Materials Chemistry*, 15, 1509-1516, 2005.
- [VAN 06] Van Citters K ; The role of F-actin and Myosin in epithelial cell rheology ; *Biophys. J.* 91, 3946-3956, 2006.
- [VAT 06] Vatsa A ; Bio Imaging of Intracellular NO Production in Single Bone Cells After Mechanical Stimulation ; *Bone Miner Res.* Nov 2006.
- [VAT 07] Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte ; *Journal of Biomechanics*, Volume 40, Supplement 1, Pages S89-S95, 2007 ; Aviral Vatsa, Theo H. Smit, Jenneke Klein-Nulend.
- [VER 02] Verrier S ; Function of linear and cyclic RGDcontaining peptides in osteoprogenitor cells adhesion process ; *Biomaterials.* Jan;23(2):585-96, 2002.
- [VIG 84] Vignoles M ; Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B ; Institut National Polytechnique de Toulouse, 1984.
- [WAG 06] Wagner B. ; Cytoskeletal polymer networks: molecular structure of crosslinkers determine macroscopic properties ; *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:13974-13978, 2006.
- [WAN 93] Wang N ; Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton ; *Science* 260, 1124-1127, 1993.
- [WAN 94] Wang N. ; Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension ; *Biophysical Journal* 66: 2181-2189, 1994.
- [WAN 02] Wang N. ; Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells ; *AJP Cell Physiol.* 52, 97-106, 2002.

- [WAN 05] Wang N ; Visualizing the mechanical activation of Src ; Nature 434, 1040-1045, 2005.
- [YAM 02] Yamada, K ; Provisional matrix. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair (ed. R. A. F. Clark), pp. 51-93 ; New York: Plenum Press, 1996.
- [XU 07] Xu, J. L. ; Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by spark plasma sintering method ; Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2): 187-195, 2007.
- [ZAM 01] Zamir, E ; Components of cell-matrix adhesions. J Cell Sci. 114:3577-9, 2001.
- [ZAN 89] Zaner K.S. ; Viscoelasticity of F-actin measured with magnetic microparticles ; The Journal of Cell Biology, Vol 109, 2233-2243, 1989.
- [ZHO 98] Zhong C ; Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly ; J Cell Biol. 1998 Apr 20;141(2):539-51.

Annexes

Annexe A : Relaxation viscoélastique

A.1 Relaxation d'un matériau viscoélastique à température donnée

L'expérience de relaxation consiste à appliquer une déformation constante au matériau, γ_0 , et à suivre l'évolution de la contrainte, τ , en fonction du temps. On définit un module de relaxation, rapport de la contrainte à la déformation imposée. Ce module est une fonction du temps :

$$G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma_0}$$

La figure A.1 montre la variation du module de relaxation d'un matériau viscoélastique en fonction du temps en échelles logarithmiques au cours d'une expérience de relaxation à température fixe. Quatre régions sont discernables :

- un domaine vitreux aux temps courts (le terme de vitreux décrivant la similitude de comportement du matériau avec un verre) : le module est constant et de l'ordre de 10^9 Pa (module de plateau vitreux : G_g) ;
- un domaine de transition : le module diminue rapidement de une à trois décades environ et le comportement dépend d'un temps propre au polymère, λ , nommé temps de retardation. Ce temps varie selon la température d'étude. Il peut être défini approximativement par le point d'inflexion de la courbe logarithmique $G(t)$;
- un domaine caoutchoutique (le terme de caoutchoutique décrivant la similitude de comportement du matériau avec un élastomère) : le module est constant et de l'ordre de 10^6 Pa (module de plateau caoutchoutique G_N^0) ;
- un domaine d'écoulement ou terminal : le module diminue, le polymère s'écoule. Cette zone est absente dans le cas des polymères réticulés.

Dans la zone de transition ou dans la zone terminale, le comportement dépend de temps propres au polymère appelés temps de relaxation. Ces temps varient selon la température d'étude et peuvent être définis approximativement par les points d'inflexion de la courbe logarithmique $G(t)$.

