



HAL
open science

Biomimétisme, Cytocompatibilité et Cytodynamique

Johanne Beuvelot

► **To cite this version:**

Johanne Beuvelot. Biomimétisme, Cytocompatibilité et Cytodynamique. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00542399

HAL Id: tel-00542399

<https://theses.hal.science/tel-00542399>

Submitted on 2 Dec 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.

Biomimétisme, Cytocompatibilité et Cytodynamique

Thèse de Doctorat

Spécialité : Biologie Cellulaire

Collège Doctoral d'Angers

Ecole Doctorale Biologie Santé

Présentée et Soutenue publiquement

Le : 31 Mai 2010

A : Angers

Par : Johanne Beuvelot

Devant le jury ci-dessous :

Pierre MARIE, rapporteur, Professeur des Universités, Paris VII

Philippe MASSIN, rapporteur, Professeur des Universités, Paris

Michel BASLE, examinateur, Professeur des Universités, Angers

Daniel CHAPPARD, examinateur, Professeur des Universités, Angers

Marie-Françoise MOREAU, membre invité, Maître de Conférence Universitaire, Angers

INSERM, U922 « Remodelage osseux et Biomatériaux »

Laboratoire d'Histologie-Embryologie, UFR Médecine

1, rue Haute de Reculée – 49045 Angers

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION.....	13
I. Tissu osseux	16
1. Généralités.....	16
2. Le remodelage osseux	17
a) Résorption.....	17
b) Formation.....	19
II. Ostéoblastes et ostéoclastes : cibles thérapeutiques	21
1. Les bisphosphonates.....	22
2. Dénosumab.....	23
3. Ranélate de strontium.....	23
a) Effet du ranélate de strontium <i>in vitro</i>	24
b) Mécanismes moléculaires d'action du strontium.....	25
c) Effet du ranélate de strontium <i>in vivo</i>	26
d) Incorporation du strontium dans le cristal osseux.....	27
III. Minéralisation du tissu osseux	28
1. Nucléation primaire dans le woven bone	29
2. Nucléation primaire dans l'os mature	31
3. Nucléation secondaire : propagation	32

IV.	Particularités du minéral osseux.....	33
1.	Structure cristallographique de l'hydroxyapatite	34
a)	Position des dix atomes de calcium	36
b)	Position des ions hydroxyle	36
c)	Position des ions phosphate	36
2.	Composition chimique des cristaux	37
a)	Cristallinité.....	37
b)	Maturité du cristal	37
c)	Vieillissement	38
V.	Biomatériaux	39
1.	Phosphates de calcium	39
2.	Titane.....	40
3.	Poly (2-hydroxyéthyl) méthacrylate (pHEMA)	41
4.	Nanotubes de carbone (CNTs)	42
VI.	Interactions biomatériaux/cellules.....	44
1.	Adhésion cellulaire.....	44
2.	Protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire.....	46
a)	Les protéines de la matrice extracellulaire de l'os.....	46
b)	Les molécules d'adhésion membranaires	48
3.	Comportement cellulaire au contact de biomatériaux.....	52
VII.	Modifications de surface des biomatériaux : biomimétisme.....	52
1.	Phosphates de calcium	52

2. Titane.....	53
a) Modification physique : la rugosité	53
b) Modifications chimiques : revêtements de surface (coatings).....	54
3. Calcification du pHEMA	56
4. Nanotubes de carbone (CNTs)	57
a) Fonctionnalisation non covalente	58
b) Fonctionnalisation covalente	58
c) Calcification des CNTs	59
TRAVAUX PERSONNELS	61
ARTICLE 1	62
ARTICLE 2	69
ARTICLE 3	98
ARTICLE 4	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	184
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes au cours du remodelage osseux. Couplage résorption/formation.

Figure 2 : Molécule de ranélate de strontium.

Figure 3 : Mécanismes d'action du ranélate de strontium sur les ostéoblastes. Le strontium stimule la formation osseuse en activant les voies de signalisations MAPK et ERK1/2 via le CaSR et en augmentant la production de PGE2 à travers son action sur l'expression de COX-2 (Marie, 2007).

Figure 4 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de calcosphérites formés dans la trame collagénique du woven bone chez le fœtus humain.

Figure 5 : Nucléation primaire au niveau des vésicules matricielles.

Figure 6 : Rupture de la membrane de la vésicule et croissance des cristaux à l'extérieur des vésicules.

Figure 7 : Représentation atomique de l'hydroxyapatite.

Figure 8 : Caractéristiques du système hexagonal avec les nœuds de réseau (à gauche) et schéma de l'HAP (à droite) avec en noir les atomes de calcium en site I et en blanc les atomes de calcium en site II.

Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'hydroxyapatite. Quatre mailles hexagonales formées par les ions Ca(II) sont représentées. Les tunnels sont occupés par les ions Ca(I) et OH.

Figure 10 : Surface du cristal osseux avec sa couche hydratée qui permet des échanges d'ions. Pr = protéines.

Figure 11 : Coupe histologique : β -TCP au contact direct du tissu osseux. De nombreux ostéoblastes sont présents ainsi que des macrophages qui viennent résorber le biomatériau.

Figure 12 : Formule chimique du monomère HEMA et du polymère pHEMA.

Figure 13 : SWNTs observés en A) microscopie électronique à transmission (MET) et B) microscopie électronique à balayage (MEB). Les amas observés sur le cliché de MET correspondent à des débris de carbone amorphe et des impuretés métalliques issus de la synthèse des CNTs.

Figure 14 : Images de microscopie électronique A) d'un Multi Wall Nanotube (MWNT) inséré dans la membrane plasmique d'un macrophage. B) le MWNT traverse le cytoplasme d'une cellule saine. C) Image à faible grossissement de MWNTs dans une cellule nécrotique (g = espace dans la coupe, Fe = fer, nu = noyau) (Cheng et coll., 2009).

Figure 15 : Adhésion cellulaire. Etapes d'attachement cellulaire et d'étalement. Cellules issues d'une lignée ostéoblastique (SaOs-2) observées au MEB.

Figure 16 : Jonction des intégrines avec les protéines de la MEC. Cluster d'intégrines et association au cytosquelette. Tal : taline ; Pax : paxilline ; Vin : vinculine ; CAS : p130CAS (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Figure 17 : Structure schématique d'une intégrine (Siebers *et coll.*, 2005).

Figure 18 : Combinaisons connues des sous-unités des intégrines (Hynes, 2002).

Figure 19 : Calcosphérites se développant à la surface de pastilles de pHEMA fonctionnalisées. Observations en MEB.

Figure 20 : Représentation schématique d'un nanotube de carbone fonctionnalisé permettant d'induire la calcification. L'image MEB représente des CNTs fonctionnalisés qui ont permis la précipitation de cristaux de phosphate de calcium sous la forme de calcosphérites.

Tableau 1 : Les différents phosphates de calcium (Dorozhkin et Epple, 2002).

ARTICLE 1

Figure 21 : Préparation du RGD-BP via phosphonylation d'un acide carboxylique, greffe d'un lien maleimide et d'un peptide RGD.

Figure 22 : Marquages au DAPI (bleu) et phalloïdine (rouge) des cellules étalées sur le Ti.

Figure 23 : Cinétique de minéralisation des SaOs-2.

Figure 24 : Recouvrement de la surface du Ti par la minéralisation.

ARTICLE 2

Figure 25 : Station de vidéomicroscopie comprenant l'enceinte thermostatée, le microscope, la pompe péristaltique. La station est pilotée avec le logiciel MetaMorph.

Figure 26 : La chambre de culture est disposée sur la platine du microscope et reliée par des tubes permettant la circulation du milieu.

Figure 27 : Cellules osteoblast-like (SaOs-2) qui s'étirent pour coloniser et venir s'étaler à la surface des particules de β -TCP.

Figure 28 : Macrophages J774.2 à la surface des particules de β -TCP. Les cellules sont venues se fixer puis s'étaler sur le biomatériau.

Figure 29 : Les macrophages péritonéaux sont venus se fixer à la surface des particules de β -TCP en émettant des filopodes qui assurent l'ancrage direct des cellules sur les particules.

ARTICLE 3

Figure 30 : CNT à l'intérieur d'un macrophage en microscopie électronique à transmission.

A) Le CNT est inséré dans la cellule. Les points blancs délimitent la membrane plasmique. B) Maille cristalline du CNT intracellulaire confirmant que la structure cristallographique du CNT a été préservée dans la cellule. C) Transformée de Fourier dans la direction {001}. D) CNT pénétrant la membrane plasmique du macrophage délimitée par les points noirs. E) Agrandissement du CNT qui pénètre la membrane plasmique (Cheng *et coll.*, 2009).

Figure 31 : Traitements chimiques des SWCNTs. Les échantillons 1 à 4 sont de type HiPco, l'échantillon 5 est de type Carbolex. Les nanotubes de type Carbolex sont moins purifiés que les HiPco et présentent plus d'impuretés.

Figure 32 : Précipitation des CNTs après 3 semaines de calcification dans le BF. On compare la précipitation de l'échantillon SWCNT-1 qui sert de témoin avec l'échantillon SWCNT-3.

Figure 33 : Images MEB des nanotubes calcifiés. A) SWCNT-3, B) SWCNT-5. Les nanotubes porteurs de fonctions –COOH ont permis la nucléation d'HAP et la formation de calcosphérites. B) l'échantillon SWCNT-5 a été réalisé à partir de nanotubes de type Carbolex. Les impuretés que l'on peut voir sont issues de la synthèse de ce type de nanotube.

Figure 34 : Spectres Raman des échantillons A) avant et B) après la période d'incubation. Le pic du PO_4^{3-} apparaît sur les spectres des nanotubes incubés excepté sur SWCNT-1 qui n'a pas induit de calcification.

Tableau 2: Résultats des analyses XPS et Raman.

Figure 35 : Spectres FTIR des échantillons calcifiés après incubation.

ARTICLE 4

Figure 36 : Déroulement de l'étude.

Figure 37 : Calcosphérites à la surface du pHEMA après 1 semaine dans le BF.

Figure 38 : Evolution de la taille des calcosphérites en fonction de la concentration en Sr^{2+} .

Figure 39 : Quantité de strontium intégrée dans les calcosphérites en fonction de la concentration en Sr^{2+} dans le BF.

Figure 40 : Quantités de calcium et de phosphate intégrées dans les calcosphérites.

Figure 41 : Spectres FTIR des échantillons calcifiés à S3.

Figure 42 : Spectre FTIR des échantillons calcifiés à S10.

Figure 43 : Spectre Raman à S3.

Figure 44 : Diffractomètre du laboratoire CIMA (Faculté des Sciences, Angers).

Figure 45 : Représentation de la Diffusion de Rayleigh : l'onde électromagnétique déforme le nuage électronique des atomes, le barycentre des charges négatives oscille ainsi par rapport au noyau (charge positive). Le dipôle électrostatique ainsi créé rayonne, c'est ce rayonnement induit qui constitue la diffusion de Rayleigh.

Figure 46 : Diffraction de rayons X par une famille de plans atomiques. Le rayon X de longueur d'onde λ entre en contact avec les atomes de ces plans ; il va les faire vibrer de façon constructive (apparition d'un pic sur le diffractogramme) ou destructive (pas de pic).

Figure 47 : Maille élémentaire hexagonale de l'HAP.

Tableau 3 : Variation des paramètres a et c du cristal d'HAP en fonction de la concentration de Sr^{2+} .

Figure 48 : Variations des paramètres de maille en fonction de la concentration en Sr^{2+} .

Figure 49 : Graphique de désorption du Sr^{2+} .

Figure 50 : Variation des paramètres a et c après la désorption en fonction de la concentration en Sr^{2+} .

Figure 51 : Représentations d'après TableCurve des équations 7902, 7102 et 54. Les points représentent les valeurs de Sr^{2+} qui ont été dosées lors de la période d'élution. Ils se superposent aux courbes avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,95.

Tableau 4 : Les équations qui correspondent aux points d'élution déterminés lors des dosages. R2 est le coefficient de corrélation, x représente le temps en jours et y la quantité de Sr^{2+} éluee en %.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AlkP	Phosphatase Alcaline
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSP	Bone Sialoprotéine
CaP	Phosphate de Calcium
CaSR	Calcium-sensing receptor
Cat K	Cathepsine K
CN Ts	Carbone Nanotubes
FGF	Fibroblast Growth Factor
FN	Fibronectine
HAP	Hydroxyapatite
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-6	Interleukine 6
LN	Laminine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEC	Matrice Extracellulaire
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MVs	Matrix Vesicles
MWCNTs	Multi Walled Carbon Nanotubes
OPN	Ostéopontine
OPG	Ostéoprotégérine
PEG	Polyéthylène glycol
pHEMA	Poly(2-hydroxyéthyl) méthacrylate
Pi	Phosphate inorganique
PNC	Protéines Non Collagéniques

PTH	Parathyroid Hormone
RANK	Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
RANKL	Ligand for Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
RGD	Arginine-Glycine-Acide Aspartique
SaOs-2	Human osteoblast-like osteosarcoma cells
SWCNTs	Single Walled Carbon Nanotubes
TGF β	Transforming Growth Factor β
β -TCP	β Tricalcium phosphate
Ti	Titane
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAcP	Phosphatase Acide Tartrate Résistante
VN	Vitronectine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans l'antiquité, les hommes utilisaient déjà des pièces métalliques en guise d'implants dentaires (Crubezy *et coll.*, 1998). Au début du XX siècle, l'utilisation de céramiques, d'alliages métalliques et de polymères a permis d'obtenir de meilleures performances et une meilleure fonctionnalité. La première prothèse de hanche dont l'implantation fut réussie a été inventée par John Charnley en 1961. Il créa alors un cotyle en polyéthylène à haut poids moléculaire et utilisa du ciment pour fixer la queue fémorale. Grâce à ces avancées, les champs d'utilisation et l'efficacité des biomatériaux se sont développés. Des millions de vies ont été sauvées ou améliorées grâce aux stents cardiovasculaires, aux implants dentaires, aux prothèses de hanche ou aux lentilles de contact.

Sur la base de ces applications, les biomatériaux ont été définis comme étant des matériaux non vivants, conçus pour interagir avec les systèmes biologiques. Ils participent à la constitution de dispositifs à visée de diagnostic, de substituts de tissus ou d'organes, ou encore de dispositifs de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle avec une durée de contact supérieure à trois semaines (Williams, 1976). La propriété principale d'un biomatériau est sa capacité à être bien toléré par l'organisme de l'hôte. C'est de sa biocompatibilité que va dépendre la réussite de l'implantation du biomatériau. Plus récemment et de manière plus précise, la biocompatibilité se définit comme étant « la capacité d'un biomatériau à exécuter sa fonction sans induire d'effet local ou systémique indésirable chez l'hôte mais en produisant une réponse cellulaire appropriée et en optimisant la fonction qu'il doit remplacer » (Williams, 2009).

La révolution de la biologie moléculaire des années 70 et les avancées réalisées en génomique dans les années 90 et 2000 ont affecté la façon dont les biomatériaux sont faits et utilisés. Avec la découverte de molécules spécifiques impliquées dans certains processus biologiques (comme les bone morphogenetic protein (BSP) dans l'ostéogenèse par exemple), on a voulu les incorporer dans des biomatériaux pour les rendre bioactifs (Ratner et Bryant, 2004). Un biomatériau ne doit plus seulement se contenter d'être inerte sans déclencher de réponse immunitaire chez l'hôte, il doit aussi entraîner une réponse positive en favorisant les interactions matériau/cellules pour faciliter la réparation tissulaire ou l'intégration du biomatériau. Un matériau comme le titane est biocompatible mais n'est pas bioactif (Niinomi, 2008). Le coupler avec une protéine spécifique à l'adhésion des ostéoblastes, par exemple,

permettrait d'interagir directement avec les cellules et les tissus à travers des voies moléculaires qui dirigent les réponses biologiques de l'organisme (Kantlehner *et coll.*, 2000).

Simultanément, les avancées en nanotechnologie permettent d'augmenter la sophistication de la conception des biomatériaux et permettent la fabrication de nouveaux biomatériaux qui possèdent des fonctions plus complexes. Cela va permettre la création de matériaux qui vont mimer les propriétés physico-chimiques des matériaux naturels et d'induire des interactions spécifiques avec les récepteurs membranaires des cellules cibles (Shin *et coll.*, 2004) pour réguler la régénération, le maintien ou même la destruction de tissus spécifiques.

In vivo, dans le cadre de prothèses orthopédiques ou d'implants dentaires, les conséquences d'une implantation de matériaux aux propriétés biomimétiques se caractérisent par la formation rapide de tissu osseux en contact direct avec le biomatériau, que ce soit du Ti ou des phosphates de calcium comme le β -tricalcium phosphate (β -TCP) (Knabe *et coll.*, 2008; Pallu *et coll.*, 2009). Les techniques actuelles d'observations microscopiques, telles que les microscopes électroniques, photoniques ou à fluorescence, permettent d'observer *in vitro* les comportements cellulaires pour mieux comprendre leurs comportements *in vivo*. Mais elles imposent une fixation et un traitement des échantillons qui ne permettent pas d'observer l'évolution des interactions dynamiques cellules/matériaux. Récemment, une nouvelle approche d'observation en cytodynamique permet d'étudier les mouvements cellulaires et notamment l'ostéoconduction (Klein *et coll.*, 2007; Dallas *et coll.*, 2009). L'obtention d'images vidéos permet de mieux appréhender les déplacements cellulaires et de mieux comprendre les premières étapes d'adhésion cellulaire.

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'élaboration de biomatériaux biomimétiques, l'évaluation de la cytocompatibilité et l'étude en cytodynamique des interactions cellulaires avec des biomatériaux.

Dans une première partie, nous nous intéresserons au tissu osseux, au processus de remodelage auquel il est soumis et les différents traitements thérapeutiques qui agissent sur les ostéoblastes et les ostéoclastes. Nous décrirons les processus de minéralisation, ainsi que les particularités du minéral osseux. Enfin, nous nous intéresserons aux différentes modifications de surface des biomatériaux qui favorisent les interactions cellules/matériaux et qui permettent de développer des matériaux biomimétiques. La deuxième partie sera consacrée à la présentation, sous forme d'articles, des résultats obtenus. Nous avons étudié l'influence d'un revêtement de type RGD sur du titane sur l'adhésion, la prolifération et la

minéralisation des cellules ostéoblastiques. La mise au point d'une technique de vidéomicroscopie nous a permis d'observer les premières étapes de la colonisation de particules de β -TCP par des cellules de type ostéoblastique et des macrophages. La calcification *in vitro* de nanotubes de carbone nous a permis de développer un matériau biomimétique possédant des caractéristiques similaires au woven bone. Ce modèle est dérivé du modèle de calcification *in vitro* du pHEMA qui nous a permis de tester l'influence des ions strontium (Sr^{2+}) sur les propriétés du minéral osseux et l'évolution de son élution dans un milieu reproduisant le milieu biologique. Enfin, la troisième partie exposera les conclusions et perspectives de ce travail.

I. Tissu osseux

1. Généralités

Le tissu osseux est un matériau composite, hétérogène, anisotrope et dynamique. La matrice osseuse est constituée de deux phases : 30% de phase organique et 70% de phase minérale. La phase organique, synthétisée par les ostéoblastes, est une matrice extracellulaire (MEC) protéique essentiellement constituée de fibres de collagène de type I qui confèrent à l'os son élasticité (Landis, 1995; Abraham *et coll.*, 2008). La phase minérale se compose principalement de cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$ (HAP) qui se déposent à partir de la matrice organique et confèrent à l'os sa rigidité (Weiner *et coll.*, 1999). La phase organique influence la nucléation et la croissance de la phase minérale. De par sa composition, le tissu osseux assure plusieurs fonctions : il est le principal réservoir d'ions calcium, magnésium et phosphate (99 % du calcium et 90 % du phosphate se trouvent dans le squelette). Il a une fonction métabolique en libérant ou en absorbant ces ions dans l'organisme selon les besoins ; il est l'hôte de la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse, qui contient les précurseurs des cellules sanguines soutenues par le tissu stromal composé de nombreuses cellules (fibroblastes, cellules endothéliales et adipocytes). Le tissu osseux joue un rôle de protection des organes internes essentiels vis-à-vis des contraintes mécaniques (cerveau, cœur, poumon, moelle épinière). Il permet enfin les déplacements en supportant le poids du corps et en s'adaptant aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis.

Il y a deux types d'os : l'os dense et compact ou os cortical (80%), qui constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts, et l'os trabéculaire (20%) qui constitue les épiphyses et les métaphyses des os longs et l'intérieur des os plats et des os courts. L'os trabéculaire est constitué d'un réseau en trois dimensions de plaques et de piliers adapté aux contraintes mécaniques que subit l'os. La moelle osseuse hématopoïétique est localisée dans la diaphyse des os longs et dans les espaces médullaires délimités par les travées (Whitehouse *et coll.*, 1971). L'orientation des travées dépend des lignes de contraintes mécaniques et de tensions musculaires auxquelles est soumis l'os. Une telle adaptation est connue sous le nom de loi de Wolff. La microarchitecture du réseau trabéculaire est maintenant reconnue comme un signe révélateur de la qualité osseuse (Chappard *et coll.*, 2008).

Pour s'adapter aux différentes contraintes mécaniques, le tissu osseux mature est en perpétuel remaniement (ou remodelage) sous l'influence de facteurs hormonaux et de facteurs locaux (cytokines et facteurs de croissance). Le processus de remodelage comprend 1) une phase de

résorption pendant laquelle une partie de l'os est détruite par les ostéoclastes, 2) une phase de quiescence et 3) une phase de formation où les ostéoblastes élaborent une nouvelle unité de structure faite de matrice calcifiée et mieux adaptée mécaniquement ou métaboliquement. L'ensemble cellules/facteurs/matrice constitue le microenvironnement osseux, responsable de l'activité concertée et synchrone des ostéoblastes et ostéoclastes permettant le remodelage du tissu osseux. Toute modification du microenvironnement osseux peut amener à une rupture de l'équilibre résorption/formation, à l'origine de nombreuses ostéopathies. Les modifications peuvent être d'origine métabolique comme l'ostéoporose provoquée par la chute des stéroïdes sexuels à la ménopause. Dans les ostéopathies d'origine génétique, comme l'ostéogénèse imparfaite, l'altération d'un gène induit une diminution de l'activité des ostéoblastes.

2. Le remodelage osseux

a) Résorption

Les ostéoclastes sont les cellules spécialisées de la résorption osseuse. Ils sont localisés à la surface de la matrice osseuse minéralisée. Les ostéoclastes sont dérivés de précurseurs de la lignée des monocytes/macrophages hématopoïétiques de la moelle osseuse (Boyle *et coll.*, 2003). L'ostéoclaste est formé par la fusion de précurseurs, c'est une cellule multinucléée de grande taille qui possède en moyenne 8 noyaux chez l'homme. Il peut atteindre 100 noyaux pour les ostéoclastes pathologiques de la maladie de Paget (Roodman et Windle, 2005). Les ostéoclastes font 50 à 150 μm de diamètre, alors que les macrophages mesurent 10 à 20 μm de diamètre.

L'ostéoclastogénèse nécessite des interactions étroites entre les précurseurs, les cellules stromales/ostéoblastes. Elle est régulée par des facteurs sécrétés par les ostéoblastes et les cellules stromales du microenvironnement osseux. La différenciation en ostéoclastes matures est étroitement liée à la présence du microenvironnement osseux (Teitelbaum, 2000). Les cellules du microenvironnement osseux synthétisent le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) et expriment le ligand du récepteur activator du nuclear factor kappa B (RANKL) qui sont deux molécules essentielles pour induire l'ostéoclastogénèse. Le M-CSF est nécessaire à la maturation des macrophages et se lie à son récepteur, le c-Fms, sur les précurseurs ostéoclastiques délivrant le signal pour la prolifération (Teitelbaum, 2000). RANKL appartient à la superfamille des TNF (tumor necrosis factor), elle est synthétisée par les cellules stromales et active la différenciation en se fixant au récepteur RANK présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Ces deux facteurs sont nécessaires à l'activation de

gènes comme par exemple ceux codant pour la phosphatase acide tartrate résistante (TRAcP) et la cathepsine K qui sont des marqueurs caractéristiques des ostéoclastes matures. L'ostéoprotégérine (OPG) est un facteur soluble, sécrété par les ostéoblastes et qui régule négativement l'ostéoclastogenèse en se fixant sur RANKL.

Au contact du tissu osseux, l'ostéoclaste comporte une membrane plasmique différenciée avec constitution d'une bordure plissée (ruffled border), limitée latéralement par deux zones de cytoplasme pauvre en organites (sealing zone) qui servent pour l'ancrage cellulaire à la matrice. Cette zone périphérique présente de nombreuses molécules d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ (se liant à la vitronectine, l'ostéopontine) et $\alpha_2\beta_1$ (pour le collagène de type I). Les intégrines reconnaissent les séquences RGD (séquence peptidique Arg-Gly-Asp, impliquée dans l'adhésion cellulaire) des protéines non collagéniques (PNC) et sont couplées aux molécules d'actine du cytosquelette qui forment un anneau circonférentiel (Ross et Teitelbaum, 2005). Cette région est donc un espace clos, une chambre de résorption dans laquelle la résorption matricielle va avoir lieu. La résorption se fait en deux temps : dissolution de la phase minérale puis dégradation de la matrice organique. La bordure plissée est le siège d'une libération massive de protéases et de protons dans la chambre de résorption. La présence d'ions H^+ acidifie le milieu, conduisant à la déminéralisation de la matrice. Dans le deuxième temps, l'ostéoclaste libère dans la chambre de résorption le contenu de ses lysosomes, riches en métalloprotéases (gélatinase, collagénase de type I et IV, stromélysine, MMP1 et cathepsine K) (Li *et coll.*, 1999). Les produits de dégradation sont ensuite internalisés par endocytose puis transportés par un système de transcytose au pôle basolatéral où ils sont déversés dans le microenvironnement médullaire (Nesbitt et Horton, 1997). Certaines enzymes lysosomales sont utilisées comme marqueurs histologiques pour identifier les ostéoclastes, c'est le cas de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAcP) qui assure la fin de la dégradation du collagène en intra-cytoplasmique. La zone de dégradation dans laquelle la matrice calcifiée a été éliminée est appelée lacune de Howship. Au fur et à mesure que l'ostéoclaste résorbe, le calcium ionisé libéré est réabsorbé à travers la membrane plasmique. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} entraîne alors une dépolarisation de l'anneau périphérique d'actine. Celui-ci étant lié aux molécules d'adhérence, l'ostéoclaste va alors se détacher de la surface osseuse. Au bout de quelque temps, la concentration intracellulaire en calcium diminue par un phénomène de « wash out » et la cellule peut alors reconstituer son anneau d'actine et se repositionner quelques micromètres plus loin pour effectuer une nouvelle zone d'érosion.

b) Formation

L'ostéoblaste est la cellule chargée de synthétiser et de participer à la minéralisation de la matrice osseuse. C'est une cellule mononucléée fonctionnant toujours en groupe. L'ostéoblaste est une cellule grossièrement cubique ou prismatique formant des tapis cellulaires plus ou moins étendus à la surface des travées osseuses. Le pôle basal de l'ostéoblaste est en contact avec la surface osseuse sur laquelle il va déposer la nouvelle matrice. Le pôle apical de la cellule reste en contact avec les cellules de la moelle hématopoïétique. Les membranes plasmiques des ostéoblastes comportent des systèmes de jonction intercellulaire et de type gap. Ces jonctions permettent le passage de molécules de petite taille, inférieures à 1000 Da, qui autorisent le couplage électrochimique des ostéoblastes. Les jonctions gap synchronisent les ostéoblastes d'un même groupe pour synthétiser les fibrilles de collagène et les déposer en harmonie sous forme de lamelles, fabriquant ainsi une unité de structure régulière.

L'ostéoblaste dérive d'une cellule souche d'origine mésenchymateuse présente dans les espaces médullaires. Cette cellule souche, ou CFU-F fibroblastique, est appelée aussi cellule stromale ou cellule de Westen-Bayton (Owen, 1988). L'ostéoblastogenèse est régulée par des facteurs de transcription spécifiques tels que Runx2, ostérix et β -caténine (voie de signalisation Wnt). Des facteurs de transcription régulateurs tels qu'AP1, Dlx-5 et Msx-2, par exemple, sont aussi nécessaires (Marie, 2008). Le contrôle de la formation osseuse fait également intervenir des facteurs systémiques hormonaux (PTH, œstrogènes, glucocorticoïdes et vitamine D) et des facteurs locaux (BMP-2, TGF- β , IGF, FGF) produits par les ostéoblastes eux-mêmes, incorporés dans la matrice nouvellement formée et libérés lors de la résorption. Enfin, des facteurs externes viennent aussi réguler l'ostéoblastogenèse tels que les forces mécaniques exercées sur le squelette (Ahdjoudj *et coll.*, 2002). L'ostéoblaste mature produit en abondance de la phosphatase alcaline (AlkP), qui va intervenir lors du processus de minéralisation.

Dans l'os mature, lorsque les ostéoblastes commencent à élaborer une nouvelle unité de structure (BSU, basic unit structure), une des premières PNC synthétisée serait la bone sialoprotéine (BSP) (Figure 1). Déposée ainsi au niveau des lignes cémentantes, elle permet de déclencher la minéralisation de la nouvelle unité de structure. D'autres PNC, telles que la laminine (LN), la fibronectine (FN) et l'ostéopontine (OSP) (Cowles *et coll.*, 1998) sont incorporées à la matrice et permettent l'adhésion cellulaire. Par la suite, les ostéoblastes

cessent de synthétiser la BSP mais continuent d'enfouir au sein du collagène des facteurs de croissance (TGF- β , IGF (insuline growth factor), BMP (bone morphogenetic protein)), ainsi que l'AlkP. Ils élaborent ainsi une couche de matrice osseuse non minéralisée appelée tissu ostéoïde. L'AlkP est déposée de façon continue en extracellulaire par les ostéoblastes. La minéralisation qui débute au niveau de la ligne cémentante va se propager par nucléation secondaire à partir des cristaux déjà formés ; la jonction entre tissu ostéoïde et tissu préalablement minéralisé est le front de minéralisation.

Au cours de la formation d'une BSU, certains ostéoblastes se transforment en ostéocytes. On estime qu'un ostéoblaste sur 40 va arrêter de synthétiser de la matrice osseuse. Comme il est uni par des prolongements aux ostéocytes plus profondément enfouis par l'intermédiaire des jonctions gap, il va progressivement être recouvert par de nouvelles lamelles élaborées par les ostéoblastes voisins. L'ostéocyte est donc un ostéoblaste progressivement emmuré au sein d'une logette (ostéoplaste) ménagée dans la matrice osseuse. A la fin de l'élaboration d'une BSU, 60 % des ostéoblastes disparaissent par apoptose, les autres se transforment en cellules bordantes (lining cells). Ce sont des cellules aplaties, très fines, tapissant la totalité des surfaces osseuses (en dehors de celles recouvertes par les ostéoblastes et les ostéoclastes). Elles restent séparées de la surface minéralisée par une fine couche de collagène non minéralisée. Ces cellules n'ont été observées que tardivement. Il s'agit d'ostéoblastes ayant progressivement arrêté leur fonction de synthèse et restant à la surface de l'os. Cependant, elles restent en contact les unes avec les autres par l'intermédiaire de jonctions gap et communiquent aussi avec les ostéocytes de la profondeur en recevant des informations qui transitent par leurs prolongements. Les cellules bordantes peuvent se redifférencier en ostéoblastes pour effectuer localement de nouvelles appositions osseuses ; dans ce cas, on parle de modelage (par exemple au contact de biomatériaux) car il n'y a pas de résorption osseuse préalable.

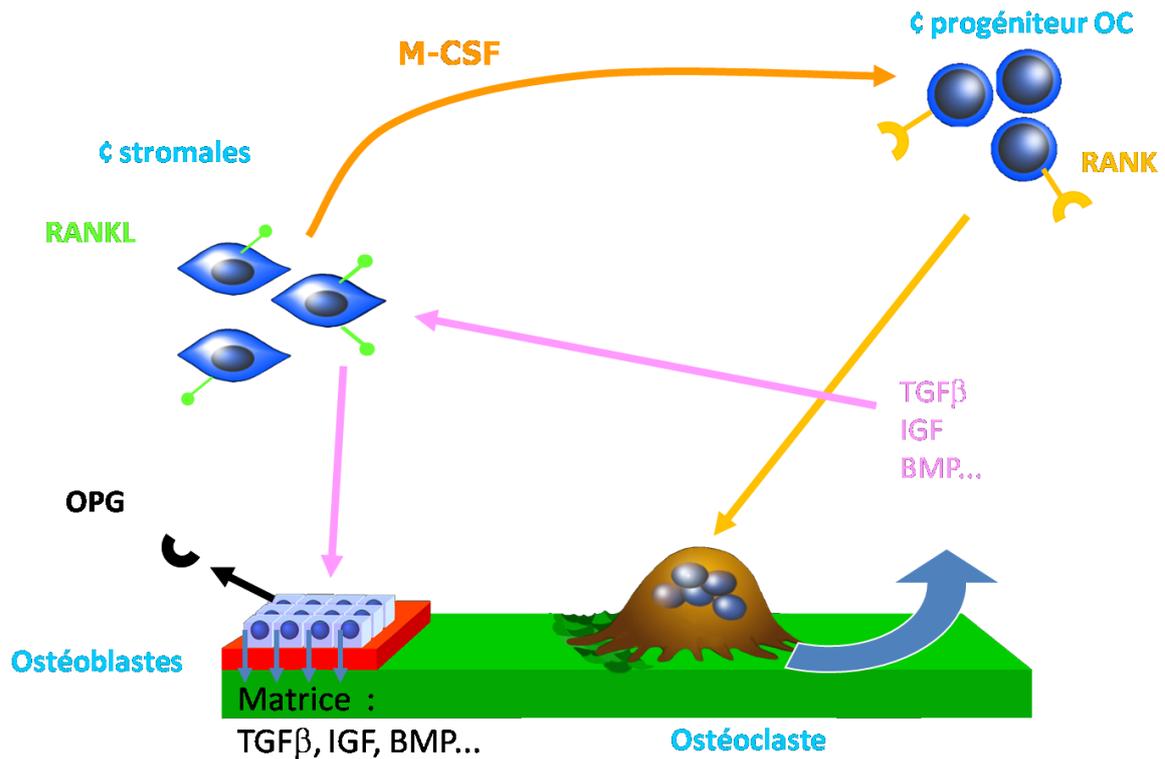


Figure 1 : Interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes au cours du remodelage osseux. Couplage résorption/formation.

II. Ostéoblastes et ostéoclastes : cibles thérapeutiques

Parmi les dérèglements du remodelage osseux, l'ostéoporose est reconnue comme problème de santé publique. Ses origines sont principalement liées à la privation des œstrogènes lors de la ménopause, elles peuvent aussi être d'origine génétique ou liées à l'âge. L'ostéoporose peut également être induite par certaines pathologies comme les affections endocriniennes (hyperparathyroïdie, hyperthyroïdie, hypercorticisme, hypogonadisme) ou l'ostéogénèse imparfaite. Elle peut aussi être induite par certains traitements, notamment la corticothérapie prolongée par voie générale. Le tabac et l'alcool sont des facteurs étiologiques actuellement reconnus de la maladie. A l'échelle cellulaire, la perte osseuse se produit à cause d'un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse. Au niveau du minéral, les cristaux d'HAP deviennent plus grands, et entraînent l'augmentation de la rigidité, induisant ainsi une plus grande fragilité des os (Boskey, 1990).

Les traitements peuvent être préventifs en améliorant l'hygiène de vie. L'activité physique et la supplémentation vitamino-calcique permettent d'éviter la réduction de masse osseuse ainsi

que le renforcement musculaire et donc une diminution du risque de chute (Bischoff-Ferrari *et coll.*, 2004; Holick, 2007). Des traitements médicamenteux par substitution hormonale peuvent agir sur la régulation du recrutement ostéoclastique. Ces traitements ont montré une amélioration des risques fracturaires mais présentent aussi des risques d'augmentation du cancer du sein ainsi que des problèmes cardiovasculaires chez les personnes les plus âgées (Rossouw *et coll.*, 2002; Anderson *et coll.*, 2004). Les agents antirésorbants (bisphosphonates) vont agir directement sur l'ostéoclaste mature en réduisant le remodelage osseux ce qui a pour conséquence d'augmenter la minéralisation secondaire du tissu osseux et de préserver la micro-architecture trabéculaire (Sambrook et Cooper, 2006). Une nouvelle catégorie de traitements agissant sur le recrutement ostéoclastique (Denosumab) fait son apparition, les anticorps monoclonaux ciblent spécifiquement le système RANK/RANKL. Le ranélate de strontium (PROTELOS[®], laboratoires SERVIER); composé d'une molécule organique et de deux atomes de strontium, est capable de réduire la résorption et de stimuler la formation osseuse.

1. Les bisphosphonates

Ce sont les molécules les plus fréquemment utilisées dans le traitement de l'ostéoporose ainsi que pour le traitement de l'ostéolyse associée aux métastases osseuses (Ghoneima *et coll.*, 2010). Les bisphosphonates agissent comme supprimeurs de l'activité ostéoclastique et interfèrent dans le mécanisme de recrutement ostéoclastique, notamment sur la fusion des précurseurs ostéoclastiques (Sarin *et coll.*, 2008). Ils permettent d'augmenter la densité minérale osseuse et de réduire le risque de fracture de 50 % (Raisz, 1997). La structure P-C-P et la présence de radicaux -OH sur les deux phosphates latéraux confèrent aux bisphosphonates une forte affinité pour l'HAP (Rogers *et coll.*, 2000). Ils sont donc rapidement liés à la surface du minéral osseux *in vivo*, en particulier sur les sites de résorption (Roelofs *et coll.*, 2006). Les bisphosphonates induisent l'apoptose des ostéoclastes (Rogers *et coll.*, 2000) et inhibent l'expression de RANKL à la surface des cellules stromales, tout en favorisant la production d'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes. Néanmoins, des ostéonécroses de la mâchoire ont été rapportées ainsi que des échecs d'ostéointégration d'implants après l'administration de bisphosphonates dans le cadre d'une ostéoporose ce qui pourrait traduire une augmentation de la rigidité osseuse et une inadaptation aux contraintes mécaniques (Starck et Epker, 1995; Donoghue, 2005; Hellstein et Marek, 2005).

2. Dénosumab

Le dénosumab est un anticorps monoclonal qui neutralise spécifiquement RANKL, à la manière de l'OPG, et empêche donc l'activation du récepteur RANK et la stimulation de l'ostéoclastogenèse. Cliniquement, le dénosumab permet l'augmentation de la densité minérale osseuse et diminue la résorption osseuse chez la femme ménopausée présentant une faible densité minérale osseuse avant le traitement (McClung *et coll.*, 2006). Il est donc actif dans le traitement de l'ostéoporose, des complications liées aux métastases osseuses, de l'arthrite rhumatoïde et des tumeurs osseuses à cellules géantes (McClung *et coll.*, 2006; Ellis *et coll.*, 2008). Les études cliniques de phase III réalisées sur des femmes atteintes d'ostéoporose post-ménopausique et d'hommes atteints de cancer de la prostate ont montré une diminution des risques de fracture (Cummings *et coll.*, 2009).

En Europe, l'homologation du dénosumab a été recommandée par l'Agence européenne des médicaments (EMA) au mois de décembre 2009. En revanche, la Food and Drug Administration (FDA) américaine n'a pas encore approuvé le médicament et sollicite un complément d'informations.

3. Ranélate de strontium

Le ranélate de strontium se compose de 2 atomes stables de Sr^{2+} combinés à un anion organique, l'acide ranélique, qui est la molécule porteuse (Marie, 2005) (Figure 2). Le strontium est un élément qui est présent sous forme de traces dans l'organisme (Pors Nielsen, 2004). Le ranélate de strontium a un double mode d'action ; il découple la résorption et la formation osseuse (Marie *et coll.*, 1993). Il stimule la formation osseuse tout en s'opposant à la résorption (Bonnelye *et coll.*, 2008).

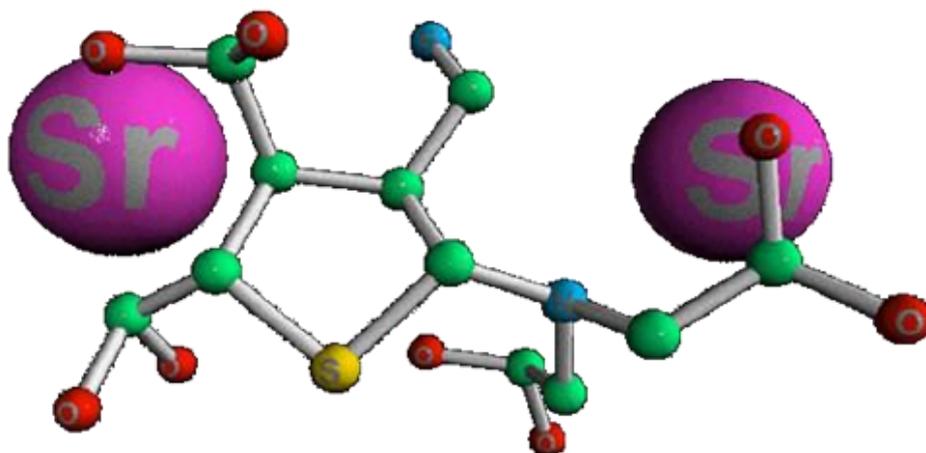


Figure 2 : Molécule de ranélate de strontium.

a) Effet du ranélate de strontium *in vitro*

i. Sur les ostéoblastes

In vitro, sur des ostéoblastes de rat, le ranélate de strontium augmente la réplication des pré-ostéoblastes, la synthèse de collagène et la formation osseuse (Canalis *et coll.*, 1996). L'effet du strontium sur la minéralisation de cellules ostéogéniques, dérivées de la voûte crânienne de souris (MC3T3-E1), a été testé durant 14 jours de culture ; le strontium induit une augmentation de la synthèse de collagène et de l'activité AlkP. D'autre part, il s'incorpore de façon dose dépendante dans les nodules calcifiés sans altérer la matrice minéralisée (Barbara *et coll.*, 2004). Des études menées sur des cellules hématopoïétiques ont montré que le strontium augmentait de façon dose dépendante l'activité AlkP, la production de BSP et d'ostéocalcine, indiquant une augmentation de la différenciation ostéoblastique (Choudhary *et coll.*, 2003; Choudhary *et coll.*, 2007; Zhu *et coll.*, 2007; Bonnelye *et coll.*, 2008). Le strontium stimule aussi la formation de nodules osseux et l'ostéogenèse en augmentant la production de prostaglandine E2 (PGE2) à travers son action sur l'expression de la cyclooxygénase-2 (Choudhary *et coll.*, 2003; Choudhary *et coll.*, 2007).

Sur des cultures primaires d'ostéoblastes humains, le ranélate de strontium augmente la réplication des ostéoblastes et induit une différenciation des ostéoblastes en ostéocytes de façon dose et temps dépendants (Atkins *et coll.*, 2009). Ces résultats sont en corrélation avec l'augmentation de la formation osseuse observée sur les animaux traités par strontium. Ainsi, le ranélate de strontium est capable d'augmenter le nombre et de stimuler l'activité des

ostéoblastes dans plusieurs modèles cellulaires, mettant ainsi en évidence les effets formateurs du strontium *in vitro*.

ii. Sur les ostéoclastes

Sur un modèle d'ostéoclastes de rat en culture, le strontium réduit l'activité de résorption des cellules (Baron et Tsouderos, 2002; Takahashi *et coll.*, 2003). La présence de strontium dans les cultures de cellules hématopoïétiques de poulet entraîne une diminution de l'expression des marqueurs ostéoclastiques tels que l'anhydrase carbonique de type II et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Baron et Tsouderos, 2002). L'anhydrase carbonique de type II intervient dans le processus d'acidification au niveau de la chambre de résorption créée par l'ostéoclaste. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur à la vitronectine impliqué dans l'attachement, la réorganisation de l'anneau d'actine et la mobilité des ostéoclastes ; néanmoins, aucun effet sur l'adhésion des ostéoclastes issus des cellules hématopoïétiques de poulet n'a été observé (Baron et Tsouderos, 2002). Le strontium entraîne aussi une diminution du nombre, de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes en culture (Mentaverri *et coll.*, 2006; Bonnelye *et coll.*, 2008). Des études récemment menées sur des cultures primaires d'ostéoclastes matures de lapin ont montré que le strontium stimule l'apoptose des ostéoclastes matures en agissant sur le calcium sensing receptor (CaSR) qui stimule une voie de signalisation dépendante de la phospholipase C et une translocation nucléaire de NF- κ B (Hurtel-Lemaire *et coll.*, 2009).

Les données actuelles indiquent que le ranélate de strontium réduit la résorption osseuse *in vitro* en diminuant le recrutement, la différenciation et la durée de vie des ostéoclastes. Ces données, associées aux effets observés sur les ostéoblastes, indiquent que le ranélate de strontium a des effets proformateurs et antirésorbeurs *in vitro* (Marie, 2006).

b) Mécanismes moléculaires d'action du strontium

Le ranélate de strontium agit sur différents mécanismes intracellulaires (Marie, 2006). Le strontium active le CaSR entraînant ainsi une augmentation de la production d'inositol triphosphate (IP3) et l'activation de la voie de signalisation mitogen-activated protein kinase (MAPK) avec pour conséquence la stimulation de la réplication des ostéoblastes (Brown, 2003; Coulombe *et coll.*, 2004). Le strontium active également l'extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) via le CaSR entraînant une stimulation de la réplication des ostéoblastes (Fromigué *et coll.*, 2009) (Figure 3). L'effet du strontium sur les ostéoclastes semble également dû à une action sur le CaSR (Brown, 2003). Les ostéoclastes expriment le CaSR et son activation par le strontium induit l'apoptose des ostéoclastes (Mentaverri *et coll.*, 2006).

Le strontium agit aussi en régulant la production de RANKL et d'OPG. *In vitro*, sur des cultures primaires d'ostéoblastes humains, le strontium inhibe la synthèse de RANKL et augmente la synthèse d'OPG diminuant ainsi le ratio RANK/OPG. Ces données ont pour conséquence une régulation négative de l'ostéoclastogenèse (Atkins *et coll.*, 2009; Brennan *et coll.*, 2009).

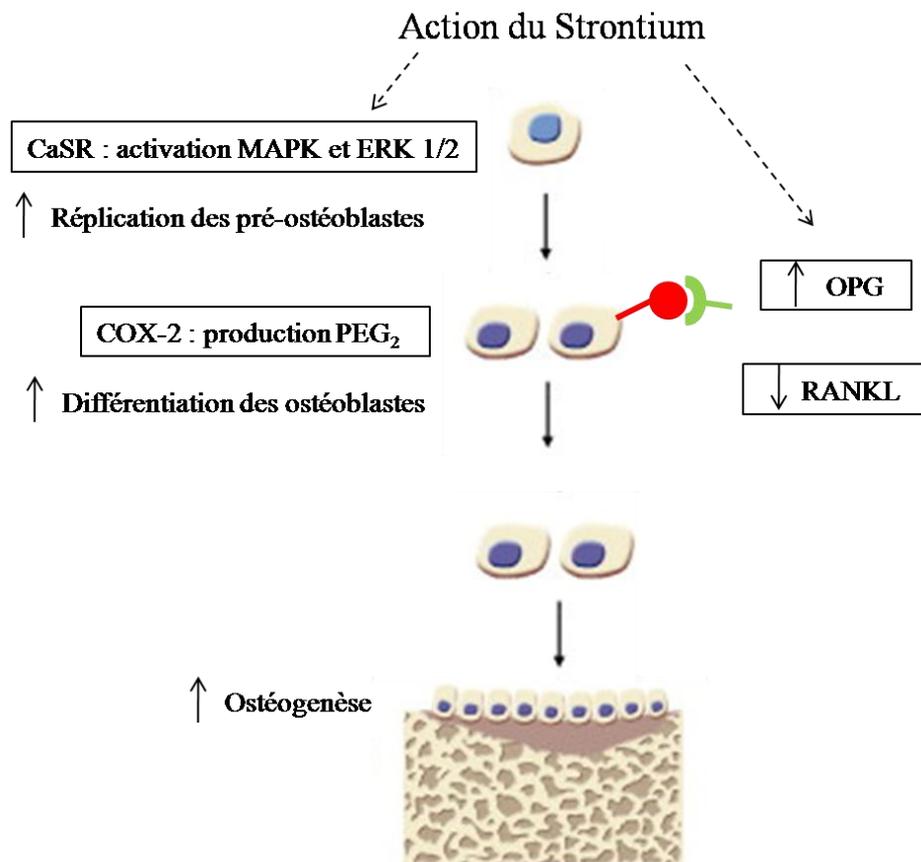


Figure 3 : Mécanismes d'action du ranélate de strontium sur les ostéoblastes. Le strontium stimule la formation osseuse en activant les voies de signalisations MAPK et ERK1/2 via le CaSR et en augmentant la production de PGE₂ à travers son action sur l'expression de COX-2 (Marie, 2007).

c) Effet du ranélate de strontium *in vivo*

Chez la souris, le ranélate de strontium augmente la formation osseuse et diminue la résorption, ce qui entraîne une augmentation de la masse osseuse vertébrale évaluée par histomorphométrie (Delannoy *et coll.*, 2002). Les mêmes effets ont été observés chez le singe adulte (Buehler *et coll.*, 2001). Chez le rat, le ranélate de strontium induit une augmentation

du volume trabéculaire au niveau vertébral et fémoral, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur et du nombre de travées ; une diminution de l'espace entre les travées a également été observée. Ces données suggèrent l'amélioration des propriétés mécaniques au niveau axial (Ammann *et coll.*, 2004). Dans ce modèle, une augmentation de l'épaisseur de l'os cortical au niveau des vertèbres lombaires et du fémur a également été observée (Ammann *et coll.*, 2004). L'analyse par nano-indentation de vertèbres de rat a montré que l'élasticité de l'os est améliorée (Ammann *et coll.*, 2007). Le ranélate de strontium a donc pour effet d'augmenter la quantité et la qualité de l'os, ce qui entraîne une augmentation de la résistance osseuse dans l'os vertébral et appendiculaire chez les animaux sans ostéopénie.