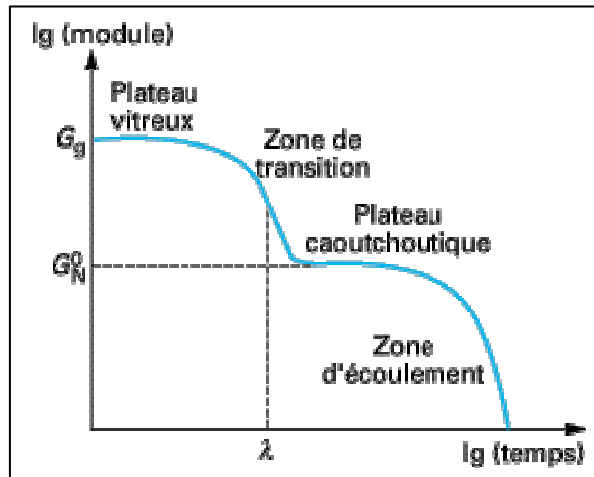


Fig. A1 : Module de relaxation d'un matériau viscoélastique à température donnée

Pour expliquer physiquement les phénomènes observés, on peut raisonnablement supposer que la déformation macroscopique n'est que le reflet d'une modification microscopique des configurations des chaînes dans le matériau. Les phénomènes viscoélastiques trouveraient donc leur origine dans la possibilité de mouvements intra ou intermoléculaires des chaînes par rapport à une position d'équilibre statistique. Cette explication permet de rendre compte des observations expérimentales en relaxation par exemple. À température donnée, pour des temps de sollicitation courts, aucun mouvement n'est possible au sein du matériau, le module est élevé et constant et le matériau a le comportement d'un verre (plateau vitreux). Lorsque le temps de sollicitation est plus long, des mouvements locaux de la chaîne (séquences de plus en plus longues d'environ 50 à 100 atomes du squelette de la macromolécule) deviennent possibles (zone de transition) ; le temps de relaxation reflète le temps nécessaire à ces mouvements ou, en d'autres termes, le temps pour qu'un segment de longueur donnée renouvelle entièrement sa configuration. Dans la zone d'écoulement, aux temps très longs, les mouvements mis en cause sont des déplacements de la chaîne entière dans son environnement avec un temps de relaxation évidemment plus grand. Dans la zone de plateau caoutchoutique, les mouvements locaux de la chaîne restent possibles mais, par contre, si les chaînes sont assez longues, les mouvements de plus grande amplitude sont alors limités par la présence d'interactions interchaînes localisées en des points nommés enchevêtrements. Avant de rentrer plus en détails dans la modélisation de ces phénomènes d'interaction interchaînes, nous présentons les modèles mécaniques classiquement utilisés pour caractériser la viscoélasticité.

A.2 Modèles viscoélastiques simples

Des modèles mécaniques simples permettent de démontrer le comportement viscoélastique simple en couplant un élément présentant une réponse visqueuse idéale à l'application d'une contrainte (un piston, qui obéit strictement à la loi de Newton) et un élément présentant une réponse élastique idéale à l'application d'une contrainte (un ressort, qui obéit strictement à la loi de Hooke). Le comportement du piston est donc caractérisé par une viscosité η et celui du ressort par un module G . Le modèle de Maxwell regroupe un amortisseur et un ressort en série (figure A.2), celui de Voigt un amortisseur et un ressort en parallèle (figure A.2). La particularité du modèle de Voigt est de ne pas présenter d'élasticité instantanée. Ceci entraîne que sa fonction de relaxation n'est pas continue et dérivable par morceaux, avec un saut fini à l'origine : l'application d'un saut de déformation en $t = 0$ produit une contrainte infinie. Ce modèle n'est donc pas utilisable en relaxation, sauf si la mise en charge est progressive, et serait pour cette raison associé à un ressort en série pour effectuer des calculs de structure (modèle de Kelvin-Voigt – non présenté). Le modèle de Maxwell permet de caractériser des expériences de relaxation.