Le ranélate de strontium a aussi été testé sur des modèles animaux d'ostéopénie comme la rate ovariectomisée, qui reproduit la perte osseuse trabéculaire de la femme ménopausée. Dans ce modèle, le traitement au ranélate de strontium pendant 3 mois prévient l'ostéopénie fémorale et la perte osseuse trabéculaire (Marie *et coll.*, 1993). Après un an de traitement, dans le modèle animal, le ranélate de strontium préserve la microarchitecture et la masse osseuse au niveau trabéculaire (Bain *et coll.*, 2009).

Dans un modèle d'ostéopénie induite par immobilisation, le ranélate de strontium prévient la perte osseuse en augmentant la densité minérale osseuse et le volume trabéculaire (Hott *et coll.*, 2003).

d) Incorporation du strontium dans le cristal osseux

Les effets du ranélate de strontium sur le cristal osseux du singe ont été étudiés. L'incorporation du strontium est plus élevée dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical et plus particulièrement dans l'os nouvellement formé (Boivin *et coll.*, 1996). L'incorporation dans l'os est dose dépendante mais reste faible. Le ranélate de strontium s'incorpore principalement à la surface hydratée des cristaux d'HAP et de façon faible dans le cristal avec seulement 1 atome de Ca^{2+} sur 10 qui sera remplacé par un atome de strontium (Farlay *et coll.*, 2005). L'incorporation du strontium n'affecte pas la formation du cristal ni ses propriétés physico-chimiques ou cristallographiques. L'accumulation du strontium dans l'os atteint rapidement un palier et l'incorporation du strontium dans le minéral serait réversible après l'arrêt du traitement.

Chez le singe, 6 semaines après l'arrêt d'un traitement de 13 semaines, environ 50 % de la quantité de strontium incorporée dans l'os a été éluee (Boivin *et coll.*, 1996). Récemment, une

évaluation de la rétention du strontium dans l'os humain a été réalisée à partir d'une nouvelle méthode de mesure non invasive en DPA (Dual Photon Absorptiometry) (Barenholdt *et coll.*, 2009). Des mesures réalisées sur des patientes ont indiqué que 73 et 67 % du strontium est encore présent dans le radius, respectivement, après 3 et 6 mois d'arrêt du traitement. Mais la méthode de calcul est basée sur un modèle d'exposition au radium radioactif (Marshall, 1969) qui n'a jamais été démontré comme similaire à celui de la rétention du strontium dans l'os. De plus, la faible reproductivité des mesures implique que ce modèle ne peut pas être utilisé pour suivre la quantité de strontium restant dans l'os.

III. Minéralisation du tissu osseux

Le processus de minéralisation est très complexe et les mécanismes sont différents suivant les tissus (Christoffersen et Landis, 1991). Il existe deux processus de minéralisation chez l'homme ; 1) lorsque le tissu osseux est apposé par modelage rapide, la calcification est initiée par des vésicules matricielles (MVs). C'est le cas de l'ossification enchondrale et membranaire, de l'os métaplasique - woven bone. Dans le woven bone, les ostéoblastes travaillent en accéléré et les fibres de collagène sont déposées de façon anarchique avec des orientations variables (Su *et coll.*, 1997), sans organisation lamellaire. L'HAP se dépose à la surface et dans les espaces extrafibrillaires des fibres de collagène. Le dépôt d'HAP dans le woven bone se fait grâce à l'intervention de MVs et abouti à la formation de calcosphérites (Figure 4).

2) lorsque du tissu osseux nouveau est apposé dans le cadre du remodelage, des PNC, comme la BSP, semblent au premier plan. C'est le cas dans l'os adulte. La minéralisation débute par une phase de nucléation primaire qui correspond à la formation d'un nucléus critique. Ce nucléus critique va alors servir de base à la propagation des cristaux lors de la phase de nucléation secondaire.

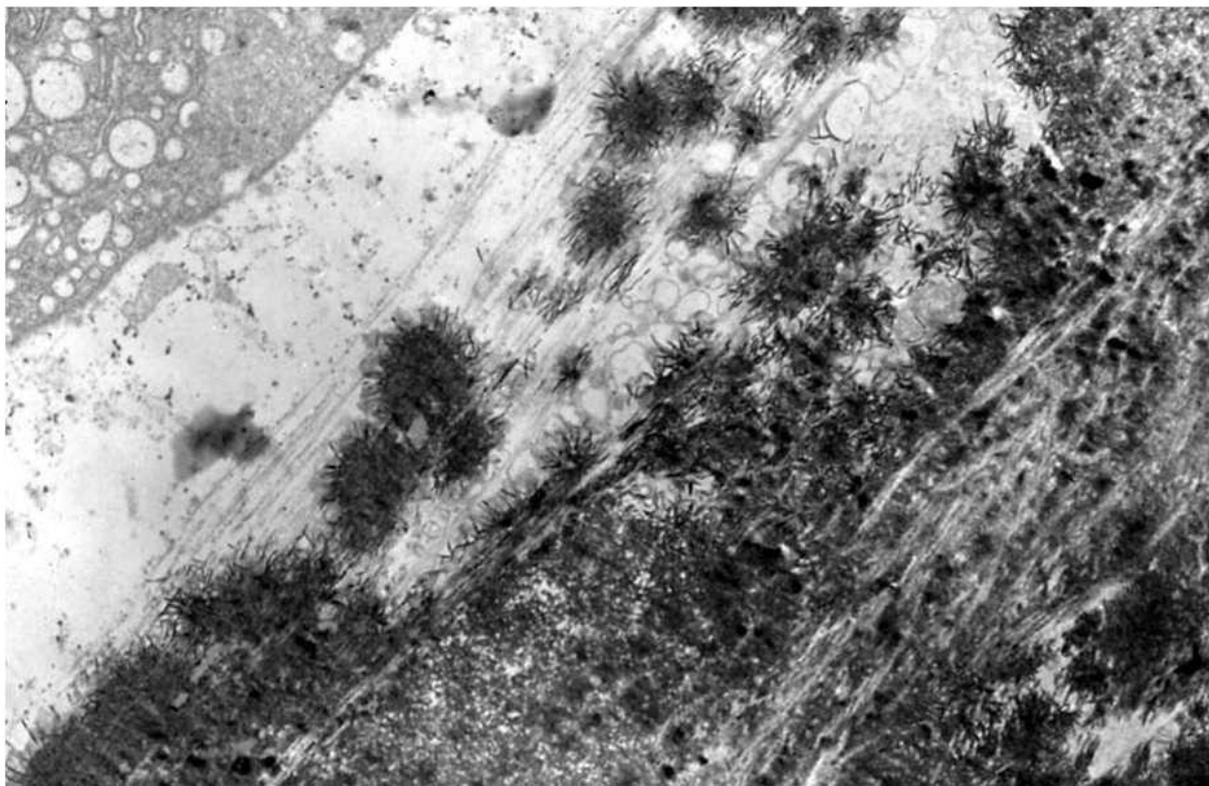


Figure 4 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de calcosphérites formés dans la trame collagénique du woven bone chez le fœtus humain.

1. Nucléation primaire dans le woven bone

Les MVs ont été découvertes en 1969 dans le cartilage (Anderson, 1969). Ces organelles extracellulaires mesurent environ 100 nm de diamètre (Garimella *et coll.*, 2004) et sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique de chondrocytes hypertrophiques (Rabinovitch et Anderson, 1976; Wuthier *et coll.*, 1977) et de la membrane apicale des ostéoblastes (Thouvery *et coll.*, 2009). Elles sont impliquées dans la calcification initiale de la MEC en provoquant la nucléation d'HAP dans leur lumière (Anderson, 1995; Anderson, 2003). Cette zone centrale est riche en molécules favorisant la nucléation (lipoprotéines et phospholipides acides, anchorine, calcium et phosphates inorganiques (Pi)), plusieurs types d'enzymes (AlkP, ATPase, anhydrase carbonique, protéases...) et des molécules transporteuses d'ions : les annexines II, V et VI (Hessle *et coll.*, 2002; Anderson *et coll.*, 2005; Stewart *et coll.*, 2006). La zone centrale de la vésicule constitue un espace favorable pour la création d'un nucleus critique car elle permet d'augmenter localement le rapport Ca/P (Kirsch *et coll.*, 2000; Balcerzak *et coll.*, 2008). A partir du nucleus critique, la cristallisation se poursuit car les enzymes de la membrane recrutent localement les ions nécessaires :

la AlkP hydrolyse les esters de phosphates et permet la libération des ions PO_4^{3-} qui s'accumulent localement, les annexines permettent le transport des ions dans la vésicule (Figure 5).

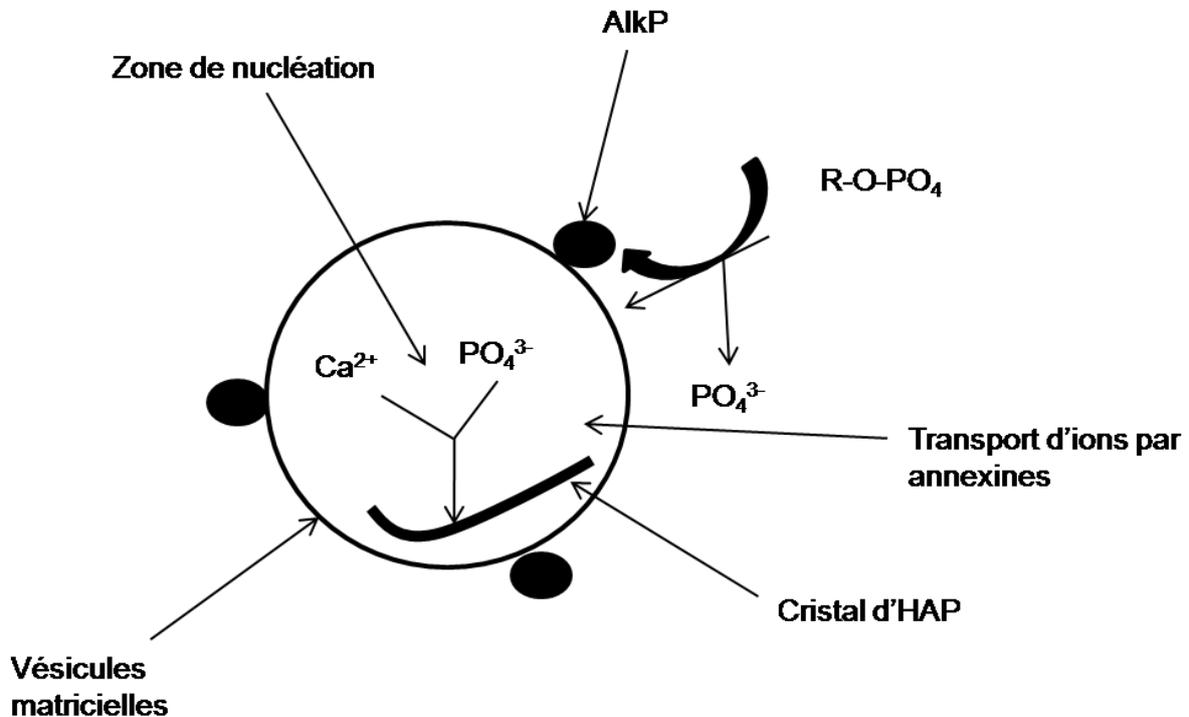


Figure 5 : Nucléation primaire au niveau des vésicules matricielles.

Le premier nucleus sert de matrice pour la croissance et la propagation cristalline. L'augmentation du volume des cristaux provoque la rupture de la membrane des vésicules. Ils se trouvent alors exposés aux liquides extra-cellulaires et servent de foyer pour une nucléation secondaire (Kirsch *et coll.*, 2000) (Figure 6). Ultérieurement, les cristaux d'HAP, sous forme d'aiguilles, s'assemblent pour constituer des nodules calcifiés (calcosphérites) car la calcification se propage en milieu viscoélastique qui permet une propagation cristalline dans toutes les directions (Wu *et coll.*, 2003). Les protéines chargées négativement contenues dans la MEC, telle que l'ostéocalcine ou la fibronectine, interagissent avec les cristaux pour contrôler leur grossissement, leur orientation et leur taille. Dans le woven bone, la minéralisation est très rapide. Cependant, les cristaux d'HAP sont identiques à ceux trouvés dans l'os mature, mais plus petits (Landis *et coll.*, 1993; Su *et coll.*, 2003).

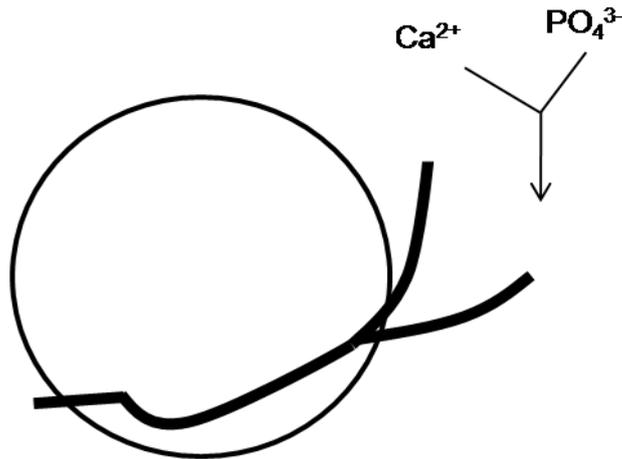


Figure 6 : Rupture de la membrane de la vésicule et croissance des cristaux à l'extérieur des vésicules.

2. Nucléation primaire dans l'os mature

Le collagène a longtemps été pensé comme le site de la nucléation de l'HAP. Cependant, la purification de la matrice osseuse décalcifiée, en particulier l'ablation des protéines phosphorylées, empêche la re-minéralisation du collagène après implantation (Mergenhagen *et coll.*, 1960). Une fois que les PNC ont été extraites, la minéralisation *in vitro* du collagène n'est plus possible (Terminé *et coll.*, 1981). Ces observations ont confirmé que les PNC servent d'agents nucléateurs pour l'initiation de la calcification. De nombreuses PNCs ont ainsi été isolées de la matrice osseuse : l'ostéopontine (OPN), la BSP, les glycoprotéines acides (BAG-75), la fibronectine, la matrice GLA protéine, la décorine...

Ces protéines ont comme caractéristique commune la présence de nombreux sites anioniques qui leurs permettent de fixer les ions calcium en solution ou de s'adsorber à la surface de l'HAP. L'ostéocalcine, la plus abondante des PNC chez l'humain, est porteuse de 3 charges négatives en surface. Il a donc été pensé que cette protéine pourrait initier la nucléation de l'HAP grâce à la forte affinité des groupements -COOH pour les ions Ca^{2+} (Hoang *et coll.*, 2003). Mais il apparaît que cette protéine n'est pas présente dans le tissu ostéoïde, mais seulement dans l'os minéralisé. En revanche, l'ostéocalcine semble réguler la maturation des cristaux en inhibant leur grossissement (Hauschka et Wians, 1989).

L'OPN, l'ostéonectine et la BSP ont été identifiées à la limite entre l'os minéralisé et le tissu ostéoïde, sur le front de minéralisation (Stein et Lian, 1993; McKee et Nanci, 1995; Cowles *et coll.*, 1998). La BSP notamment semble jouer un rôle majeur dans l'initiation de la

minéralisation osseuse. Cette protéine, qui correspond à 10 % des PNC de la matrice, a un poids moléculaire de 46 000 à 75 000 Da ; elle comporte 50 % de résidus glucidiques et de nombreuses molécules d'acide sialique ; elle possède plusieurs motifs d'acide glutamique qui sont le site de nucléation des cristaux d'HAP (Fujisawa et Kuboki, 1991; Fujisawa *et coll.*, 1996). Elle possède aussi une séquence RGD qui permet la fixation des ostéoblastes par leur intégrine $\alpha_v\beta_3$ et elle appartient à la famille des Small Integrin-Binding Ligand, N-glycosylated proteins (SIBLING). La synthèse de la BSP est dépendante de la vitamine D ; elle est synthétisée précocement par les ostéoblastes lorsqu'ils commencent à fabriquer une BSU. De cette façon, cette protéine est déposée dans les toutes premières couches de tissu ostéoïde et elle peut initier la minéralisation. Par la suite, l'AlkP permet d'assurer la poursuite de l'apposition de nouveaux cristaux par un processus de nucléation secondaire.

3. Nucléation secondaire : propagation

Quelque soit le mode de minéralisation (de l'os mature ou du woven bone), une fois le nucléus critique formé, d'autres cristaux viennent s'apposer en surface, c'est la nucléation secondaire. C'est l'AlkP qui permet l'entretien de la calcification. L'AlkP est présente à la surface des membranes cytoplasmiques des ostéoblastes, des chondrocytes et des MVs, et elle est libérée dans le tissu ostéoïde. Elle est connue comme marqueur des lignées cellulaires ostéoblastiques. Cette enzyme est capable d'hydrolyser, *in vitro*, différents substrats phosphatés et d'entretenir ainsi la calcification par le recrutement de nouveaux radicaux phosphate qui viennent se complexer aux ions Ca^{2+} (Millan, 2006). Les cristaux d'HAP viennent se former entre les fibres de collagène et s'étendent ensuite de façon parallèle aux fibres (Ozawa *et coll.*, 2008).

La calcification apparaît comme un ensemble de processus complexes qui mettent en œuvre différents systèmes permettant d'initier la nucléation critique. Par la suite, l'extension de la minéralisation survient par un processus de nucléation secondaire. L'AlkP permet d'approvisionner les foyers de calcification en ions phosphate en hydrolysant les substrats circulants. La croissance cristalline dépend aussi d'autres molécules qui peuvent guider, orienter et modifier la taille des cristaux. Enfin, d'autres ions (fluor, strontium, fer, aluminium et des PNC) peuvent venir se complexer aux cristaux d'HAP, modifier leur taille et leurs caractéristiques physico-chimiques (Guggenbuhl *et coll.*, 2008; Libouban *et coll.*, 2009; Mabileau *et coll.*, 2009).

IV. Particularités du minéral osseux

L'HAP fait partie des apatites qui constituent le minéral phosphaté le plus abondant sur terre (Figure 7). Les apatites existent principalement sous la forme de fluoroapatite ou d'apatite carbonatée. Tous les phosphates de calcium évoluent en milieu naturel vers la forme apatitique la plus stable. Les apatites sont des minéraux de formule générale : $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$ où :

Me est un cation bivalent (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , etc.)

XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-} , SO_4^{3-} , VO_4^{3-} , etc.)

Y est un anion monovalent (Cl^- , OH^- ou F^-). On parle alors de chlorapatite, d'HAP ou de fluoroapatite.

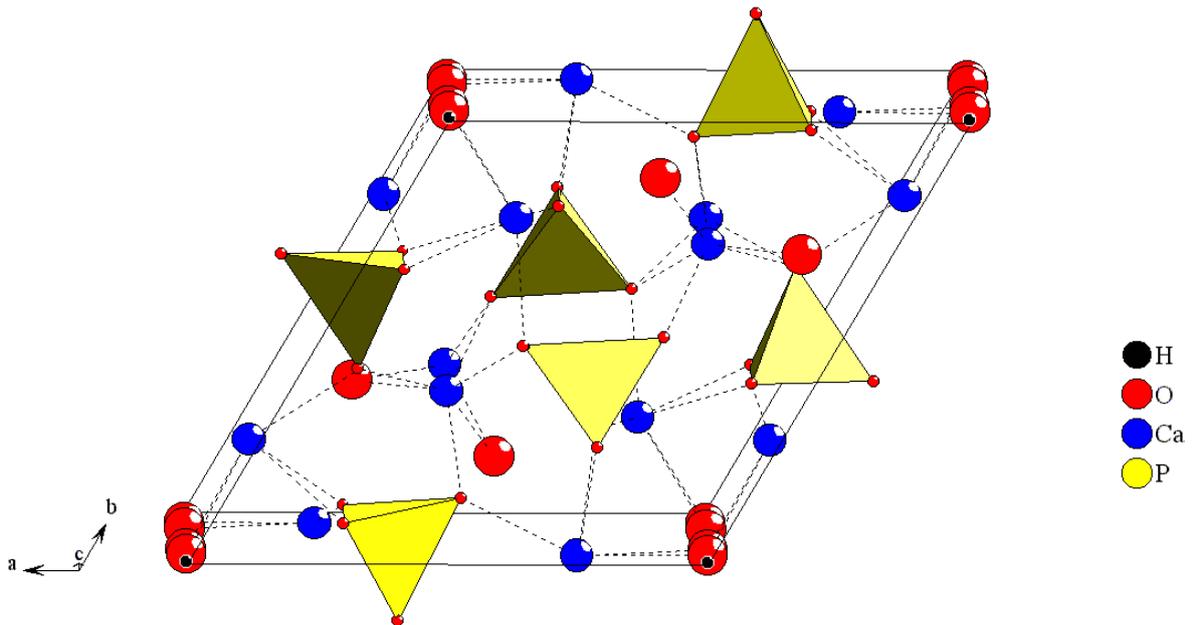


Figure 7 : Représentation de l'hydroxyapatite.

Les cristaux d'HAP matures se présentent sous forme de tablettes ou d'aiguilles d'environ 50 à 100 nm de long pour 25-50 nm de large (Robinson, 1952; Weiner et Price, 1986; Landis *et coll.*, 1993). Les cristaux nouvellement déposés atteignent environ 4 à 6 nm d'épaisseur (Landis *et coll.*, 1993; Kim *et coll.*, 1995). La taille des cristaux est contrôlée notamment par la distance interfibrillaire du collagène.

Il existe de nombreuses autres formes de phosphates de calcium (Tableau 1). Certains de ces phosphates de calcium, dont DCPD (brushite), DCPA, OCP, β -TCP et ACP sont parfois trouvés dans les tissus vivants dans des conditions normales ou pathologiques.

Ca/P	Composition	Formule
0.5	Phosphate de calcium monohydrate	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1	Dicalcium phosphate dihydrate (brushite)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	Dicalcium phosphate anhydre (DCPA)	CaHPO_4
1.33	Phosphate octocalcique (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.5	α ou β tricalcium phosphate (α - ou β -TCP)	α ou β $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.2-2.2	Phosphate de calcium amorphe (ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1.67	Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
2	Trétracalcium phosphate	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Tableau 1 : Les différents phosphates de calcium (Dorozhkin et Epple, 2002).

1. Structure cristallographique de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite appartient au groupe de symétrie du système hexagonal de groupe d'espace $P6_3/m$ (Figure 8). Les paramètres de maille des cristaux sont $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ (A.S. Posner, 1958). Les angles α et β sont égaux à 90° et γ (angle entre \vec{a} et \vec{b}) est égal à 120° . Les cristaux d'HAP se développent le long de l'axe c parallèlement à l'axe longitudinal des fibres de collagène (Su *et coll.*, 2003).

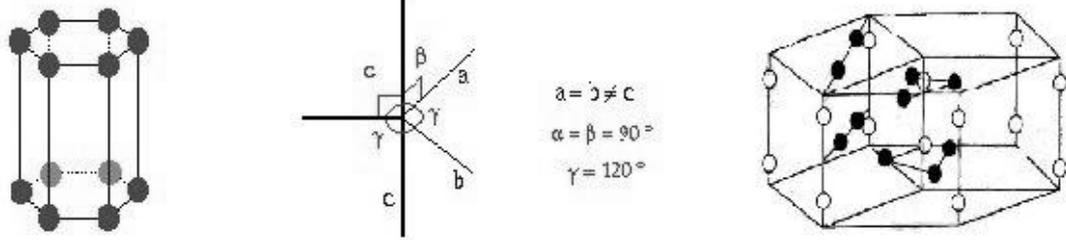


Figure 8 : Caractéristiques du système hexagonal avec les nœuds de réseau (à gauche) et schéma de l'HAP (à droite) avec en noir les atomes de calcium en site I et en blanc les atomes de calcium en site II.

La formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ représente la maille élémentaire de l'hydroxyapatite (A.S. Posner, 1958). Des analyses par diffraction de rayons X et par diffraction de neutrons ont également déterminé les coordonnées des atomes dans la maille (Kay *et coll.*, 1964).

L'apatite est essentiellement constituée d'un squelette formé d'ions phosphate (PO_4^{3-}) disposés en deux couches par maille dans lesquelles ils constituent des arrangements hexagonaux. La disposition de ces couches de tétraèdres PO_4^{3-} est telle qu'il existe, perpendiculairement à elles, deux jeux de tunnels. Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par les ions calcium notés Ca(I). Ils sont coordonnés par neuf atomes d'oxygène appartenant aux groupements PO_4^{3-} . Le deuxième jeu, dont les axes coïncident avec les axes sénaires du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et des ions calcium notés Ca(II). Les axes sont occupés par les ions hydroxyle. Les ions calcium Ca(II) sont coordonnés par six atomes d'oxygène, des tétraèdres PO_4^{3-} et par un ion hydroxyle, soit une coordinance globale de 7 (Figure 9). Le diamètre de ces tunnels (0.3 nm) est supérieur au diamètre du premier jeu. Ils confèrent au réseau des apatites des propriétés d'échangeurs d'ions.

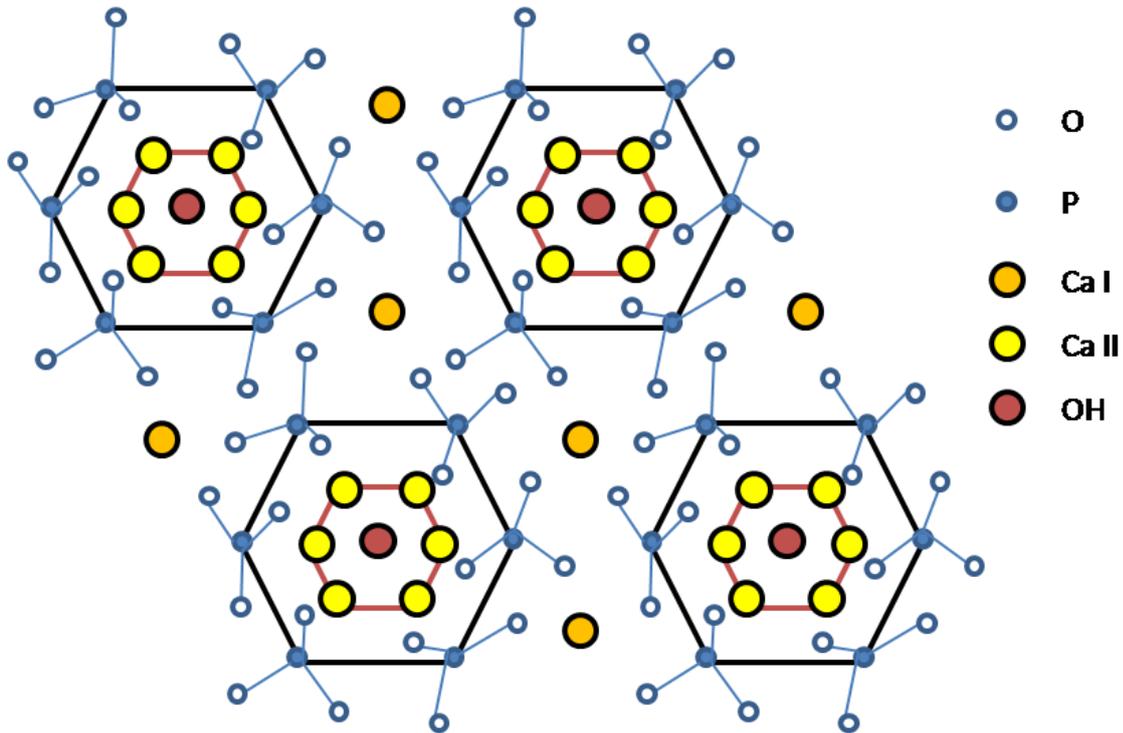


Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'hydroxyapatite. Quatre mailles hexagonales formées par les ions Ca(II) sont représentées. Les tunnels sont occupés par les ions Ca(I) et OH.

a) Position des dix atomes de calcium

Quatre atomes occupent la position Ca(I) dont deux sont à la position $z=0$ et les autres à $z=0,5$. Ils forment ainsi les colonnes parallèles à c , respectivement en $x=1/3, y=2/3$ et $x=2/3, y=1/3$. Les six autres atomes occupent la position Ca(II) avec trois d'entre eux formant un triangle à $z=1/4$ et les autres en $z=3/4$.

b) Position des ions hydroxyle

Ils sont disposés selon une colonne sur l'axe parallèle à c en $x=0, y=0$ et $z=1/4$ et $z=3/4$ (Kay et coll., 1964). Sur l'axe $x=0, y=0$, l'oxygène est déplacé de 0,03 nm du plan miroir en $z=1/4$.

c) Position des ions phosphate

Ils se trouvent sur un tétraèdre du niveau $z=1/4$ au niveau $z=3/4$. C'est ce motif qui donne sa stabilité à l'apatite.

La grande réactivité chimique des apatites découle de la présence de canaux colinéaires à l'axe c . En effet, il est possible d'envisager le remplacement partiel ou total de l'anion situé dans le tunnel par d'autres anions tels que le chlore ou le fluor afin d'aboutir par exemple à des chloro- ou fluoroapatites.

2. Composition chimique des cristaux

De part sa grande réactivité, la structure et la composition chimique exactes de l'HAP sont mal définies du fait notamment de son renouvellement permanent. La nature et le contenu des cristaux de phosphate de calcium dépendent fortement de l'échantillon choisi. Pour autant, ses propriétés restent très éloignées de celles des apatites géologiques et synthétiques.

a) Cristallinité

Le terme de cristallinité décrit l'organisation du cristal, qui est à la fois affectée par sa taille et sa pureté. Dans l'organisme, la formule de l'HAP est très largement modulée par des substitutions ou des lacunes. L'HAP non substituée n'existe pas dans les matériaux vivants sains (Dorozhkin et Epple, 2002). Une substitution courante concerne le remplacement d'un ou plusieurs anions par des ions carbonates, conduisant à l'HAP carbonatée. Il existe 2 types de substitutions par les carbonates :

- 1) la substitution de type A, où les groupes OH^- sont substitués par des groupements CO_3^{2-} ,
- 2) la substitution de type B, où les groupes PO_4^{3-} sont substitués par des groupements CO_3^{2-} (Penel *et coll.*, 1998).

Dans l'os mature, environ 5 à 8 % du minéral est carbonaté et en majorité par de la substitution de type B (Rey *et coll.*, 1989; Antonakos *et coll.*, 2007). Ces substitutions induisent l'apparition de défauts et de distorsions dans l'arrangement atomique des cristaux. Dans l'HAP de type A, le remplacement d'un ion monovalent par un ion divalent est compensé par l'apparition d'une lacune. Dans l'HAP de type B, la substitution d'un groupe PO_4^{3-} par un groupe CO_3^{2-} cause principalement la création d'une lacune au niveau des Ca^{2+} et des OH^- . Ces changements sont observés au niveau des spectres Raman réalisés sur le minéral osseux. La bande ν_3 du groupement PO_4 est la bande la plus affectée par la substitution de type B. L'intensité de cette bande augmente avec le taux de substitution (Penel *et coll.*, 1998) et la concentration en CO_3 .

b) Maturité du cristal

Une fois le minéral déposé, sa composition ne reste pas statique mais évolue au cours du temps avec le vieillissement et la maturation du cristal. La surface du cristal osseux présente une couche hydratée qui comprend principalement des ions bivalents comme CO_3^{2-} et HPO_4^{2-} (Rey *et coll.*, 2009) (Figure 10). Les ions de cette couche sont très labiles et réactifs et composent le domaine non-apatitique qui entoure le domaine apatitique du cristal osseux, stable et relativement inerte (Farlay *et coll.*, 2010). Ces ions sont très facilement échangeables

avec ceux contenus dans le milieu extérieur ou avec des groupements chargés d'origine protéique, provenant du collagène ou des PNCs, et qui peuvent s'incorporer dans le domaine apatitique (Boskey *et coll.*, 1998). Pendant la maturation et le grossissement des cristaux, cette couche hydratée devient de plus en plus fine jusqu'à laisser sa place à une apatite stable (Farlay *et coll.*, 2010).

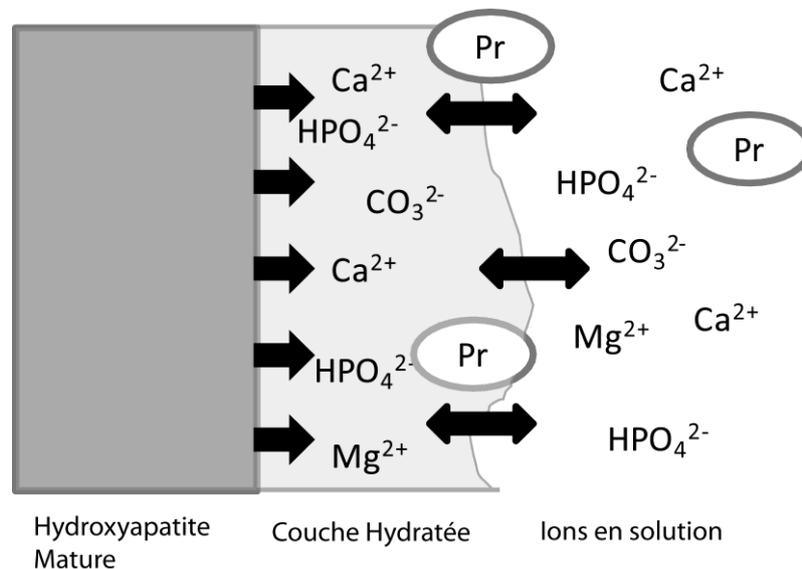


Figure 10 : Surface du cristal osseux avec sa couche hydratée qui permet des échanges d'ions. Pr = protéines.

c) Vieillessement

L'âge altère non seulement la masse et la microarchitecture osseuse mais aussi les propriétés de l'os le rendant plus fragile et sujet aux fractures. Le vieillissement entraîne :

- 1) Des modifications de la cristallinité et de la stœchiométrie du minéral osseux (Terminé et Posner, 1966; Handschin et Stern, 1992). Un os jeune est faiblement cristallin, tandis qu'avec l'âge, sa cristallinité et sa densité augmentent (Kuhn *et coll.*, 2008). La taille et la forme des cristaux changent avec la cristallinité. Les contraintes mécaniques augmentent donc dans les cristaux voisins et les fibres de collagène (Akkus *et coll.*, 2004). L'augmentation de ces contraintes induit la formation de défauts et augmente la fragilité de l'os.
- 2) Une augmentation de la taille des cristaux (Boskey, 2003; Kuhn *et coll.*, 2008) associée à une hausse du degré de minéralisation du tissu osseux entraînent une altération de la ductilité de l'os du fait de la perte de mobilité des fibres de collagène. L'os devient alors plus cassant (Akkus *et coll.*, 2004).
- 3) Une augmentation du rapport Ca/P (Kuhn *et coll.*, 2008). La quantité de carbonate augmente en remplaçant les ions HPO_4^{2-} qui sont surtout présents dans l'os jeune (Miller *et*

coll., 2001). Le taux de substitution de type B augmente et va avoir pour effet de modifier la forme des cristaux. Les contraintes locales des cristaux vont changer et avoir des conséquences mécaniques (Akkus *et coll.*, 2004).

V. Biomatériaux

Les greffes osseuses constituent des matériaux utiles pour la substitution osseuse. L'autogreffe reste le meilleur substitut car elle remplit toutes les conditions de biocompatibilité, d'ostéoinduction et d'ostéoconduction. Cependant, les facteurs limitants comme la disponibilité du greffon et la morbidité supplémentaire engendrée chez le patient ont conduit à rechercher d'autres alternatives. L'allogreffe permet d'avoir à disposition une plus grande quantité d'os provenant de « banques d'os ». Mais les techniques de préparation et de conservation des greffons sont encore discutées. Enfin les xéno greffes bovines ne représentent plus une alternative valide depuis l'apparition de l'encéphalopathie bovine spongiforme.

Les biomatériaux synthétiques sont de plus en plus utilisés pour remplacer les greffes osseuses en chirurgie orthopédique ou dentaire. Ils peuvent être d'origine naturelle, comme le corail ou la nacre, ou d'origine synthétique. Les métaux comme le titane (Ti) sont très souvent utilisés, ainsi que les biocéramiques et certains polymères. Enfin, de nouveaux types de matériaux font leur apparition comme les nanotubes de carbones (CNTs). Nous nous limiterons dans ce chapitre aux matériaux qui ont fait le sujet des travaux.

1. Phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont des biocéramiques qui présentent une bonne biocompatibilité et sont ostéoconductive de par leur similarité avec la phase minérale de l'os. Les phosphates de calcium possèdent aussi la propriété d'être biodégradables. Parmi les phosphates de calcium, l'HAP et le β -tricalcium phosphate (β -TCP) sont couramment utilisés comme matériaux de comblement osseux. Ils peuvent être utilisés sous forme de particules macroporeuses et pour améliorer l'ostéointégration et la biodégradation en augmentant la surface spécifique (Knabe *et coll.*, 2008). En effet, la macroporosité favorise la repousse de l'os en permettant l'invasion des précurseurs vasculaires et de cellules osseuses (Knabe *et coll.*, 2008). Ils peuvent aussi être implantés sous forme de blocs possédant des pores interconnectés (Weiss *et coll.*, 2003). *In vivo*, les phosphates de calcium induisent la

prolifération d'un os nouvellement formé en recrutant de nombreux ostéoblastes. Simultanément, des cellules géantes, des ostéoclastes et des macrophages viennent résorber le biomatériau implanté (Chazono *et coll.*, 2008; Tanaka *et coll.*, 2008) (Figure 11). Cependant, les propriétés biomécaniques des biocéramiques phosphocalciques sont faibles comparées à celles du tissu osseux, elles sont friables et fragiles lorsqu'elles sont soumises aux forces de compression (Rezwan *et coll.*, 2006).

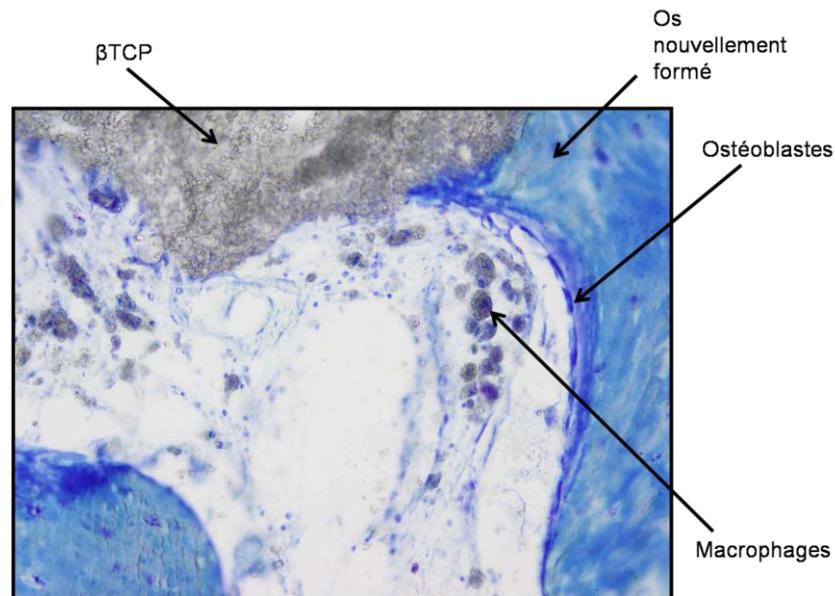


Figure 11 : Coupe histologique : β -TCP au contact direct du tissu osseux. De nombreux ostéoblastes sont présents ainsi que des macrophages qui viennent résorber le biomatériau.

2. Titane

Le titane est principalement utilisé en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. L'intérêt du titane vient de sa grande résistance à la corrosion, sa biocompatibilité, sa faible densité et son faible module élastique comparé à d'autres métaux comme les aciers inox. Il présente aussi une bonne capacité à adhérer à l'os et aux autres tissus (Geetha *et coll.*, 2009). Les alliages de titane ont un module élastique qui varie de 55 à 110 GPa comparé à l'acier inox 316 L dont le module est de 210 GPa alors que l'os a un module élastique d'environ 30 GPa (Niinomi, 2008) (Ryan *et coll.*, 2006). Mais le titane possède une faible résistance au cisaillement et aux frottements qui entraîne la libération de débris, ce qui limite l'implantation à long terme de certains implants. Les travaux de recherche vont tendre à

améliorer les propriétés mécaniques du titane et sa biocompatibilité notamment en modifiant sa surface.

3. Poly (2-hydroxyéthyl) méthacrylate (pHEMA)

Parmi les matériaux implantables en site osseux, les polymères tendent à se développer. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. L'avantage des polymères synthétiques est que leur synthèse est contrôlée et leurs mécanismes d'action sont prédictibles et reproductibles. Leur synthèse peut être adaptée selon l'utilisation choisie (Rezwan *et coll.*, 2006).

Le HEMA est un ester qui peut polymériser seul ou être copolymérisé avec d'autres monomères pour acquérir des propriétés spécifiques (Monthéard *et coll.*, 1992). C'est un monomère hydrosoluble, grâce à sa fonction alcool primaire, pouvant polymériser dans certaines conditions à basse température (de -20°C à + 10°C) (Figure 12). Il peut être utilisé pour fabriquer des hydrogels, immobiliser des protéines ou des cellules. L'intérêt majeur de ce produit est lié à la présence d'une fonction alcool primaire qui confère au monomère une grande solubilité dans l'eau et permet d'obtenir des polymères en milieu aqueux (hydrogels). Selon le degré de réticulation et la longueur des chaînes, on peut obtenir un polymère possédant une dureté identique voire supérieure à celle du tissu osseux. Ce polymère peut être dégradé par les cellules de la lignée monocytes-macrophages qui assurent une érosion du produit *in vivo* (Mabilleau *et coll.*, 2004).

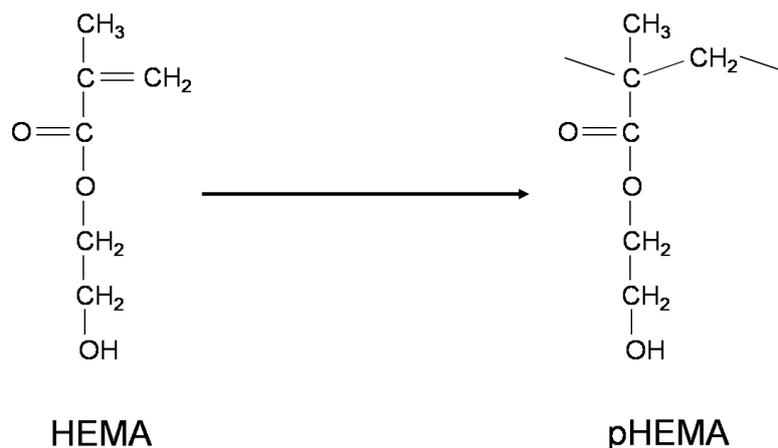


Figure 12 : Formule chimique du monomère HEMA et du polymère pHEMA.

4. Nanotubes de carbone (CNTs)

Les CNTs sont une forme macromoléculaire du carbone (Iijima, 1991) et une classe de nanomatériaux qui présente un grand intérêt dans les applications biologiques de par leurs propriétés mécaniques, physiques et chimiques (Ajayan, 1999; Yu *et coll.*, 2000). La densité des CNTs est comparable à celle du graphite, elle-même nettement inférieure à celle du titane. D'autre part, les CNTs résistent à d'importantes contraintes axiales et possèdent une grande résistance à la rupture (Yu *et coll.*, 2000). Il existe deux types de CNTs : 1) les multiwalled nanotubes (MWNT) sont faits de cylindres concentriques autour d'une cavité centrale commune. Leurs diamètres varient de 2 à 25 nm. 2) Les singlewalled nanotubes (SWNT) sont faits d'une seule couche cylindrique d'un bout à l'autre du tube. Ils possèdent un diamètre uniforme de 1 à 2 nm (Ajayan, 1999) (Figure 13).

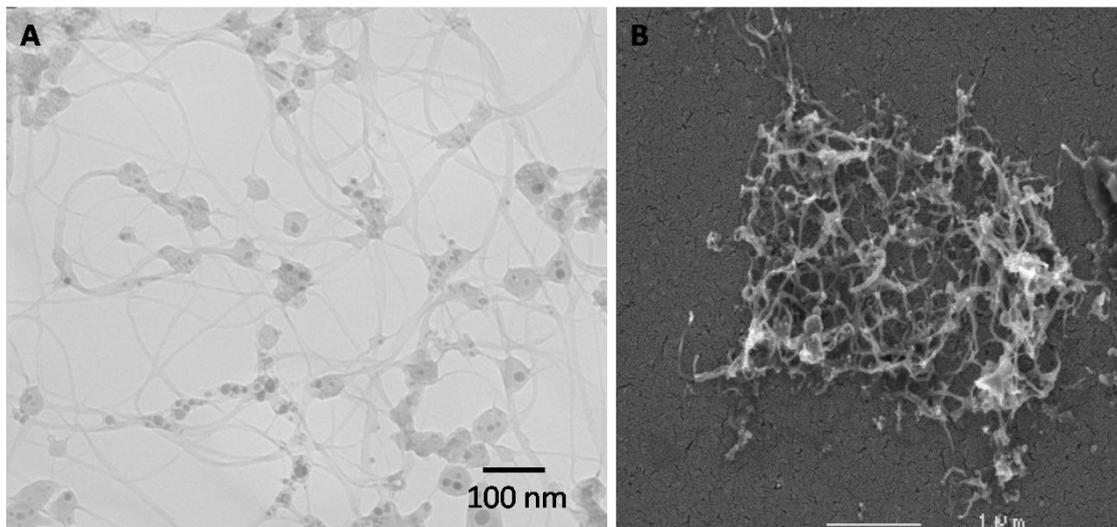


Figure 13 : SWNTs observés en A) microscopie électronique à transmission (MET) et B) microscopie électronique à balayage (MEB). Les amas observés sur le cliché de MET correspondent à des débris de carbone amorphe et des impuretés métalliques issus de la synthèse des CNTs.

Leur implantation dans l'os pourrait améliorer les propriétés mécaniques d'un os endommagé. Avec le développement des CNTs dans des applications variées et parce qu'ils ne sont pas biodégradables, il est nécessaire de s'assurer de la cytotoxicité de ce matériau. Beaucoup d'études au sujet de la cytotoxicité des CNTs ont été réalisées et les résultats divergent, certaines indiquant une grande toxicité, et d'autres une faible toxicité, voire même aucun effet négatif.