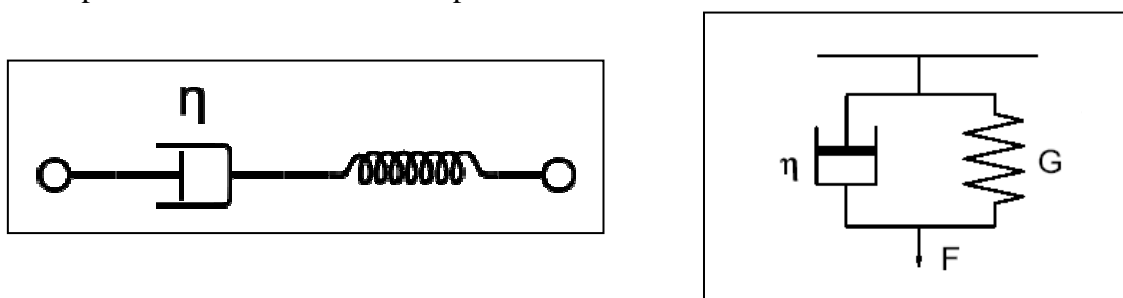


Fig. A2 : Modèle de Maxwell (à gauche) et modèle de Voigt-Kelvin (à droite) pour un matériau viscoélastique

Dans le modèle de Maxwell, les déformations de chaque élément s'ajoutent pour donner la déformation globale alors que la contrainte est identique dans chaque élément et égale à la contrainte globale. En utilisant les lois de comportements élastique (loi de Hooke ; $\tau = G\gamma$) et visqueuse (loi de Newton ; $\tau = \eta \dot{\gamma}$) respectivement pour le ressort et le piston, on montre que le module de relaxation suit la loi :

$$G(t) = G \exp(-t/\lambda) \text{ avec } \lambda = \eta/G$$

Ce modèle, puisque très simpliste, présente un défaut de taille : les phénomènes de relaxation et de fluage sont décrits, au mieux, par des lois exponentielles comportant un temps

caractéristique unique, alors que les observations expérimentales montrent des variations moins rapides des grandeurs.

Pour pallier ces inconvénients, il a été imaginé l'association d'un grand nombre d'éléments de base de même type qui forment alors le modèle de Maxwell généralisé (Maxwell-Wiechert). Il est réalisé par association en parallèle de N modèles de Maxwell élémentaires de caractéristiques (G_i, η_i ou $\lambda_i = \eta_i / G_i$ pour $i = 1$ à N). Le module de relaxation sera alors :

$$G(t) = \sum_{i=1}^N G_i \exp(-t/\lambda_i)$$

La modélisation du comportement d'un matériau réticulé peut se faire en ajoutant, en parallèle au système précédent, un ressort de module G_e , cela conduisant à un module de relaxation de la forme :

$$G(t) = G_e + \sum_{i=1}^N G_i \exp(-t/\lambda_i)$$

Si le nombre N d'élément de Maxwell augmente indéfiniment, le spectre discret évolue vers une courbe continue, le module devient alors une fonction continue $G(t)$ des temps de relaxation ; la fonction de relaxation d'un tel modèle peut s'écrire comme suit :

$$G(t) = G_e + \int_0^{\infty} \frac{H(\lambda)}{\lambda} \exp(-t/\lambda) \text{ avec } H(\lambda) \text{ spectre des temps de relaxation}$$

Annexe B : Les modèles viscoélastiques cellulaires

B.1 Les modèles comportementaux

B.1.1 Structural Damping

Dans ce modèle, le module de pertes est une fraction constante du module élastique. Ce couplage entre les deux modules se justifie par une source commune le cytosquelette. Le rapport $\eta = G''/G'$ est donc constant pour toutes les fréquence (G' et G'' étant défini dans le domaine fréquentiel) et le modèle donne une relation directe entre la contrainte appliquée $T(f)$ et la déformation résultante $\delta(f)$ dans le domaine fréquentiel.