La première source de toxicité des CNTs est attribuée à la présence de résidus de catalyseurs métalliques utilisés pendant la synthèse. Les CNTs commercialisés actuellement contiennent

des quantités parfois importantes de fer, de nickel ou de zinc (Edwards *et coll.*, 2009). La synthèse des CNTs peut induire la formation de résidus de carbone amorphe qui est aussi un contaminant (Worle-Knirsch *et coll.*, 2006). La cytotoxicité des CNTs peut aussi être attribuée à leur longueur, leur distribution de taille, leur surface, leur dispersion ou leur agrégation, la façon dont ils sont déposés ou fonctionnalisés ou encore le type cellulaire utilisé. Récemment, il s'est avéré que les CNTs provoquaient une diminution de la viabilité des macrophages humains *in vitro* en induisant une nécrose à leur contact à cause d'une phagocytose incomplète (Cheng *et coll.*, 2009) (Figure 14).

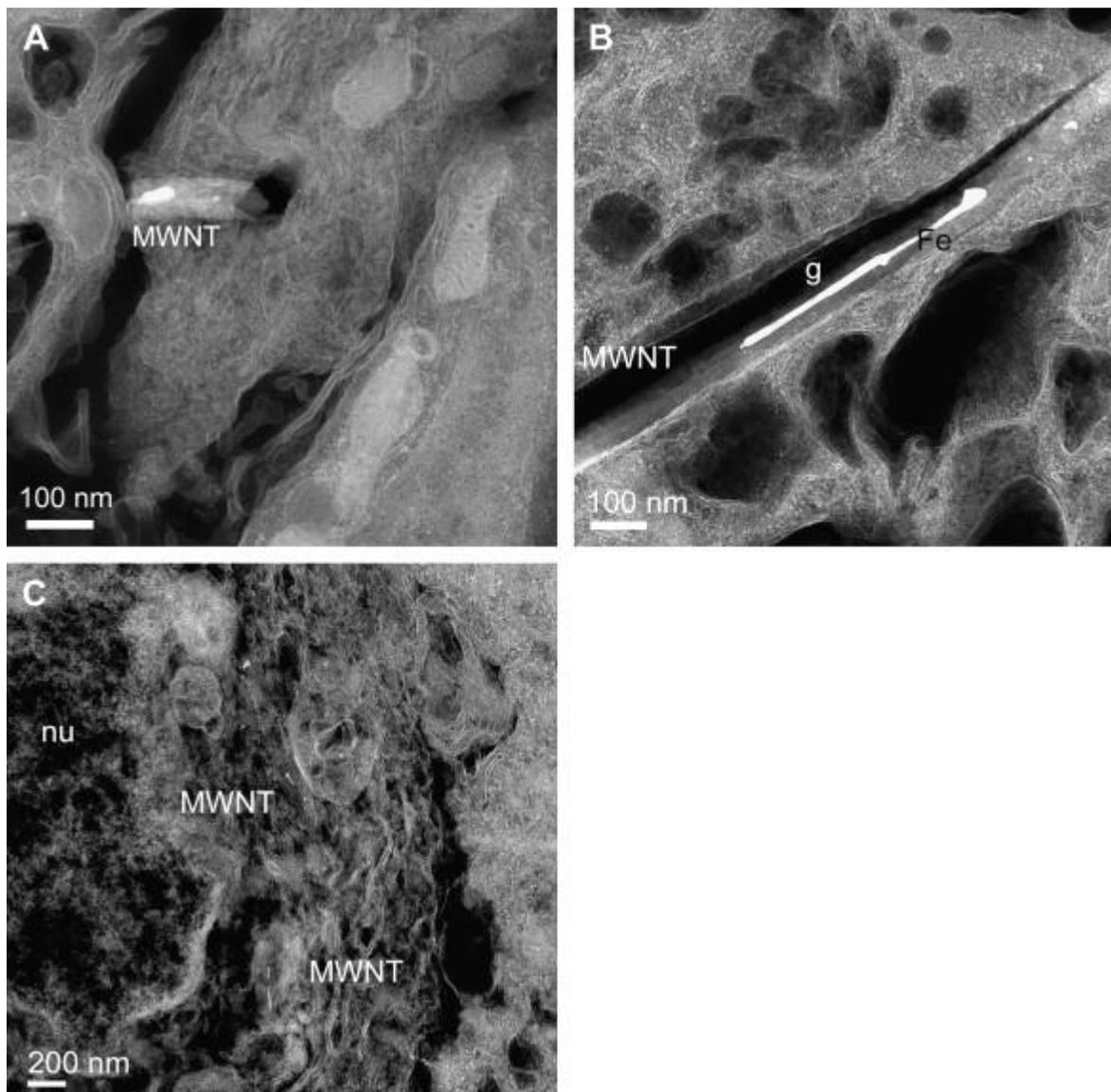


Figure 14 : Images de microscopie électronique A) d'un Multi Wall Nanotube (MWNT) inséré dans la membrane plasmique d'un macrophage. B) le MWNT traverse le cytoplasme d'une cellule saine. C) Image à faible grossissement de MWNTs dans une cellule nécrotique (g = espace dans la coupe, Fe = fer, nu = noyau) (Cheng *et coll.*, 2009).

Les CNTs sont étudiés de deux différentes manières : en suspension dans le milieu ou en revêtement immobilisé à la surface de supports de culture. Les CNTs isolés se montrent cytotoxiques quand ils sont utilisés en suspension dans une culture cellulaire et quelque soit le type de cellules (Cui *et coll.*, 2005; Tian *et coll.*, 2006; Davoren *et coll.*, 2007). Cependant, quand ils sont couplés à d'autres matériaux comme une matrice de polyuréthane par exemple, les CNTs apparaissent bien tolérés (Verdejo *et coll.*, 2009).

Pour la reconstruction osseuse, les CNTs pourraient être utilisés comme matériau de renforcement ou de modification de surface. De nombreuses études *in vitro* ont montré une bonne cytocompatibilité des cellules ostéoblastiques se traduisant par la production de collagène de type I et l'absence d'inflammation (pas d'IL-6) et de radicaux libres (Chłopek *et coll.*, 2006; Kalbacova *et coll.*, 2007; Akasaka *et coll.*, 2010; Matsuoka *et coll.*, 2010). Au contraire, la présence de CNTs favoriserait l'adhésion, la prolifération et la viabilité des ostéoblastes. Les interactions cellulaires avec une matrice 3D polyuréthane renforcée avec des CNTs apparaissent peu toxiques et n'ont pas d'effet négatif sur la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation du tissu osseux (Verdejo *et coll.*, 2009). *In vivo*, chez le lapin, une absence d'inflammation aussi bien dans les tissus mous que dans l'os a pu être constatée (Sitharaman *et coll.*, 2008).

VI. Interactions biomatériaux/cellules

Dès les premières secondes d'implantation d'un biomatériau, les protéines contenues dans les fluides circulants viennent s'adsorber à sa surface. Cette étape est dépendante des caractéristiques physico-chimiques du matériau. Les interactions cellules/matériau se font via des récepteurs membranaires qui interagissent avec les protéines et autres constituants des liquides biologiques déposés à la surface du biomatériau. La qualité de l'adhésion cellulaire va influencer leur morphologie et leur capacité à proliférer et à se différencier (Anselme, 2000). La majorité des cellules a besoin de s'attacher à une surface pour assurer sa viabilité, sa croissance, la migration cellulaire et la différenciation.

1. Adhésion cellulaire

L'adhésion d'une cellule à une surface se fait en plusieurs étapes (Figure 15) (Bell *et coll.*, 1984; Anselme, 2000; Siebers *et coll.*, 2005).

- La première étape est une phase d'attachement. Des liaisons physicochimiques, de type forces de Van der Waals, se forment entre les protéines adsorbées à la surface du biomatériau et les récepteurs membranaires des cellules. Ce processus peut être gêné par des interactions répulsives entre les régions les plus externes des membranes cellulaires et la surface du biomatériau.
- La seconde étape est la phase d'adhésion qui se produit sur le long terme. Cette phase implique 3 types de protéines : la MEC, les protéines membranaires et les protéines du cytosquelette des cellules. L'adhésion des cellules va provoquer l'activation de facteurs de transcription et ainsi réguler l'expression des gènes impliqués dans la différenciation et la migration (Meyer *et coll.*, 2005).
- La troisième étape est la phase d'étalement cellulaire. Cette phase conduit à une réorganisation du cytosquelette cellulaire, à une adaptation de la forme de la cellule et à une concentration des récepteurs cellulaires dans la région de contact avec élimination d'éventuels éléments répulsifs.

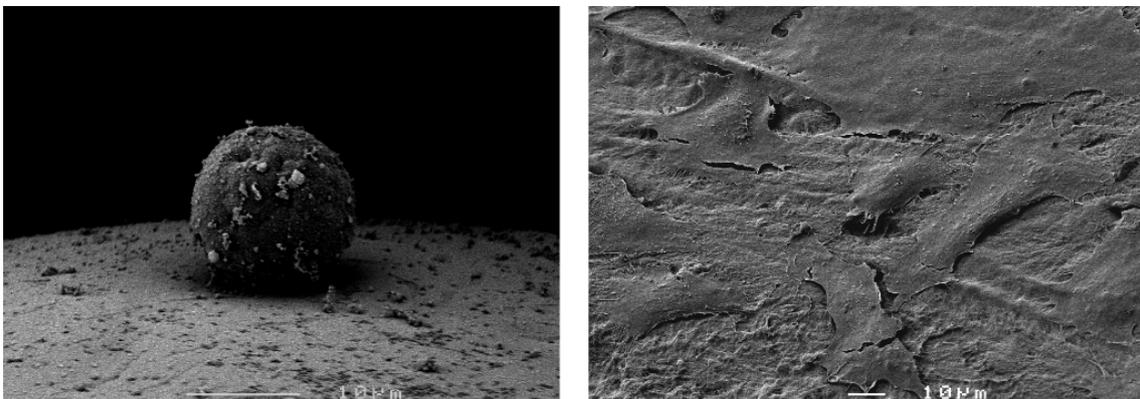


Figure 15 : Adhésion cellulaire. Etapes d'attachement cellulaire et d'étalement. Cellules issues d'une lignée ostéoblastique (SaOs-2) observées au MEB.

L'adhésion est essentielle au développement embryonnaire notamment. La différenciation cellulaire et la spécification des tissus sont dépendantes de la capacité des cellules indifférenciées à s'agréger et à se répartir dans des zones spécifiques de l'embryon (Gumbiner, 2005). L'adhésion cellulaire est aussi impliquée dans un grand nombre de processus biologiques tel que la polarité cellulaire, la réponse immunitaire, l'inflammation, la division cellulaire et l'apoptose, la progression tumorale et les métastases (Levenberg *et coll.*, 1999; Makrigiannakis *et coll.*, 1999; Graziano *et coll.*, 2003). Dans l'os, la MEC et les

protéines membranaires des ostéoblastes sont les acteurs principaux des mécanismes de l'adhésion cellulaire.

2. Protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire

a) Les protéines de la matrice extracellulaire de l'os

Dans l'os, la MEC est synthétisée par les ostéoblastes. Elle est constituée à 90% de protéines collagéniques (collagène de type I à 97% et collagène de type V à 3%) (Rosser et de Crombrughe, 2002). Le collagène de type I est une molécule hélicoïdale composée de 3 chaînes : 2 chaînes $\alpha 1(I)$ identiques et une chaîne $\alpha 2(I)$. Les chaînes α du collagène sont caractérisées par la répétition d'un triplet d'acides aminés Gly-X-Y (où X est souvent une proline et Y une hydroxyproline) et par des modifications post-traductionnelles comme (1) la glycosylation de certaines lysines ou hydroxylysines avec du glucose ou du galactose et (2) par la formation de liaisons covalentes intra- et intermoléculaires.

Les PNC représentent 10 à 15% des protéines totales de l'os. Ces protéines sont multifonctionnelles, interviennent dans l'organisation de la MEC, la coordination des interactions cellules/matrice et minéral/matrice, et régulent le processus de minéralisation (Robey et Boskey, 2008). Ces molécules peuvent être classées en quatre groupes généraux : les protéoglycanes, les glycoprotéines, les glycoprotéines à activité d'adhésion (SIBLING) et les GLA-protéines (Gorski, 1998).

i. Les protéoglycanes :

Ce sont des macromolécules composées de chaînes polysaccharidiques acides attachées à une protéine centrale. On trouve différents protéoglycanes dans l'os :

- les aggrecanes, qui participent à l'organisation et à l'hydratation de la matrice osseuse,
- les versicanes, qui participent à l'adhésion cellulaire (Zhang *et coll.*, 2001), régulent la chondrogenèse,
- les protéines avec des séquences répétées riches en leucine (décorine, biglycan, asporine, fibromoduline, oséoadhérine, lumican, ostéoglycine) qui se lient au collagène et participent à la capture du TGF- β , à l'organisation des microfibrilles et à l'attachement cellulaire (Young *et coll.*, 2006).

ii. Les glycoprotéines

La matrice osseuse contient également des glycoprotéines comme la phosphatase alcaline, qui est un marqueur de la formation osseuse. L'enzyme est liée à la surface cellulaire par un phosphatidylinositol qui peut être clivé, et la protéine se retrouve alors dans la matrice osseuse (Anderson *et coll.*, 2004). La plus abondante des glycoprotéines de l'os est l'ostéonectine. Elle représente 2 % des PNC. On la trouve également dans certains types de cellules épithéliales et dans les plaquettes. L'ostéonectine régule la prolifération et la croissance ostéoblastique et participe à la minéralisation. La fétuine (α_2 -HS glycoprotéine) est une protéine sécrétée par les hépatocytes et déposée dans la matrice osseuse en grande quantité. Elle peut se lier à de nombreux facteurs de croissance comme le TGF- β et différentes bone morphogenic proteins (BMP). Des études *in vitro* ont montré que la fétuine inhibait l'ostéogénèse dans un modèle de culture cellulaire de moelle osseuse (Binkert *et coll.*, 1999). D'autre part, la fétuine est un puissant inhibiteur de la précipitation phosphocalcique car cette molécule possède des résidus de Glu et d'Asp qui lui confèrent la propriété de se complexer au calcium (Schinke *et coll.*, 1996).

iii. Small Integrin-binding ligand, N-glycosylated proteins (SIBLING)

Les cellules des tissus conjonctifs interagissent avec l'environnement extracellulaire pour proliférer, se différencier et migrer. Ces interactions impliquent l'adhésion stable des cellules à la MEC par des récepteurs membranaires. Les cellules osseuses synthétisent des protéines capables de moduler l'adhésion cellulaire, tels que l'ostéopontine, la BSP, la fibronectine, thrombosine, la vitronectine, la fibrilline, BAG-75 et l'ostéoadhérine. Ces protéines sont phosphorylées et/ou sulfatées et contiennent une séquence peptidique RGD (Arg-Gly-Asp), reconnue par les récepteurs membranaires de la classe des intégrines. Elles sont aussi impliquées dans la régulation de la formation du cristal osseux (Fisher *et coll.*, 2001).

iv. Les Gla-protéines

Ce sont 3 protéines qui subissent des modifications post-traductionnelles par des γ -carboxylases vitamine K dépendantes : la GLA protéine matricielle (MBP), l'ostéocalcine et la protéine S (Robey *et coll.*, 1993). La liaison au calcium est augmentée par la présence des résidus glutamates carboxylés (GLA). Le rôle physiologique de ces protéines reste peu clair, mais il semblerait qu'elles puissent avoir un rôle dans le contrôle de la croissance du minéral.

b) Les molécules d'adhésion membranaires

Ces molécules sont caractérisées par leur capacité à interagir avec un ligand spécifique. Ce dernier peut être des protéines de la MEC ou il peut être situé sur la membrane des cellules voisines. Il existe quatre classes principales de molécules d'adhésion (Gumbiner, 1996) (Anselme, 2000) :

i. Les Sélectines

Trois sélectines ont été étudiées et nommées en fonction des cellules sur lesquelles elles ont été découvertes ; la P-sélectine (découverte sur les plaquettes, mais aussi exprimée par les cellules endothéliales), la E-sélectine (découverte sur les cellules endothéliales) et la L-sélectine (découverte sur les leucocytes) (Lasky, 1992; Wuthrich, 1992; Bevilacqua et Nelson, 1993). Les sélectines sont des lectines composées de 120 acides aminés. La L-lectine a été identifiée comme supportant l'adhésion des lymphocytes aux ganglions lymphatiques et responsable de la régulation du guidage physiologique des lymphocytes dans le lit vasculaire. La L-sélectine assure aussi l'adhésion des leucocytes dans d'autres lits vasculaires suivant l'activation de l'endothélium par les cytokines et joue également un rôle dans le recrutement des leucocytes durant l'inflammation (Adler et Brady, 1999).

La P-sélectine est stockée dans les granules α des plaquettes et dans les corps denses de Weibel-Palade des cellules endothéliales.

La E-sélectine paraît n'être exprimée que par les cellules endothéliales et nécessite plusieurs heures d'exposition aux cytokines.

Les sélectines permettent des phénomènes d'adhésions faibles mais de très haute spécificité.

ii. Les immunoglobulines

La superfamille des immunoglobulines est un large groupe de glycoprotéines à majorité membranaires mais aussi solubles, impliquées dans les phénomènes de reconnaissance, de liaison et d'adhésion des cellules. Ces molécules ont un rôle majeur dans le développement embryonnaire et sont présentes à la surface de nombreuses cellules chez l'adulte : cellules du système nerveux (NCAM), certaines cellules endothéliales (VCAM) et leucocytaires (CD4, CD8) (Albelda *et coll.*, 1994; Adler et Brady, 1999).

iii. Les cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines impliquées dans les liaisons intercellulaires. Ce sont des protéines transmembranaires qui sont dépendantes du calcium et qui possèdent : une

extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytosolique. Le site de fixation des ions calcium se trouve sur la partie N-terminale extracytoplasmique. Lorsque le calcium se fixe, cela entraîne une modification de la conformation de la cadhérine qui lui permet de reconnaître une autre cadhérine et de s'y fixer. L'absence de calcium aboutit à une dissociation du domaine extracellulaire et donc à la rupture de la jonction cellulaire. Le type de liaison que les cadhérines peuvent effectuer est exclusivement une liaison homophile, (elle ne peut se fixer que sur une autre cadhérine). Elles sont essentielles au maintien de l'intégrité tissulaire (Dejana *et coll.*, 2009) et sont impliquées dans les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales assurant ainsi l'intégrité des vaisseaux sanguins (Gerhardt et Betsholtz, 2003). Les cadhérines garantissent la stabilité, l'imperméabilité des vaisseaux sanguins et sont aussi nécessaires à l'angiogénèse (Cavallaro *et coll.*, 2006). Les cadhérines sont donc impliquées dans la vascularisation tumorale et pourraient devenir une des cibles pour les thérapies anti-cancer (Blaschuk et Devemy, 2009).

iv. Les intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs hétérodimériques, présentant une masse d'environ 200 à 350 kDa. Ces molécules sont des glycoprotéines membranaires, récepteurs à la surface des cellules qui se lient aux constituants de la MEC telles que la FN, la VN ou l'OPN par exemple (Figure 16).

Elles sont très impliquées dans l'adhésion cellulaire et permettent le passage des informations des cellules à la MEC mais aussi de la MEC aux cellules. Quand la cellule adhère à une protéine de la matrice extracellulaire, elle peut s'étaler et développer des zones de contact très localisées visibles par immunofluorescence. Ces zones de contact contiennent un assemblage d'intégrines qui se rapprochent et se regroupent en amas (phénomène de clustérisation), ces intégrines étant reliées aux protéines associées au cytosquelette (vinculine...) qui sont elles-mêmes reliées aux microfilaments d'actine. Les intégrines participent donc à l'organisation du cytosquelette et à l'activation de signaux cellulaires. Elles sont notamment impliquées dans la migration cellulaire et agissent de concert avec les récepteurs de facteurs solubles pour réguler l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Danen et Sonnenberg, 2003). Elles jouent un rôle prépondérant dans l'adhésion des cellules osseuses aux biomatériaux (Hozumi *et coll.*, 2010). En effet, l'étalement cellulaire résulte de changements structuraux du cytosquelette induits par l'adhésion cellulaire et médiés par les intégrines.

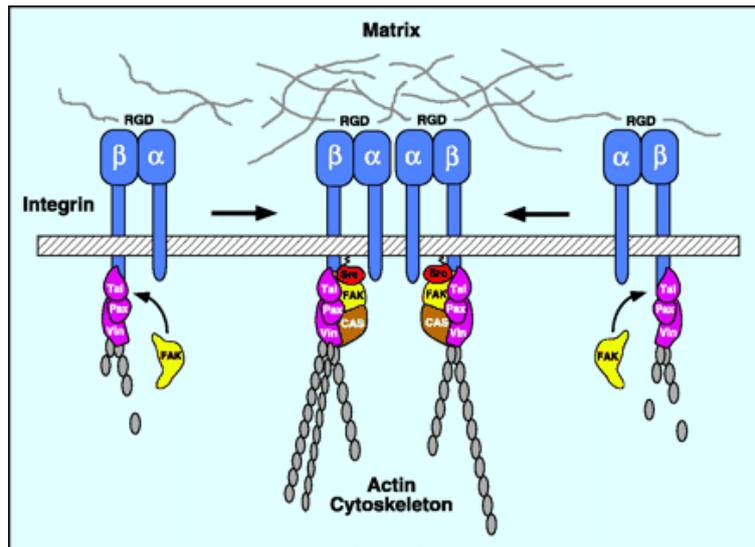


Figure 16 : Jonction des intégrines avec les protéines de la MEC. Cluster d'intégrines et association au cytosquelette. Tal : taline ; Pax : paxilline ; Vin : vinculine ; CAS : p130CAS (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Les intégrines se composent de deux sous-unités polypeptidiques transmembranaires différentes. Les chaînes α et β sont liées de façon non covalente (Figure 17). La chaîne α se compose de 1008 à 1152 acides aminés et la chaîne β se compose de 770 acides aminés (Siebers *et coll.*, 2005). Chez les mammifères, la famille des intégrines comprend 18 sous unités α et 8 sous unités β , qui s'associent pour former plus de 24 combinaisons (Figure 18) (Hynes, 2002). Chaque combinaison du domaine extracellulaire varie en fonction de sa spécificité de liaison et de la taille des sous unités. Certaines intégrines ne reconnaissent qu'un seul ligand comme l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ qui ne se lie qu'à la fibronectine alors que $\alpha V \beta 1$ se lie à la fibronectine et à la vitronectine. L'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ peut devenir une cible thérapeutique contre le cancer car elle est un récepteur clé dans l'angiogénèse (San Antonio *et coll.*, 2009).

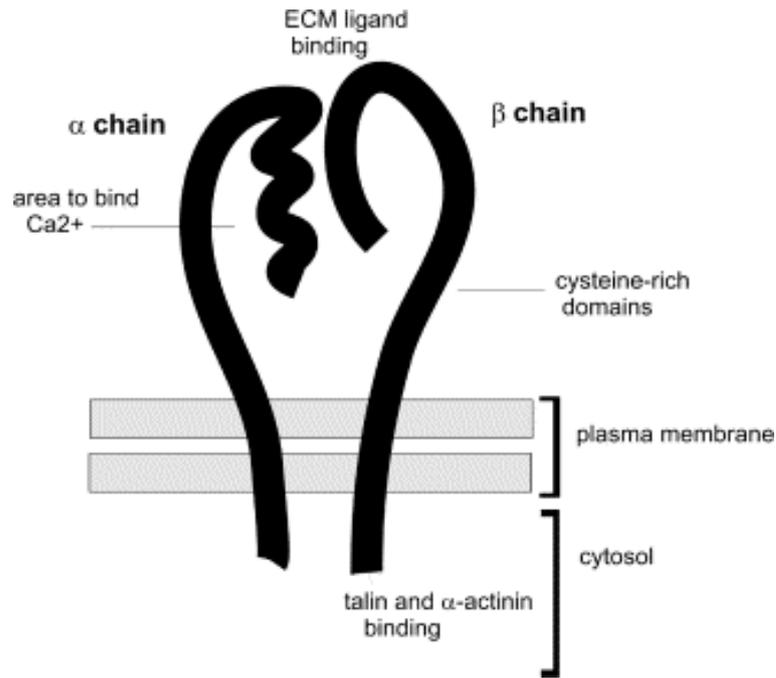


Figure 17 : Structure schématique d'une intégrine (Siebers *et coll.*, 2005).

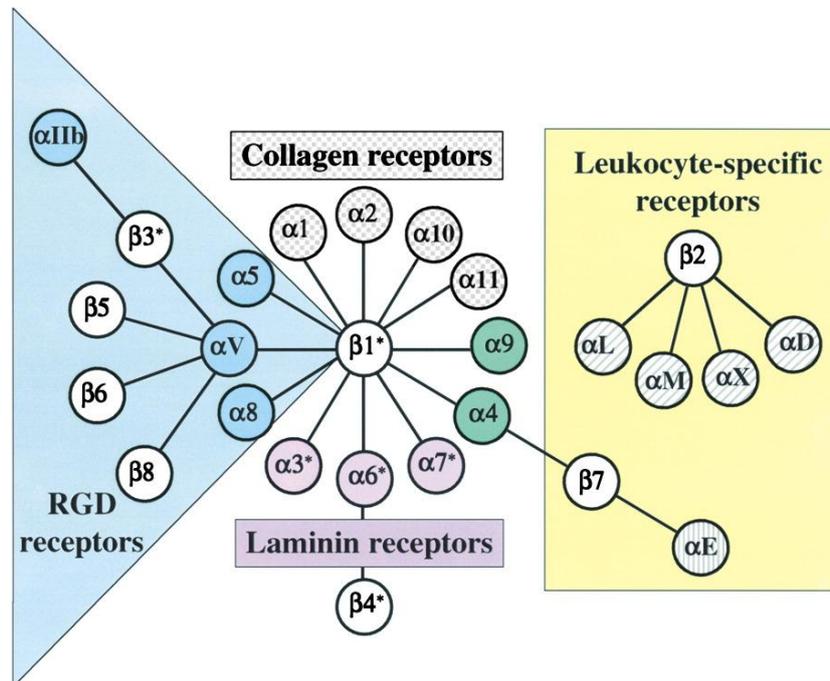


Figure 18 : Combinaisons connues des sous-unités des intégrines (Hynes, 2002).

Parmi les intégrines, huit reconnaissent une séquence peptidique structurée RGD (Arginine-Glycine-acide Aspartique), présente notamment dans la FN, la VN, le facteur de Willebrand, le fibrinogène, le collagène, la laminine et la thrombospondine. La reconnaissance de cette séquence est conditionnée par sa structure qui varie selon les ligands en fonction des peptides

adjacents de la triade RGD. Depuis 1984, il a été prouvé que la séquence RGD favorise l'adhésion cellulaire (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984).

Au vu de l'importance de l'adhésion cellulaire dans l'intégration des biomatériaux, il est intéressant d'étudier des modifications éventuelles de leur surface afin de favoriser et améliorer leur intégration.

3. Comportement cellulaire au contact de biomatériaux

Le comportement des cellules au contact d'un biomatériau est étudié *in vivo* par histologie et histomorphométrie ou *in vitro* par les techniques de microscopie électronique ou à fluorescence. Très peu de techniques permettent d'étudier en temps réel la colonisation d'un biomatériau par des cellules. La vidéomicroscopie est de plus en plus couramment utilisée notamment pour des études pharmacologiques, toxicologiques, pour suivre les déplacements ou la prolifération cellulaires (Kralova *et coll.*, 2009; Terryn *et coll.*, 2009). Cette technique permet d'étudier en temps réel le comportement de cellules vivantes. La vidéomicroscopie a notamment permis d'étudier les interactions ostéoblastes-ostéoclastes (Vesely *et coll.*, 1992), la cinétique d'étalement des ostéoclastes (Espinosa *et coll.*, 2002), ou encore la mobilité des ostéoblastes sur la MEC pour étudier le processus de réparation osseuse (Sivakumar *et coll.*, 2006; Klein *et coll.*, 2007). Généralement, les études en vidéomicroscopie sont réalisées sur des temps de culture cellulaire allant de quelques heures à 2 jours.

VII. Modifications de surface des biomatériaux : biomimétisme

Il est possible de modifier physiquement ou chimiquement la surface des matériaux. Ces modifications permettent de rendre actif un matériau dit inerte, comme par exemple les métaux (le titane et ses alliages, les aciers inox et les alliages chrome-cobalt), certains polymères (pHEMA, ou PEEK) ou encore des nanotubes de carbone. Autrement dit, les modifications vont permettre au matériau de favoriser l'intégration dans l'organisme où il est implanté.

1. Phosphates de calcium

Pour améliorer les propriétés de l'hydroxyapatite (HAP), on a pensé attacher de façon covalente des séquences peptidiques RGD à la surface de l'HAP (Babister *et coll.*, 2009; Detsch *et coll.*, 2010). L'HAP recouverte de peptides RGD a amélioré *in vitro* l'adhésion des

cellules souches mésenchymateuses (Sawyer *et coll.*, 2005) mais n'a pas amélioré l'étalement des cellules (Sawyer *et coll.*, 2007). *In vivo*, le revêtement RGD de l'HAP s'est même montré avoir un effet négatif sur la formation osseuse au contact du biomatériau (Hennessy *et coll.*, 2008). L'HAP possède une forte affinité avec les protéines du sérum et un revêtement RGD peut nuire à l'ostéointégration de ce biomatériau.

2. Titane

a) Modification physique : la rugosité

La réponse biologique comme l'orientation et la migration cellulaire sur un biomatériau est directement influencée par la topographie de surface (Flemming *et coll.*, 1999). Une rugosité de surface à l'échelle nano- ou macroscopique peut influencer l'ostéointégration en améliorant l'ostéoconductivité d'un implant en titane (Grizon *et coll.*, 2002; Rupp *et coll.*, 2004; Kubo *et coll.*, 2009). *In vitro*, la rugosité de surface permet d'améliorer l'adhésion des cellules de type ostéoblastique tels que les SaOs-2 (Degasne *et coll.*, 1999), de favoriser la production de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des ostéoblastes (Kieswetter *et coll.*, 1996; Hatano *et coll.*, 1999) et la production de protéines de la MEC (Boyan *et coll.*, 1996). Différentes techniques ont été utilisées pour créer des surfaces rugueuses :

- l'« acid etching » qui consiste à traiter les surfaces en les plongeant dans un acide fort comme l'acide fluorhydrique (Martin *et coll.*, 1995; Deligianni *et coll.*, 2001; Juodzbaly et coll., 2007). Cette technique permet d'augmenter de façon simple la rugosité sans affecter la biocompatibilité d'une surface (Iwaya *et coll.*, 2008).
- cette technique est très souvent associée au sablage (sandblasting) (Martin *et coll.*, 1995) qui consiste à propulser des particules d'oxyde d'aluminium (Papadopoulos *et coll.*, 1999; Baleani *et coll.*, 2000; Szmukler-Moncler *et coll.*, 2004) ou encore des particules de carbure de silicium (Anselme et Bigerelle, 2005) permettant d'éviter une contamination de la surface par l'aluminium.
- l'abrasion en utilisant du papier abrasif en carbure de silicium (Anselme *et coll.*, 2000; Deligianni *et coll.*, 2001). Ce type d'abrasion permet d'obtenir une rugosité unidirectionnelle et reproductible (Bowers *et coll.*, 1992) qui ne peut pas forcément être obtenue avec les autres techniques.
- plus récemment, la modification de surface du titane par application d'un rayon laser neodmium : yttrium–aluminium–garnet (Nd : YAG) est utilisée (Hsu *et coll.*, 2007;

Khosroshahi *et coll.*, 2009). Cette technique permet d'augmenter la rugosité mais aussi d'augmenter la mouillabilité ainsi que l'énergie de surface.

b) Modifications chimiques : revêtements de surface (coatings)

i. Revêtement protéique : séquence peptidique RGD

Une fois le biomatériau implanté, les protéines de la MEC viennent s'adsorber de façon instantanée et non spécifique à sa surface. Pour induire une réponse spécifique, il faudrait que le matériau induise la formation d'un nouveau tissu grâce à des interactions cellulaires spécifiques. C'est dans ce but que des biomatériaux, tel que le Ti, ont très tôt été recouverts par des protéines impliquées dans l'adhésion telles que la FN, VN et LN ou le collagène (Humphries *et coll.*, 1986). L'utilisation de protéines présente néanmoins des inconvénients du point de vue des applications médicales. Elles nécessitent d'être isolées et purifiées et peuvent induire des infections et une inflammation qui peuvent accélérer le processus de dégradation (Hersel *et coll.*, 2003). Parmi toutes les protéines, la séquence peptidique responsable de l'adhésion cellulaire, la séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) a été découverte en 1984 (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). L'utilisation de ce motif peptidique présente l'avantage de la stabilité au moment de la stérilisation, du stockage ainsi qu'un coût réduit (Boxus *et coll.*, 1998; Neff *et coll.*, 1998). Cette séquence peptidique a un rôle prédominant dans l'adhésion des ostéoblastes : lorsqu'elle est déposée sur une surface de Ti, elle favorise spécifiquement l'adhésion de ces cellules (Anselme, 2000). Elle a été identifiée dans VN, FN, les facteurs de Willebrand, collagène de type I, laminine, OPN, té nascine, BSP.

Une liaison stable des peptides RGD en surface est essentielle pour permettre une forte adhésion cellulaire. La formation de plaques d'adhésion focale ne peut se produire que si les ligands résistent aux forces contractiles des cellules (Katz *et coll.*, 2000) (Choquet *et coll.*, 1997). Afin de permettre une liaison stable et forte entre les peptides et la surface du matériau, les peptides RGD doivent être greffés de façon covalente au matériau, via des groupements fonctionnels tels que des fonctions carboxyliques, hydroxyles ou amines. Le Ti ne présente pas naturellement ces fonctions à sa surface. Un peptide contenant une cystéine terminale (C=cystéine) est déposé à la surface du Ti. La cystéine présente des groupes thiols libres (Prime et Whitesides, 1991) qui sont ensuite utilisés pour greffer les différentes fonctions précédemment citées (Ferris *et coll.*, 1999).

Pour faciliter l'adhésion cellulaire, il est préférable que le peptide RGD apparaisse en relief par rapport à la surface sur laquelle il est déposé afin d'atteindre le site de liaison de l'intégrine. L'intérêt d'un bras espaceur entre la séquence RGD et le site d'ancrage favorise l'attachement cellulaire (Beer *et coll.*, 1992; Craig *et coll.*, 1995; Kantlehner *et coll.*, 2000). Différentes longueurs ont été obtenues en couplant un nombre croissant de glycines à l'azote terminal du peptide. Il a été conclu de ces études qu'avec une longueur de 0,35 nm par glycine, pour 13 glycines la majorité des sites de liaison RGD peuvent être atteints par les peptides qui s'étendent au-delà d'approximativement 1,1-3,2 nm de la surface. Une diminution de l'attachement cellulaire a été observée dans le cas d'un bras espaceur trop long (Beer *et coll.*, 1992).

Le nombre de cellules qui adhèrent est relié à la densité de peptides RGD distribués en surface. L'attachement cellulaire montre une croissance sigmoïde en fonction de la densité de peptides RGD : il existe donc une densité minimum critique à la réponse cellulaire (Massia et Hubbell, 1991; Kantlehner *et coll.*, 2000). Cependant, la quantité maximale de cellules attachées reste intrinsèque à chaque matériau et chaque type cellulaire, et pour comparer l'influence de la densité de peptides RGD en surface dans différents systèmes d'adhésion cellulaire, il faudrait supprimer tous les autres effets contribuant à l'adhésion des cellules. Cela n'est pas le cas dans les études, compte tenu des différentes lignées cellulaires, des différents peptides qui présentent des affinités de liaison avec les intégrines variables, ainsi que des différentes stratégies de fonctionnalisation de surface.

Il existe deux conformations différentes de la molécule RGD : une molécule linéaire et une molécule cyclique. Le cyclo-RGD augmente la différenciation cellulaire et la minéralisation des cellules ostéoprogénitrices humaines isolées des cellules stromales de la moelle osseuse humaine cultivées *in vitro*, par l'activation de tyrosine kinase, de la focal adhesion kinase (p125 FAK) et des Mitogen Activated Protein kinases (MAPK) (Pallu *et coll.*, 2003; Pallu *et coll.*, 2009). Le peptide RGD cyclique permet aussi une augmentation des marqueurs spécifiques de l'os et augmente la minéralisation (Pallu *et coll.*, 2003). Le peptide RGD cyclique a montré une meilleure efficacité aussi bien sur les polymères que sur le Ti, ainsi qu'une meilleure résistance à la protéolyse (Verrier *et coll.*, 2002). Sur une culture de cellules ostéoprogénitrices humaines isolées de la moelle osseuse, la cyclisation du peptide RGD permet aussi d'induire l'adhésion cellulaire avec une concentration moindre en RGD comparé au peptide linéaire (Verrier *et coll.*, 2002).

Les propriétés de l'adhésion spécifique du peptide RGD cyclique en font un candidat potentiel dans le traitement contre le cancer. En fonctionnalisant des nanoparticules avec ce peptide, il est possible de cibler les intégrines tumorales et de permettre ainsi une libération locale de médicament (Chen *et coll.*, 2009).

ii. Revêtement minéral : CaP

Pour améliorer l'ostéointégration du Ti, il est possible de le recouvrir d'une phase minérale, notamment l'HAP. Les propriétés chimiques, comme la phase cristalline et la structure moléculaire, et les propriétés physiques, sa rugosité et sa porosité en font un matériau bioactif. Les revêtements de HAP augmentent le contact entre l'os et l'implant (Leeuwenburgh *et coll.*, 2006), améliorent la fixation de l'implant (Soballe *et coll.*, 1993), et facilitent l'ostéointégration.

L'HAP est principalement utilisée car c'est la phase la plus proche chimiquement de l'os naturel (Rey, 1990). Les cristaux d'HAP déposés de façon orientée suivant l'axe c permettent d'améliorer l'ostéoconduction (dos Santos *et coll.*, 2009). D'autre part, l'HAP est un phosphate de calcium qui subit de nombreuses substitutions ioniques. De nombreux ions peuvent être introduits dans les cristaux d'HAP, comme que le Sr^{2+} par exemple. Le Sr^{2+} est intéressant de part son rôle biologique dans le traitement de l'ostéoporose et d'autre part, ses propriétés chimiques comparables à celles du Ca^{2+} en font un élément intéressant pour l'ostéointégration du Ti (Li *et coll.*, 2007). L'incorporation de Sr^{2+} dans les revêtements HAP permet d'améliorer les propriétés mécaniques de HAP ainsi que la prolifération et la différenciation des ostéoblastes *in vitro* (Landi *et coll.*, 2007; Oliveira *et coll.*, 2007). Cependant, ces revêtements sont utiles uniquement sur les prothèses orthopédiques et sont néfastes sur les implants dentaires en raison de risques de délamination des revêtements.

3. Calcification du pHEMA

Il est possible d'activer le pHEMA en greffant des peptides RGD ou des groupements phosphate pour favoriser l'adhésion des cellules et ainsi permettre la biointégration du polymère (Tugulu *et coll.*, 2007; Zainuddin *et coll.*, 2008).

Le pHEMA est un biomatériau que nous utilisons comme modèle acellulaire de calcification. L'incorporation de AlkP ou la greffe de groupements carboxyméthyle sur la fonction hydroxyle du polymère induit la minéralisation après immersion dans un milieu synthétique (Filmon *et coll.*, 2002; Filmon *et coll.*, 2002) (Figure 19). La minéralisation du pHEMA imite

la calcification du woven bone avec la formation de calcosphérites. Ce modèle a permis de comprendre l'action de différents ions métalliques ou molécules pendant la calcification. *In vitro*, les ions Fe^{2+} s'intègrent dans les cristaux d'HAP et induisent une inhibition de la croissance cristalline ainsi qu'une altération de la cristallinité et des propriétés mécaniques des cristaux (Guggenbuhl *et coll.*, 2008). D'autres ions métalliques comme le Co^{2+} , Cr^{3+} et Ni^{2+} , très utilisés dans les prothèses orthopédiques, ont été mis en contact avec le pHEMA durant la calcification (Mabilleau *et coll.*, 2009). En présence de ces ions, la taille des calcosphérites formées a considérablement augmenté par rapport aux contrôles, ainsi que la cristallinité du minéral formé. Les paramètres de maille du cristal d'HAP ont aussi subi une modification indiquant une possible altération du minéral osseux. Ce modèle de calcification du pHEMA fonctionnalisé a permis de mettre en évidence l'adsorption de PNC à la surface du minéral formé. En présence d'ostéocalcine, les calcosphérites doublent de taille alors que le rapport Ca/P et les concentrations en Ca et PO_4 ne changent pas. Alors qu'en présence de fétuine, les calcosphérites sont de plus petits, le rapport Ca/P augmente et les concentrations en Ca et PO_4 diminuent (Libouban *et coll.*, 2009).

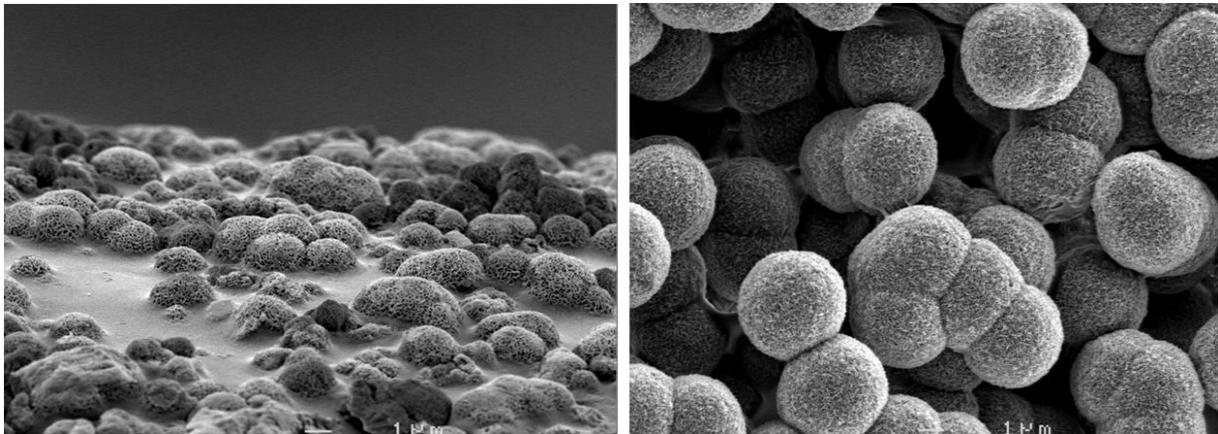


Figure 19 : Calcosphérites se développant à la surface d'une pastille de pHEMA fonctionnalisée. Observations en MEB (LHEA).

4. Nanotubes de carbone (CNTs)

Les CNTs étant des matériaux hydrophobes, il est nécessaire d'en modifier la surface dans le but de les solubiliser et de les disperser, permettant ainsi leur utilisation dans un environnement physiologique. La fonctionnalisation permet d'améliorer considérablement la solubilité en milieu aqueux, la réactivité chimique des nanotubes et donne la possibilité de fournir des sites d'ancrage de molécules chimiques ou biologiques. Il est donc possible de

rendre les nanotubes bioactifs en les fonctionnalisant avec des protéines, des hydrates de carbone ou des acides nucléiques (Chen *et coll.*, 2004; Cui, 2007; Wei *et coll.*, 2007).

a) Fonctionnalisation non covalente

Cette méthode permet de fonctionnaliser les nanotubes sans introduire de défaut à leur surface. La fixation de motifs polyaromatiques est une méthode décrite pour ancrer des molécules d'intérêt à la surface des nanotubes. Les dérivés aromatiques restent accrochés de manière très forte à la surface des CNTs par des interactions de π -stacking, une interaction non covalente entre les composés organiques contenant des parties aromatiques (Yang *et coll.*, 2007).

Il a été remarqué que les polymères ainsi que les surfactants ont tendance à s'enrouler autour des CNTs et à interagir avec la surface des CNTs par des interactions de Van der Waals. Le polyéthylène glycol (PEG) peut, par exemple, être utilisé pour revêtir les CNTs et ainsi prévenir l'adsorption de protéines non spécifiques (Shim *et coll.*, 2002). D'autres polymères sont aussi utilisés comme le chitosan (Thompson *et coll.*, 2009). La grande surface spécifique des nanotubes est idéale pour immobiliser des protéines ou de l'ADN via des interactions hydrophobes ou de π -stacking. Par exemple, la métallothionéine a été emprisonnée et placée sur les surfaces extérieures des extrémités ouvertes des MWCNTs (Balavoine *et coll.*, 1999). La streptavidine a aussi été adsorbée sur les MWCNTs via des interactions hydrophobes entre les CNTs et les domaines hydrophobes de la protéine (Tsang *et coll.*, 1995). Les molécules d'ADN s'adsorbent aussi de façon non spécifique sur les CNTs (Chen *et coll.*, 2001). L'ADN simple brin s'organise à la surface des nanotubes et permet leur individualisation et leur dispersion dans l'eau (Penicaud *et coll.*, 2005). La même équipe a rapporté qu'en utilisant une séquence d'ADN spécifique, il était possible de séparer les nanotubes selon leur diamètre et propriétés électroniques (Tomonari *et coll.*, 2006). Cette méthode permet de conserver les propriétés des CNTs, mais reste assez peu spécifique et, dans certains cas entraîne la dénaturation de la biomolécule.

b) Fonctionnalisation covalente

La plupart des procédés de synthèse de CNTs génèrent des impuretés qui sont principalement enlevées par des agents oxydants comme les acides forts, tels que l'acide nitrique (Niyogi *et coll.*, 2002; Rosca *et coll.*, 2005). Des fonctions $-\text{COOH}$ se forment principalement aux extrémités les plus réactives (les extrémités ouvertes) et sur les défauts des parois latérales (Hirsch, 2002; Katz et Willner, 2004). A partir de ces groupements $-\text{COOH}$, il est ensuite

possible de greffer d'autres biomolécules comme des anticorps pour détecter les biomarqueurs tumoraux ou de l'ADN (Yu *et coll.*, 2006; Yang *et coll.*, 2007). On peut aussi greffer des séquences peptidiques RGD. Ces séquences greffées sur les CNTs favorisent l'adhésion et la croissance neuronale (Gaillard *et coll.*, 2009) et permettent de cibler les tumeurs (Hsu *et coll.*, 2007; Zavaleta *et coll.*, 2008). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est très exprimée par les cellules endothéliales qui supportent l'angiogénèse et les cellules tumorales. Le peptide RGD, étant spécifique à cette intégrine, peut être utilisé dans le but de localiser les tumeurs et éventuellement de les traiter localement avec un système de libération contrôlée de médicaments (Lay *et coll.*, 2010). La fonctionnalisation covalente est la méthode la plus simple mais aussi la moins spécifique des méthodes de fonctionnalisation. De plus, elle peut modifier la structure et les propriétés des CNTs.

c) Calcification des CNTs

Les CNTs font un support idéal à la réparation osseuse à cause de leurs excellentes propriétés mécaniques. Un CNT individualisé se présente sous la forme d'une longue (100 à 300 nm) et fine fibre d'un diamètre moyen de 0,5 à 1,5 nm. Ces dimensions sont proches des dimensions de la triple hélice d'une fibre de collagène qui mesure 300 nm de long (soit environ 1000 acides aminés), avec un diamètre compris entre 25 et 400 nm et une périodicité de 65 à 67 nm (Gelse *et coll.*, 2003; Tran *et coll.*, 2009). Les CNTs imitent la géométrie du collagène et peuvent servir de support à la nucléation et au développement des cristaux d'HAP (Figure 20). En oxydant les CNTs pour créer des fonctions $-\text{COOH}$, il devient possible d'induire *in vitro* une calcification en formant une couche ou des nanocristaux d'HAP (Zhao *et coll.*, 2005) (Liao *et coll.*, 2007). Ce type de fonction chimique permet aussi la croissance de cristaux sphériques de CaCO_3 après 30 minutes d'immersion dans une solution contenant du NaCO_3 et du CaCl_2 (Li et Gao, 2007). Les CNTs peuvent aussi être recouverts d'une couche d'HAP par plasma spaying (Balani *et coll.*, 2007; Xu *et coll.*, 2009).