$$T(f) = G'(1+i \eta) \delta(f)$$

Les modules élastique et visqueux se comportent donc en loi de puissance de la pulsation d'excitation. Des mesures de magnétocytométrie effectuées sur des cellules adhérentes ont validées ce modèle [FAB 01] [HOF 06]. Ce comportement a aussi été observé pour des gels d'actines in vitro [MAH 04]. Un tel comportement traduit que le processus de relaxation n'est pas lié à un temps propre caractéristique de la cellule, mais que l'on a une distribution continue du temps de relaxation [DES 05]. La dissipation au sein de la cellule n'est pas simplement visqueuse mais le résultat de nombreux processus dynamiques élémentaires à différentes échelles. Afin d'interpréter un tel comportement, il est envisagé un modèle de Maxwell généralisé constitué par la mise en parallèle d'une infinité d'éléments de Maxwell [BUR 05].

B.1.2 Matériaux vitreux mous

P. Sollich a montré que la rhéologie des matériaux vitreux mous peut être mise en parallèle avec celle de la cellule [SOL 98]. Ces systèmes dont font partie les mousses, les pâtes, les émulsion et les milieux granulaires, sont caractérisés par leur désordre structurel (éléments constitutifs très différents), leur métastabilité et leur état hors équilibre (réarrangement permanent des éléments constitutifs). Dans le cas du cytosquelette, les éléments sont vus comme étant en permanente réorganisation et se réarrangent en fonction des interactions avec la matrice protéique. Ces systèmes apparaissent comme des bons modèles pour la mécanique cellulaire puisque eux aussi, répondent à la déformation avec une loi puissance de la fréquence.

B.2 Les modèles structuraux

B.2.1 Modèles de gels de polymères et de transition de phase

Dans ces approches, le cytosquelette est vu comme un gel dynamique constitué de trois réseaux (les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires) interconnectés qui s'assemblent et se désassemblent en permanence suivant un processus de percolation. Comme dans tout système utilisant le principe de percolation, la notion de densité en éléments actifs (ici les filaments d'actine) est essentielle puisque c'est elle qui régit la transition de phase. Divers auteurs ont travaillé sur des solutions d'actine et ont montré non seulement l'influence de la concentration en filaments [GAR 03] [MAH 04], mais aussi l'influence de concentration en protéines de liaison [JAN 98] [GAR 04a] [WAG 06]. Ils montrent aussi une dépendance des propriétés viscoélastiques du cytosquelette en fonction de la fréquence de sollicitation encourageant le développement de nouveaux modèles structuraux plus complexes.

B.2.2 Les modèles de mousses

Dans ces modèles, le cytosquelette d'actine est considéré comme une mousse et la théorie des solides alvéolaires lui est appliquée. La structure cellulaire serait alors un réseau interconnecté de barres élastiques qui se courberaient lors d'une déformation. L'utilisation des travaux de Gibson et Ahsby ont été fondamentaux dans l'essor de ces modèles [GIB 88]. En s'appuyant sur ceux-ci, Stracher publia en 1996 ses travaux et, en supposant que seule la courbure de l'actine est responsable de la déformation cellulaire, démontra que la rigidité globale du réseau serait d'environ 104 fois plus faible que celle des filaments le constituant [STA 96]. Ceci est un résultat important puisqu'en nous rappelant que la rigidité des filaments d'actine a été estimé à 0.5GPa, ce modèle prévoit donc une rigidité cellulaire de l'ordre de $5 \cdot 10^4$ Pa. Cette valeur se trouve dans la gamme des mesures effectuées en AFM (ndrl 10^3 - 10^5 Pa). Quelques années plus tard Stamenovic apporta des éléments nouveaux et confirma que ce modèle pouvait prédire la rigidité des cellules testées par AFM (ou micromanipulation de microplaques) mais pas pour des techniques où les forces sont appliquées spécifiquement (magnétocytométrie, pinces optiques) [STA 99]. La même équipe affina les calculs et estima que la rigidité cellulaire devrait être comprise entre 10^3 et 10^4 Pa confirmant les valeurs précédemment prédites [COU 03].