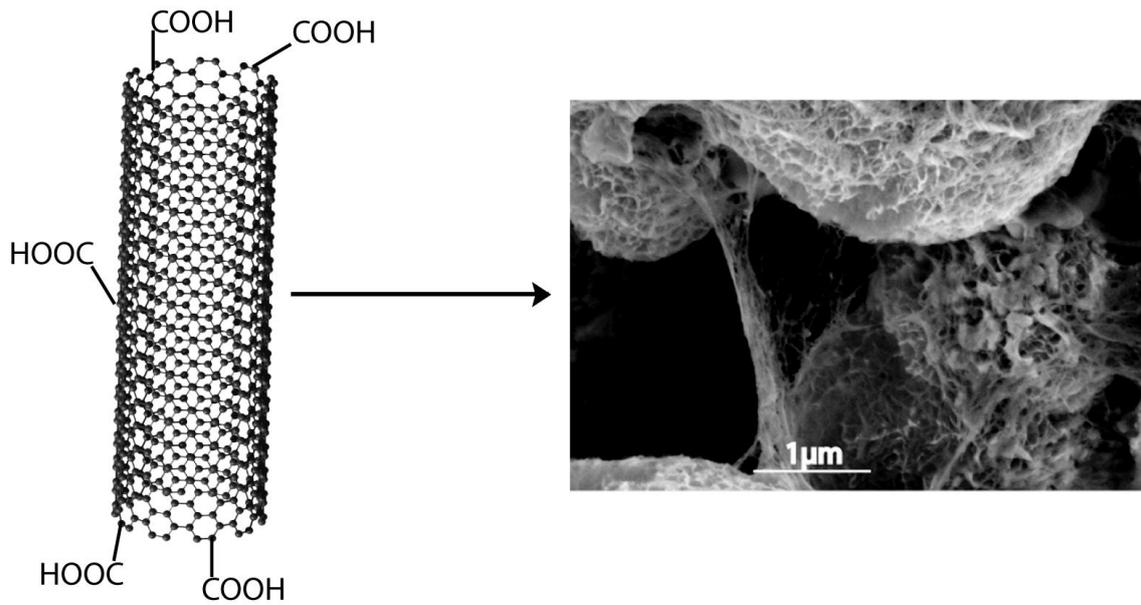


Figure 20 : Représentation schématique d'un nanotube de carbone fonctionnalisé permettant d'induire la calcification. L'image MEB représente des CNTs fonctionnalisés qui ont permis la précipitation de cristaux de phosphate de calcium sous la forme de calcosphérites.

TRAVAUX PERSONNELS

In Vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (SaOs-2) on titanium surface coated with RGD functionalized bisphosphonate

Beuvelot, J, Portet D., Lecollinet G., Moreau MF., Baslé M.F., Chappard D.,
Libouban H.

Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials,
90(2):873-881, 2009.

Un des métaux les plus utilisés et étudiés en implantologie dentaire et orthopédique est le titane (Ti). Il a été introduit dans les années 40, face à l'acier inoxydable et aux alliages chrome-cobalt. La technique d'obtention du titane pur est difficile et par conséquent son prix est élevé. Mais avec une densité 1,5 fois inférieure à celle de l'acier et ses propriétés biomécaniques, le titane apporte un réel intérêt en tant que biomatériau. Le titane est un métal extrêmement oxydable qui est recouvert d'une couche d'oxyde (6 à 8 nm) majoritairement constituée de TiO_2 (Kasemo, 1983) qui protège le métal de la corrosion. Le titane est un des métaux les plus biocompatibles et réactifs grâce à cette couche d'oxyde. D'autre part, il possède un module élastique assez faible comparé à l'acier inox 316L (respectivement 114 GPa et 203 GPa) qui le rend d'autant plus adapté mécaniquement pour l'implantation osseuse (le module d'élasticité de l'os étant d'environ 20 GPa).

De nombreuses études ont été réalisées pour améliorer l'ostéoconduction et l'ostéointégration de ce matériau (Albrektsson *et coll.*, 1981; Larsson *et coll.*, 1994; Gawalt *et coll.*, 2003; Le Guehennec *et coll.*, 2007). L'ostéointégration est définie comme un contact direct entre le tissu osseux vivant et l'implant (Albrektsson et Johansson, 2001). Un traitement de surface peut améliorer les propriétés d'ostéointégration de l'implant. Par exemple l'augmentation de la rugosité de surface du titane favorise l'adhérence des cellules ostéoblastiques (Larsson *et coll.*, 1996). Les modifications chimiques de la surface du titane permettent aussi d'améliorer l'ostéointégration. La séquence peptidique RGD (Arginine-Glycine-acide Aspartique) portée par plusieurs types de protéines est connue pour induire l'adhésion des cellules (et par conséquent favoriser l'ancrage des cellules à la surface des matériaux). Elle a été largement étudiée (Ferris *et coll.*, 1999; Hersel *et coll.*, 2003; Durrieu *et coll.*, 2004; Durrieu, 2005; Elmengaard *et coll.*, 2005).

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet d'un revêtement de type RGD sur du Ti sur l'adhésion, l'étalement et la minéralisation des cellules humaines osteoblast-like (SaOs-2). Les séquences peptidiques RGD ont été couplées à un bisphosphonate (BP) (Portet *et coll.*, 2006), utilisé comme système d'ancrage, et chimiquement adsorbé sur des disques de Ti polis, nettoyés et stériles (Figure 21). Le revêtement a été développé par la société Surfactis (Angers, France).

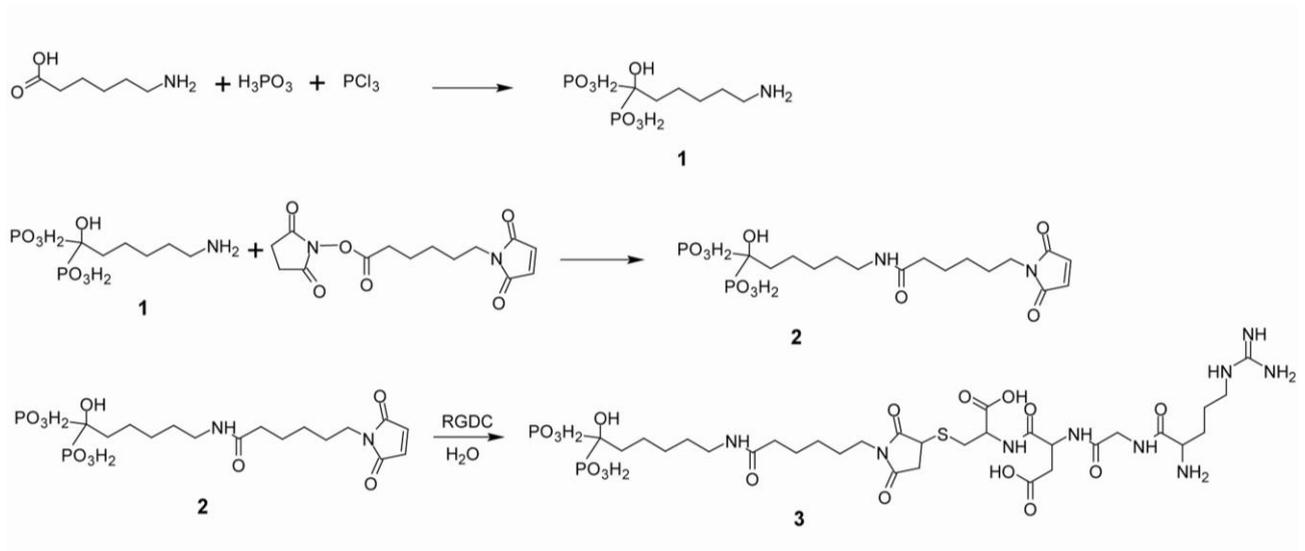


Figure 21 : Préparation du RGD-BP via phosphorylation d'un acide carboxylique, greffe d'un lien maleimide et d'un peptide RGD.

Deux concentrations différentes de RGD : 10^{-10} mol/L (RGD 10^{-10}) et 10^{-4} mol/L (RGD 10^{-4}) ont été utilisées pour préparer des disques de Ti fonctionnalisés comparés à des disques en Ti non recouverts (Ti_0). Des cellules de la lignée ostéoblastique SaOs-2 ont été cultivées sur ces disques pendant une heure puis fixées. Elles ont ensuite été marquées au DAPI (Di-Amidino-Phenyl-Indol) et à la phalloïdine. Le DAPI colore spécifiquement l'ADN et donne une fluorescence bleue (456 nm) à la chromatine et aux chromosomes lorsqu'il est excité en lumière violette (372 nm). La phalloïdine se lie aux filaments d'actine des cellules et fluoresce en rouge (650 nm) quand elle est excitée dans le vert (550 nm) (Figure 22). L'étalement cellulaire a été mesuré et comparé par rapport à la taille des noyaux après 1 h de culture, sur les échantillons RGD et Ti_0 . L'étalement des cellules n'apparaissait pas significativement différent entre les supports recouverts de RGD et les supports non recouverts.

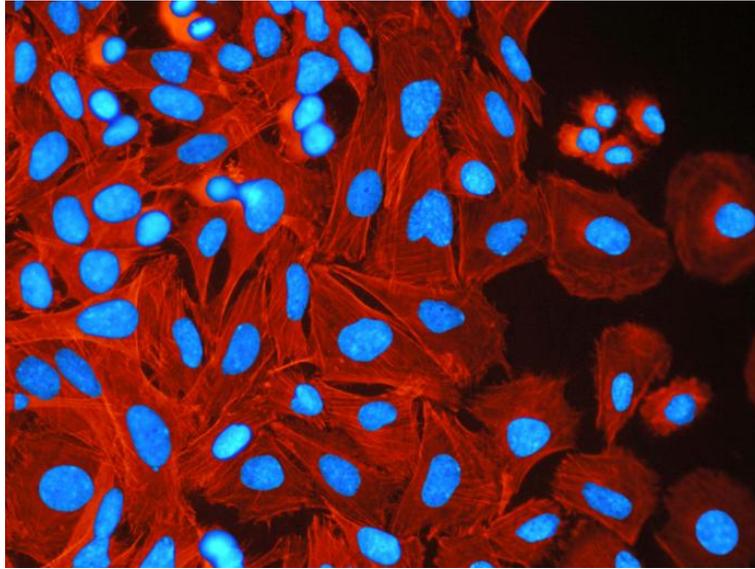


Figure 22 : Marquages au DAPI (bleu) et phalloïdine (rouge) des cellules étalées sur le Ti.

Pour étudier la cinétique de minéralisation des SaOs-2, les cellules ont été déposées sur 3 surfaces différentes et cultivées pendant une semaine jusqu'à ce qu'elles soient à confluence. Un milieu de minéralisation contenant de l'acide ascorbique et du β -glycérophosphate a été introduit pour induire la minéralisation. Après 3, 6, 10, 14 et 18 jours, les cellules ont été incubées en présence de calcéine pendant 2 heures avant d'être fixées. La calcéine se fixe sur le minéral et fluoresce dans le vert (515nm) quand elle est excitée par une lumière bleue (495nm) (Figure 23). La surface fluorescente du minéral marqué à la calcéine a ensuite été mesurée par analyse d'images (Figure 24).

La minéralisation a débuté à J₃. De petits nodules ont été observés quelque soit la concentration de RGD sur les disques de Ti. Des différences sont apparues à J₆ avec un développement plus rapide de nodules minéralisés pour les groupes RGD 10⁻¹⁰ et RGD 10⁻⁴. A partir de J₆, les nodules minéralisés se sont développés plus rapidement sur les échantillons du groupe RGD 10⁻¹⁰ comparé au groupe RGD 10⁻⁴. Entre J₁₀ et J₁₈, la minéralisation s'est développée sur tous les échantillons, mais la surface couverte par le minéral était significativement plus importante sur les échantillons du groupe RGD 10⁻¹⁰ que sur ceux des groupes RGD 10⁻⁴ et Ti₀ ($p < 0,05$) (Figure 24).

Notre étude a mis en évidence que cette nouvelle méthode d'ancrage du peptide RGD sur le Ti favorise l'adhésion, l'étalement et le développement d'une plus grande surface de minéralisation comparé au Ti₀. La concentration RGD 10⁻¹⁰ améliore significativement l'adhésion cellulaire et la minéralisation comparé à Ti₀. La concentration RGD 10⁻⁴ tend à améliorer l'adhésion et la minéralisation des SaOs-2 mais n'est pas aussi efficace que la concentration RGD 10⁻¹⁰.

Cette étude a montré qu'une minéralisation précoce et plus importante était favorisée par le revêtement BP-RGD. Une minéralisation rapide au contact d'un implant dentaire ou orthopédique est un avantage considérable pour obtenir une ostéointégration rapide. La séquence peptidique RGD joue un rôle central dans l'adhésion cellulaire et a été étudiée par plusieurs équipes (Pallu *et coll.*, 2005; Rammelt *et coll.*, 2006; Bagno *et coll.*, 2007; Chua *et coll.*, 2008). Le peptide peut être lié au Ti de différentes façons. Un peptide contenant une cystéine terminale (C=cystéine) peut être déposé à la surface du Ti. La cystéine présente des groupes thiols libres (Prime et Whitesides, 1991) qui sont ensuite utilisés pour greffer les différentes fonctions précédemment citées (Ferris *et coll.*, 1999). Des groupes fonctionnels comme les acides polyphosphoniques peuvent aussi être utilisés comme système d'ancrage du RGD (Auernheimer *et coll.*, 2005). Une autre conformation de RGD, le RGD cyclique, permet d'augmenter l'adhésion, la différenciation et la minéralisation des cellules progénitrices humaines (Pallu *et coll.*, 2003; Pallu *et coll.*, 2009), avec une concentration moindre en RGD comparé au peptide linéaire (Verrier *et coll.*, 2002).

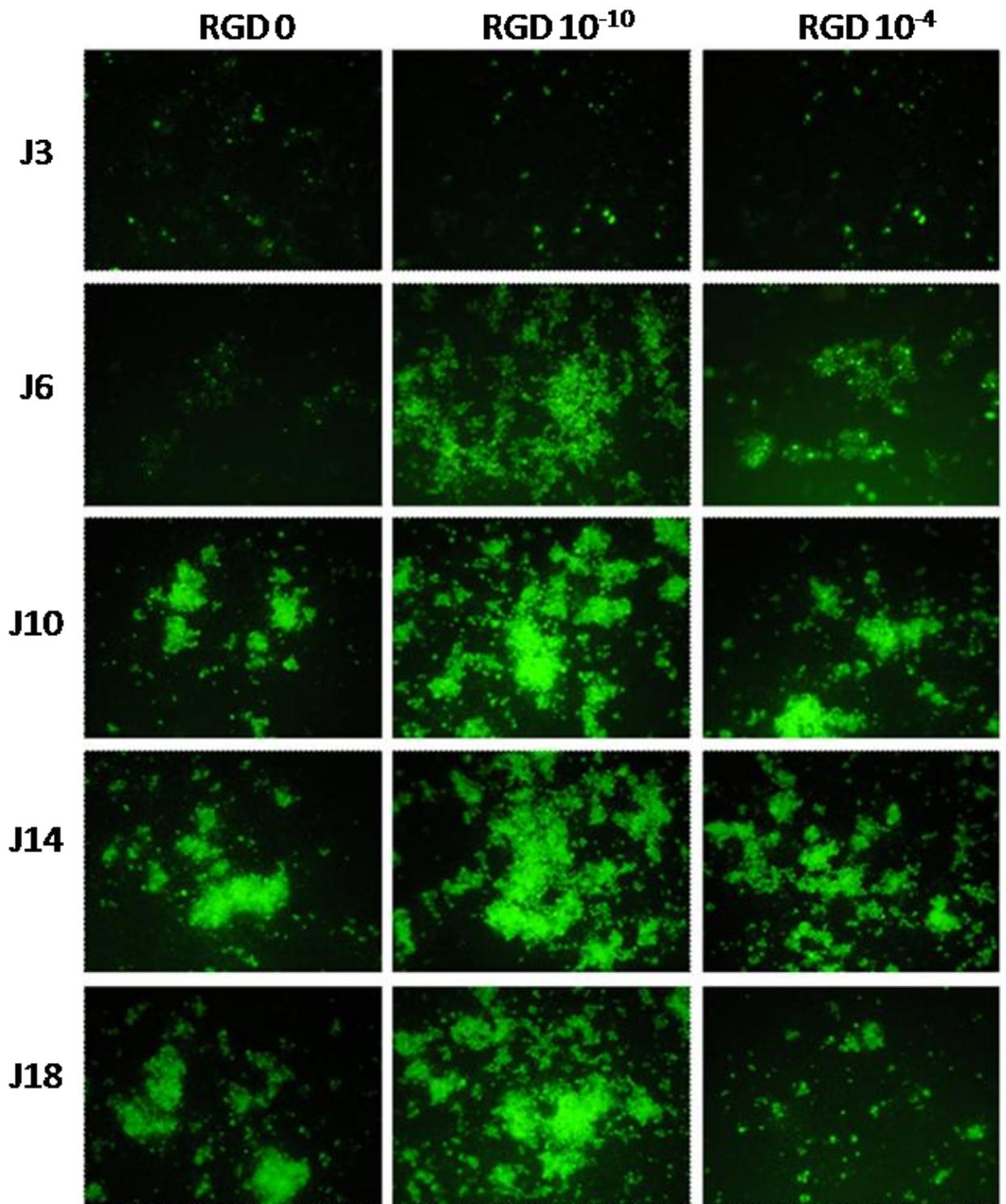


Figure 23 : Cinétique de minéralisation des SaOs-2.

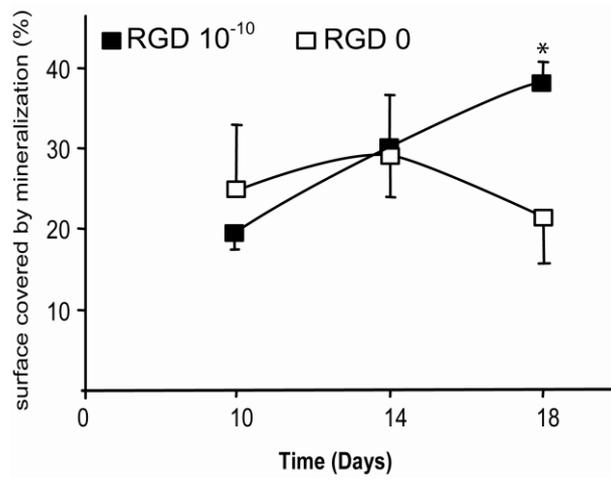


Figure 24 : Recouvrement de la surface du Ti par la minéralisation.

**In Vitro assessment of osteoblasts and macrophages mobility in
presence of β -TCP particles by videomicroscopy**

Beuvelot, J, Pascaretti-Grizon F., Filmon R., Moreau MF.,

Baslé M.F., Chappard D.

Soumis à Journal of Biomedical Materials Research: Part A

Le β -TCP est un des matériaux de comblement osseux les plus utilisés en chirurgie dentaire ou pour le comblement d'un large défaut osseux en chirurgie maxillo-faciale. Mais sa grande friabilité en fait un matériau peu utilisé en orthopédie. Ses principales caractéristiques sont une bonne biocompatibilité et une biodégradabilité dépendante de sa composition. Les grains de β -TCP permettent d'obtenir une macroporosité favorable à la formation osseuse. L'os se forme au contact du β -TCP et les macrophages viennent résorber le biomatériau. La biodégradabilité permet à l'os nouvellement formé de prendre progressivement la place du biomatériau. Après 2 semaines d'implantation chez l'animal, la présence d'ostéoblastes et de cellules géantes (macrophages ou ostéoblastes) est observée (Chazono *et coll.*, 2008). Après 3 mois, une partie du β -TCP est dégradée pour être remplacée par de l'os (Ghosh *et coll.*, 2008; Hou *et coll.*, 2008; Coelho *et coll.*, 2009). Le remodelage osseux étant un processus lent, le remplacement total du β -TCP par l'os peut prendre plusieurs années.

Le comportement des cellules au contact d'un biomatériau peut être étudié par histologie, histomorphométrie et microscopie électronique ou à fluorescence. Très peu de techniques permettent d'étudier en temps réel la colonisation d'un biomatériau par des cellules. La vidéomicroscopie est de plus en plus couramment utilisée notamment pour des études pharmacologiques, toxicologiques, pour suivre les déplacements ou la prolifération cellulaire (Kralova *et coll.*, 2009; Terry *et coll.*, 2009).

Dans notre étude, nous avons souhaité étudier le comportement de cellules osteoblast-like (SaOs-2), de macrophages J774.2 et de macrophages péritonéaux de souris en contact direct avec les particules de β -TCP sur une période de culture autonome de 8 jours.

Pour ce faire, nous avons développé un protocole de culture cellulaire sous vidéomicroscopie. Le système de vidéomicroscopie se compose d'une enceinte thermostatée qui permet le maintien de la température à 37 °C, d'un microscope à épi-illumination (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France) entièrement piloté grâce au logiciel MetaMorph (version 7.5.4.0 Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) et d'une pompe péristaltique contrôlée grâce au logiciel (Figure 25).

Les particules de β -TCP ont été tamisées de façon à ne conserver que les particules dont la taille est comprise entre 150 et 200 μ m. Elles ont ensuite été immergées dans du milieu de culture (RPMI, Eurobio, France) et stérilisées par autoclave.

Les cellules ont été mises en culture dans une chambre de culture (Life Imaging Services, Basel, Switzerland) sur une lamelle de verre (Figure 26), avec les particules de β -TCP tamisées et stériles. Le milieu a été renouvelé à l'intérieur de la chambre grâce à une pompe péristaltique qui assure le transport de milieu à 37°C, pH 7,4 à travers des tubes stériles. Avec le logiciel, les observations ont pu être faites en direct à l'aide d'une caméra CCD. Les paramètres des photographies, de la pompe et les zones d'observations ont été déterminés et enregistrés avec le logiciel. A la fin de la période de culture, les images qui ont été prises ont été compilées pour réaliser des séquences vidéo permettant d'observer l'évolution de la morphologie des cellules, les déplacements cellulaires ou la prolifération. Les lamelles de verre ont ensuite été fixées et observées au MEB.



Figure 25 : Station de vidéomicroscopie comprenant l'enceinte thermostatée, le microscope, la pompe péristaltique. La station est pilotée avec le logiciel MetaMorph.

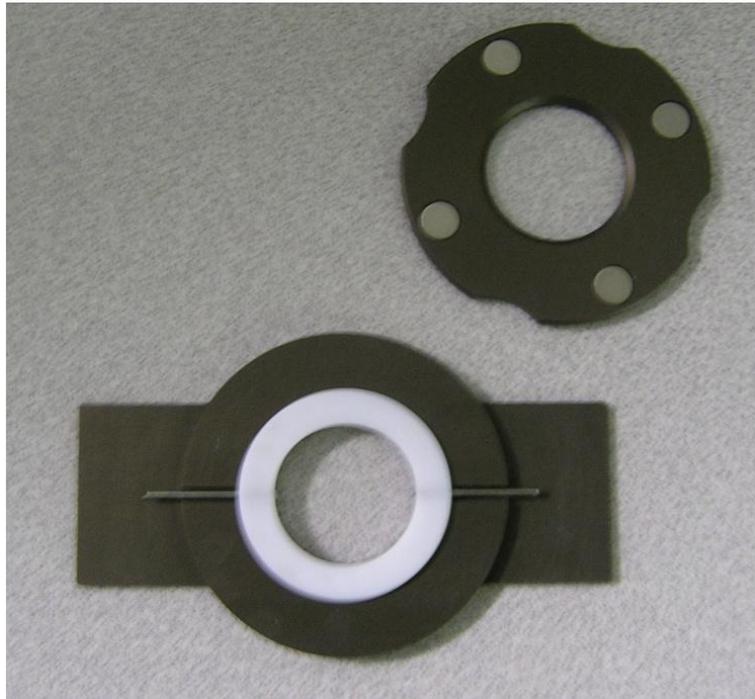


Figure 26 : La chambre de culture est disposée sur la platine du microscope et reliée par des tubes permettant la circulation du milieu.

En analysant les séquences vidéo, nous avons constaté que les conditions de culture étaient idéales pour les SaOS-2, qui ont activement proliféré en direction des particules de β -TCP. En arrivant au contact direct, les cellules colonisent les particules de β -TCP, semblent passer dessous, jusqu'à produire un déplacement des particules. Ces observations ont été confirmées grâce aux observations en MEB qui ont montré les cellules émettant des pseudopodes pour s'accrocher sur les particules et s'y étaler en émettant de nombreux filopodes pour assurer un ancrage direct sur le biomatériau (Figure 27).