B.2.3 La structure de tenségrité

Ces modèles sont des cas particulier du modèle de barres précontraintes. On considère la structure cytosquelettique comme un réseau réticulés de câbles soumis à une tension initiale. Ces modèles sont définis comme des structures réticulées tridimensionnelles en état d'autocontrainte issue de l'interaction entre un réseau discontinu d'éléments « barres » comprimés par un réseau continu d'éléments « câbles » prétendus. La tension interne est autoéquilibrée par la compression des barres rigides et ceci même en l'absence de force appliquée. Initialement conceptualisé par des architectes, le modèle de tenségrité a été appliqué à la cellule par Ingber [ING 93]. Ce modèle est le seul à considérer une structure tridimensionnelle du cytosquelette issue de l'assemblage de plusieurs types de filaments. Une autre observation est remarquable ; la rigidité des modèles de tenségrité dépend des conditions d'effort. On retrouve le caractère non-linéaire de la mécanique cellulaire. De la même façon que pour les modèles *mousses*, Coughlin a estimé qu'avec ce modèle, la rigidité cellulaire devrait être comprise entre 10 et 100 Pa [COU 03]. Ces valeurs sont cohérentes avec les mesures effectuées par des techniques appliquant des contraintes faibles telle que la magnétocytométrie.

N° d'ordre : 525 GP

Julien COMBES

**STUDY OF THE ADHESION OF OSTEOBLASTS ON APATITES REPLACEMENT
BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM)**

Speciality : process engineering

Keywords : Biomaterial, Atomic Force Microscopy, actin, osteoblast adhesion, silicated hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, osteoblast relaxation.

Abstract :

The aim of this work enters in the process of development of phosphocalcic apatite. The studied materials are silicated and carbonated Hydroxyapatite. It was a interdisciplinary work where synthesis and sintering of ceramics materials were studied and cellular behaviour on these materials are investigated.

The original dimension of this work concern the following of the bone cell response using indentation by Atomic Force Microscope. We show that bioactivity of these materials are similar and that the relaxation of osteoblasts on TA6V and stoichiometric Hydroxyapatite follows a potency law with an exponent near 0.2.

N° d'ordre : 525GP

Julien COMBES

ETUDE DE L'ADHESION D'OSTEOBLASTES SUR SUBSTITUTS APATITIQUES PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

Spécialité: Génie des procédés

Mots clefs : Biomatériau, ostéoblastes, microscope à force atomique, AFM, adhésion cellulaire, mécanique cellulaire, hydroxyapatite carbonatée, hydroxyapatite silicatée, indentations, relaxation cellulaire, actine.

Résumé :

L'objectif de cette étude s'inscrit dans une démarche de développement de céramiques apatites phosphocalciques et de leur évaluation biologique. Les matériaux étudiés sont des hydroxyapatites silicatées ou carbonatés denses en monophasées. Il s'agit d'un travail interdisciplinaire, qui va de la synthèse et la mise en œuvre de matériaux céramiques à la biomécanique cellulaire et les essais de cultures cellulaires in vitro. La dimension originale du projet concerne le suivi de la réponse des cellules osseuses déposées sur ces céramiques par l'indentation à l'aide d'un AFM. Ces travaux montrent d'une part, que la bioactivité des matériaux étudiés était semblables et d'autre part, que la relaxation de cellules ensemencées sur TA6V et hydroxyapatite stochiométrique suivent une loi puissance (exposant ≈ 0.2) sur 2-200 secondes. La méthode originale utilisée montre par ailleurs que la relaxation d'une fibre d'actine est différentiable de la relaxation de la membrane cellulaire.