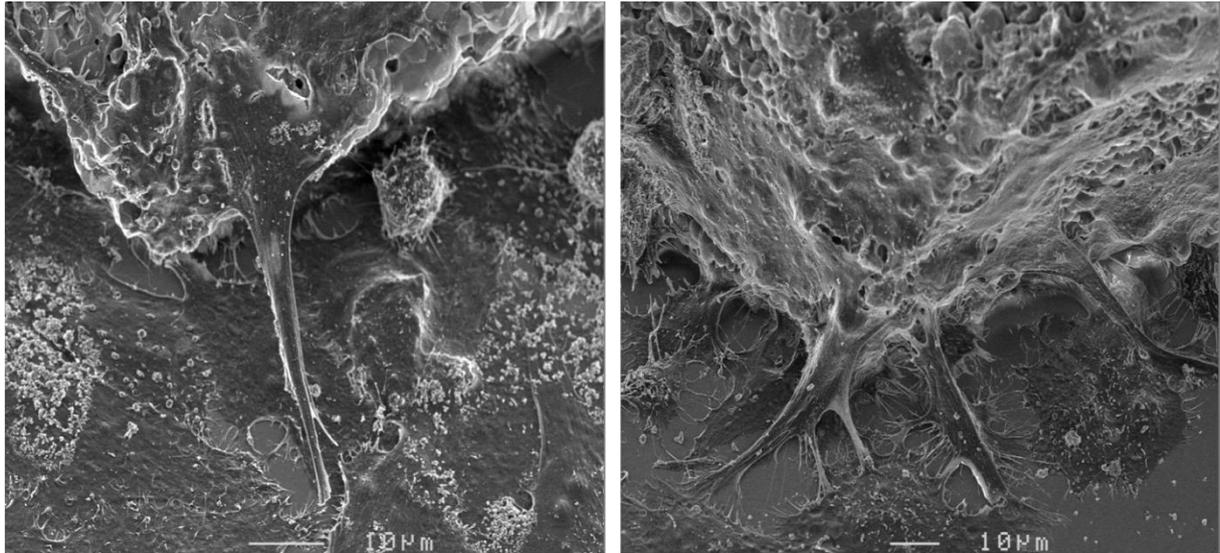


Figure 27 : Cellules osteoblast-like (SaOs-2) qui s'étirent pour coloniser et venir s'étaler à la surface des particules de β -TCP.

Les cellules de la lignée cellulaire J774.2 sont apparues rondes et n'ont pas, ou très peu proliféré ni fusionné pour former des cellules géantes pendant la période de culture. Vers le sixième jour de culture, les cellules sont venues au contact du β -TCP, l'ont colonisé et on a pu observer les mêmes phénomènes de déplacement des particules. Les observations en MEB ont montré là aussi la fixation et l'étalement des cellules sur le β -TCP (Figure 28).

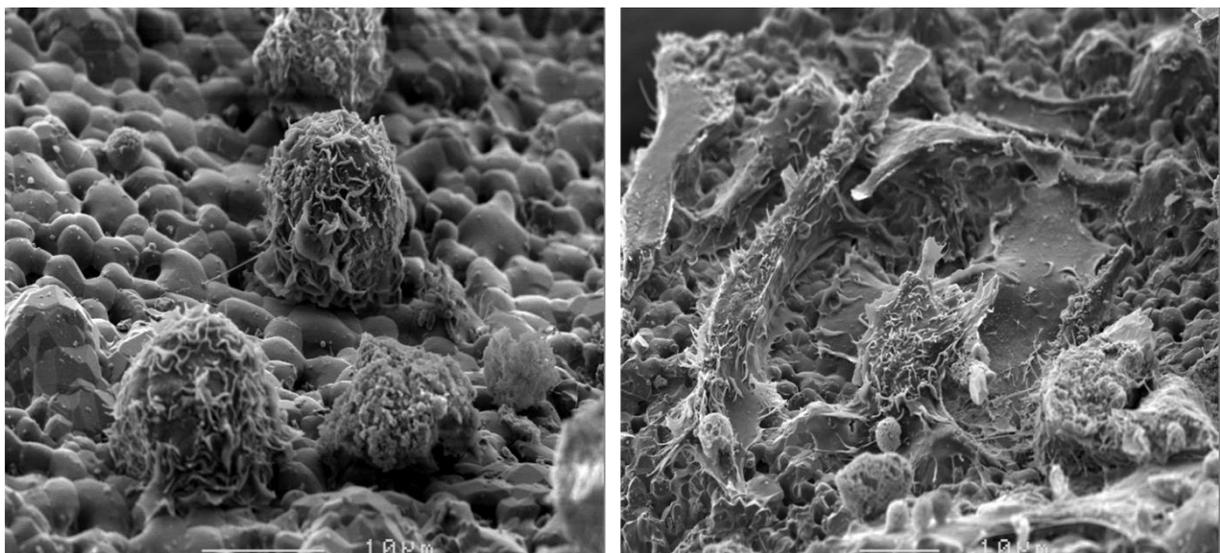


Figure 28 : Macrophages J774.2 à la surface des particules de β -TCP. Les cellules sont venues se fixer puis s'étaler sur le biomatériau.

Les macrophages péritonéaux de souris ont été obtenus après qu'une inflammation ait été induite 24 heures auparavant, par injection de 10 mL de sérum de veau, dans la cavité péritonéale. Pendant la période de culture, les macrophages n'ont pas fusionné ni proliféré. En revanche, ils sont apparus être très mobiles en se déplaçant rapidement en émettant des expansions cytoplasmiques. Les macrophages ont semblé attirés en direction des particules et sont venus au contact direct en les déplaçant de la même façon que les J774.2 et les SaOs-2. Les macrophages se sont avérés capables de dégrader les particules en en arrachant des fragments. Les observations MEB ont montré des macrophages bien étalés et d'autres plus ronds présentant des voiles cytoplasmiques à la surface du β -TCP. Des filopodes ont assuré l'ancrage direct des cellules sur les particules (Figure 29).

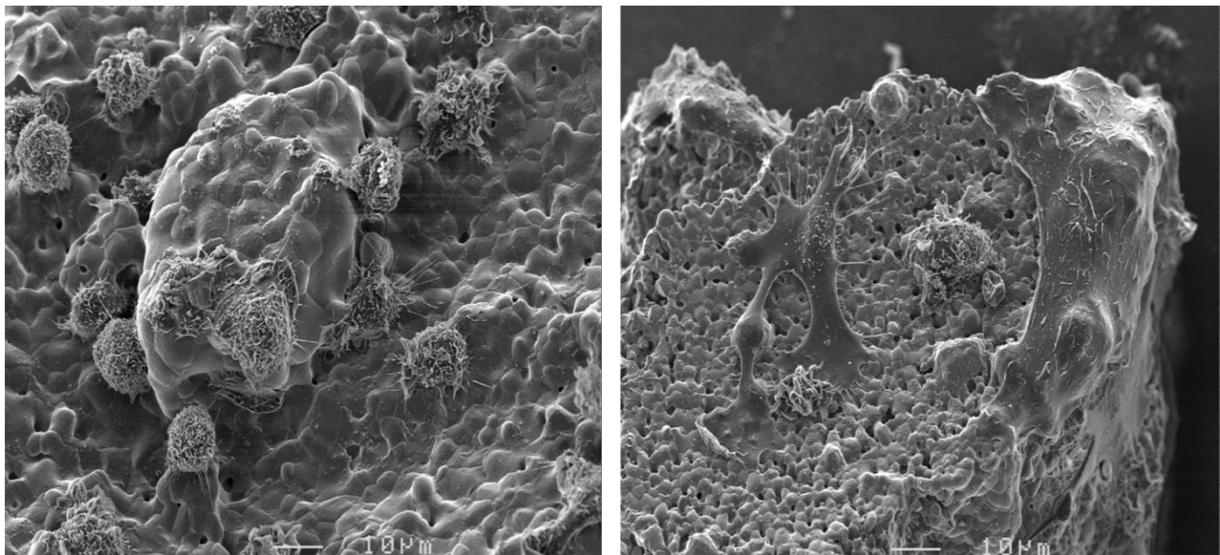


Figure 29 : Les macrophages péritonéaux sont venus se fixer à la surface des particules de β -TCP en émettant des filopodes qui assurent l'ancrage direct des cellules sur les particules.

La vidéomicroscopie s'avère être un outil intéressant pour l'étude des mécanismes de l'ostéoconduction. Cette technique a déjà été utilisée pour étudier les interactions ostéoclastes/ostéoblastes (Vesely *et coll.*, 1992), l'étalement des ostéoclastes en fonction des propriétés électriques de leur membrane (Espinosa *et coll.*, 2002) et le chimiotactisme ou la cytotoxicité de différentes molécules (Zhao *et coll.*, 2005; Kralova *et coll.*, 2009). Mais toutes ces études ont été réalisées sur des temps de culture cellulaire allant de quelques heures à 2 jours.

Le protocole développé durant cette étude permet une observation directe de la colonisation d'un biomatériau par des cellules vivantes durant 8 jours de culture autonome, sans intervention humaine. Les observations faites dans cette étude reflètent probablement ce qui se passe dans les tout premiers temps de l'implantation de β -TCP : le recrutement d'ostéoblastes et de macrophages qui viennent coloniser le matériau de façon centripète.

***In vitro* assessment of osteoblast and macrophage mobility
in presence of β -TCP particles by videomicroscopy**

J. Beuvelot ^a, F. Pascaretti-Grizon ^a, R. Filmon ^a, M-F. Moreau ^a, M-F. Baslé ^a, D. Chappard ^{a*}

^a INSERM, U922 – LHEA, Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex -FRANCE.

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.

Tel: (33) 241 73 58 65

INSERM, U922 – LHEA

Faculté de Médecine,

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

49045 ANGERS Cedex - FRANCE

Key words: β -TCP; Cells Mobility; Videomicroscopy; In Vitro

ABSTRACT

β -TCP is widely used to repair bone defects due to its good biocompatibility, macroporosity (favoring bone ingrowth) and bioresorbability. However, cell interactions with the biomaterial at the first times of implantation remain largely unknown. We have observed cell behaviors in direct contact with β -TCP particles using long term culture under videomicroscopy. Osteoblast-like cells (SaOs-2) and macrophages (J774.2 and mouse peritoneal macrophages) were cultured in presence of β -TCP particles. For each experiment, images from 20 independent fields were acquired and stored every 15 minutes during 8 days. At the end of the culture, they were combined to generate time lapse videos; coverslips were fixed and observed by SEM. SaOs-2 proliferation was determined by counting cells on 6 different and independent fields at day 1, 3 and 6. Videos showed the capacity of cells to displace the particles. Dynamic follow-up showed active proliferation of SaOs-2 occurring in the direction of the particles. J774.2 did not proliferate but came in direct contact with the particles. Peritoneal macrophages did not proliferate but came in direct contact with the particles and actively eroded them. SEM showed that cells were stretched and fixed onto the surface and seemed to climb from the coverslip to the particles. The long term culture under videomicroscopy allowed a better understanding of the colonization process of β -TCP particles by osteoblast-like cells and macrophages. Data obtained from long term videomicroscopy are in agreement with *in vivo* observations confirming the interest of β -TCP to promote osteogenesis.

INTRODUCTION

Bone grafts are used to repair bone loss in case of severe trauma, total hip revision, before dental implant surgery or for the correction of large bone defects.(Hing, 2005) Bone loss can be replaced either by bone from the patient itself (autograft) or from a donor (allograft).(Meeder et Eggers, 1994) However, autografting involves additional morbidity and complications; furthermore, it is limited in volume. Allografts necessitate a bone bank and imply a potential risk of transmission of bacterial, viral or prion infections. The use of xenogenic bone (mainly ox, cow) has suffered from the bovine spongiform encephalopathy problem and is not now considered as a valid alternative. Synthetic bone substitutes, such as calcium-phosphate bioceramics, represent an interesting alternative in some surgical indications.(Gunzburg et Szpalski, 2002; Hinz *et coll.*, 2002) An ideal bone graft substitute should promote new bone ingrowth to replace the missing tissue and should also be resorbed secondarily.(Hing, 2005) β tricalcium phosphate (β -TCP) is one of the earliest bioceramics used as a bone graft substitute since 1920.(Albee, 1920) β -TCP presents the advantage to be highly biocompatible and biodegradable.(Jarcho, 1981; Saito *et coll.*, 2000; Moore *et coll.*, 2001; Dong *et coll.*, 2002; Chappard *et coll.*, 2010) It can be used in the form of granules to obtain an increased macroporosity in the grafted site, thus enhancing biodegradation of the ceramic by increasing its specific surface area.(Knabe *et coll.*, 2008) It was recently reported that the technical mode of preparation of the ceramic could considerably influence macroporosity.(Filmon *et coll.*, 2009) Macroporosity is known to favor bone ingrowth by permitting invasion of vascular sprouts and bone cell precursors.(Knabe *et coll.*, 2008) *In vivo* implantation of β -TCP induces proliferation of new bone trabeculae by the recruitment of numerous osteoblasts. Simultaneously, giant cells, osteoclasts and macrophages appear capable to resorb the biomaterial.(Chazono *et coll.*, 2008) Remnants of β -TCP particles can be incorporated into the newly formed bone

by a direct apposition of bone matrix by osteoblasts.(Chazono *et coll.*, 2004; Chappard *et coll.*, 2010) The combined action of bone-resorbing and bone-forming cells is coupled according to Frost's Basic Multicellular Unit theory(Frost, 1989) and also applies to the mechanisms of bone healing in β -TCP grafted areas. However, the interaction between each cell type population and the biomaterial remains largely unknown. The aim of this study was to observe the behavior of osteoblast-like and macrophages in direct contact with β -TCP particles. We have developed a videomicroscopy approach to observe the long term interaction of these cells *in vitro* with the biomaterial.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines culture

All cell culture consumables were obtained from Eurobio (Eurobio, Les Ulis, France). Human SaOS-2 osteoblast-like cells and J774.2 mouse macrophage cell line (American Type Culture Collection ATCC #HTB 85) were cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. At confluence, SaOS-2 cells were detached using trypsin-EDTA (trypsin/ethylenediamine tetraacetic acid) and harvested by scrapping. Proliferation of osteoblast-like cells was evaluated by counting the cell number in 6 different and independent fields after 1, 3 and 6 days.

Primary macrophage culture

Activated mouse peritoneal macrophages were collected since these cells are well known to have an increased metabolic activity and enhanced phagocytic function.(Ratzen *et coll.*, 1972)

Sterile fetal calf serum (10ml) was injected into the peritoneal cavity of C57Bl6 mice to induce an inflammatory reaction. Mice were sacrificed on the next day and the peritoneum was washed with RPMI. Cell suspension was centrifuged and rinsed with fresh RPMI. Cells were counted and directly seeded on the coverslip in the cell culture chamber.

The videomicroscopy station

The videomicroscopy station included a Leica DM6000 (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France) equipped with an epi illumination system. The microscope had an x, y, z motorized stage and a cooled SNAP HQ² CDD (Coupled Charge Device) camera (Photometrics, Tucson, Arizona, USA) with 12-bit grey scale resolution. The camera, cooled to very low temperature (-30°C), leads to an improved sensitivity. The microscope was placed in a thermostated chamber which maintained all devices at 37°C. The thermostated chamber comprised computer-driven peristaltic pumps, a sterile culture chamber (Life Imaging Services, Basel, Switzerland) and a sterile vial containing the fresh culture medium (RPMI) to be injected into the culture chamber. A pH electrode controlled the medium acidity during all the experiment. A CO₂ cut-off valve, coupled to the pH meter, was used to keep the pH of the culture medium around 7 by injecting CO₂ in the fresh medium when it rose above 7.44.

The whole system was controlled by a PC using the MetaMorph software (release 7.5.4.0, Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA). Image acquisition, motorized stage, time-lapse video and pump programming were directly controlled by the software. Images were acquired using differential interference contrast (DIC) with a 10x objective; the exposure time was approximately 70ms. For each experiment, images from 20 independent fields were acquired during an 8 day period. Images were captured and stored on the computer hard disk every 15 minutes. At the end of the study, they were combined to generate

time lapse videos. During the 8 day culture period, the medium was changed every five hours. The peristaltic pump (controlled by the MetaMorph software) was programmed to replace 1 ml of fresh medium during 10 minutes every 5 hours at the lowest speed of injection.

The cell culture chamber was composed of a cover ring (with magnets) including an upper glass coverslip, a polytetrafluoroethylene (PTFE) ring with steel nozzles and a glass coverslip (24 mm in diameter) included in a base with magnets. The whole system was cleaned with deionised water and 70% alcohol. The glass coverslips were washed in alcohol for 24h and rinsed with deionised water. Then, they were autoclaved and sealed on the chamber using silicone grease. When the 3 parts of the culture chamber have been assembled, the chamber was sterilized under UV irradiation for one night. Sterile Tygon tubes (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) were connected to the nozzles and used to drive the culture medium to (and from) the culture chamber.

Preparation of the β -TCP particles

β -TCP particles prepared by the foam technique and ranging from 100 and 500 μ m were obtained from Kasios (Kasios, Launaguet, France). Particles were poured in water and filtered through nylon films: a 100 μ m mesh was used to remove the smallest particles. A second filtering through a 200 μ m mesh served to select particles under 200 μ m. β -TCP particles were autoclaved and stocked in the culture medium.

Cell culture in contact with β -TCP particles

Cells were seeded onto the lower coverslip in the chamber at a density of $9 \cdot 10^4$ cells/cm² in 1mL of medium. They were allowed to attach for 1 night before rinsing to remove non

adherent cells. β -TCP particles were added with fresh culture medium and the chamber was closed with the magnetic coverslip. The incubation chamber was placed on the motorized stage of the videomicroscope. The Tygon tubes were fixed on the nozzles of the PTFE ring and connected to the peristaltic pump to perfuse the chamber with fresh medium at 37°C and pH 7.4. The culture chamber was filled with fresh medium and sequential image acquisition was programmed as described above.

Scanning electron microscopy (SEM)

After 8 days of culture, glass coverslips containing β -TCP particles and the cultured cells were fixed in 4% glutaraldehyde for 20 min at 4°C. They were rinsed in cacodylate buffer, 3 times during 5 min., dehydrated with graded ethanol baths, critical point dried in liquid CO₂, and carbon-coated (10 nm thickness) with a MED 020 system (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). SEM observations were performed on a JEOL 6301F (JEOL, Tokyo, Japan) field emission microscope with a 10 kV accelerating voltage at a distance of 15 mm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Systat 11 statistical software (Systat Software, Inc., San Jose, CA). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Parameters were analyzed by ANOVA with Fisher's Least Significant difference post-hoc test. Differences were considered as significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Behavior of Saos-2 cells in presence of β -TCP

Osteoblast-like cells were well spread on the glass coverslip around the large β -TCP particles which appeared black on the video sequences (Figure 1 and avi sequences). During all experiments, few apoptotic cells were observed as refringent groups of round subcellular material. Cells proliferated slowly at the beginning and faster between 3 and 6 days of culture (Figure 2). The proliferation seemed to occur in the direction of the β -TCP particles. When cells came in direct contact with the β -TCP particles, they appeared capable of displacing them in the culture chamber. These movements seemed to occur when the osteoblasts leave the coverslip to climb on the particles. These observations were confirmed by the SEM observations showing that osteoblast-like cells lying on the glass coverslip emitted pseudopods that bound them to the biomaterial (Figure 5A). At a later stage of cell movement, the cells were fully anchored onto the surface of β -TCP particles. The final step was observed when osteoblasts appeared well spread at the top of the particles with numerous filopodia allowing a direct anchorage of the cells on the biomaterial (Figure 5B and C). On SEM pictures, the β -TCP surface presented a typical pavement aspect.

Behavior of J774.2 cells in presence of β -TCP

Macrophage J774.2 cells appeared with a round shape on the glass coverslips. During the culture period, cells did not proliferate and never fused to form giant cells. Before 6 days of culture in the incubation chamber, macrophages came in contact with the β -TCP particles and were capable to displace them (Figure 3), this was particularly evident on the video sequences when the particles move after the cells have attached or have leaved the biomaterial surface. SEM observations highlighted the process of colonization of the biomaterial by J774.2 cells

(Figure 5). Cells appeared stretched and affixed onto the β -TCP surfaces (Figure 5D). Some macrophages appeared with a round shape whereas others were spread on the surface with numerous filopodia which permitted a direct anchorage on the β -TCP biomaterial (Figure 5E and F). After 6 days, the number of viable cells was markedly decreased.

Behavior of primary murine macrophages in presence of β -TCP

These activated macrophages did not fuse into giant cells nor proliferated during the culture period. Cells appeared well fixed on the glass coverslip and were highly mobile (Figure 4). They moved by emitting cytoplasmic extensions and seemed attracted in the direction of β -TCP particles. Macrophages came in direct contact with the particles and displaced them in the same way than J774.2 cells. Macrophages were able to degrade the β -TCP particles by tearing off some pieces of particles and engulfing them in their cytoplasm (see video sequence 2). SEM observations of the coverslip after one week of culture highlighted the process of colonization of the biomaterial by primary murine macrophages (Figure 5). Some macrophages appeared with a round shape and exhibited cytoplasm veils whereas others were well spread on the surface of the β -TCP (Figure 5 G and I). Filopodia were observed and ensured a direct anchorage of the cells on the β -TCP (Figure 5H). True images of local disruption of the typical pavement surface were observed and evocated eroded surfaces.

DISCUSSION

Ideally, a bioceramic used as bone substitute should be a temporary scaffold for bone formation and be totally degradable to undergo complete substitution by newly formed functional bone. (Yaszemski *et coll.*, 1996) *In vivo* biodegradability degree has been proved to

be dependant of the particle size and porosity.(Buser *et coll.*, 1998; Oonishi *et coll.*, 1999; Knabe *et coll.*, 2008) A small particle size (e.g., 5-20 μm) can induce an early and marked inflammation.(Malard *et coll.*, 1999; Fella *et coll.*, 2007) Larger particles, (80-100 μm), induce a moderate inflammatory reaction and 200-400 μm particles allow bone apposition.(Malard *et coll.*, 1999) In the present study, particles between 100 and 200 μm were used to analyze the long term behavior of osteoblasts and macrophagic cells in direct contact with the biomaterial. Bioactive ceramics can support direct bone bonding onto their surface and elicit a response similar to the normal cascade of bone remodeling that takes place within the porous trabecular network.(Hing, 2005) Bone bonding consists of a direct apposition of bone matrix by osteoblasts recruited at the material surface. β -TCP is a bioactive ceramic which, in addition, possesses the ability to be degraded easily by macrophages and osteoclasts.(Zijderveld *et coll.*, 2005; Chappard *et coll.*, 2010) β -TCP osteoconductive properties have been largely demonstrated in rats(Takeuchi *et coll.*, 2009), rabbits(Walsh *et coll.*, 2008) and humans.(Knabe *et coll.*, 2008) An *in vivo* study evidenced active osteoblasts on newly formed trabeculae and active osteoclasts 2 weeks after implantation β -TCP particles in the rat.(Chazono *et coll.*, 2008) Similarly, our group evidenced the centripetal development of new bone trabeculae by microcomputed tomography as early as 8 days after implantation in the femoral condyle of the rabbit.(Nyangoga *et coll.*, 2010) After a 3 month implantation period, the extensive formation of bone trabeculae formed onto and around β -TCP particles is reported in a number of studies.(Ghosh *et coll.*, 2008; Hou *et coll.*, 2008; Coelho *et coll.*, 2009; Zhang *et coll.*, 2009) β -TCP favors osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells(Kasten *et coll.*, 2008; Tao *et coll.*, 2009; Zhang *et coll.*, 2009), however, the early stages of cellular invasion, both *in vivo* and *in vitro*, have received little consideration. Videomicroscopy is an interesting approach to study the osteoconduction mechanism. Cell morphology is generally studied by

SEM(Aybar *et coll.*, 2004; Inoue *et coll.*, 2004) and proliferation/differentiation by DNA assay.(Liu *et coll.*, 2008) In the present study, cell morphology and proliferation were analyzed in a long term study by videomicroscopy. The technique has been used in a number of cell studies but usually, short-term culture observations are considered (few hours to 1-2 days). Videomicroscopy allowed the study of osteoblasts-osteoclasts interactions(Vesely *et coll.*, 1992), osteoclasts spreading in relation with calcium-dependent potassium current(Espinosa *et coll.*, 2002) or even the chemotaxis or cytotoxicity of molecules.(Zhao *et coll.*, 2005; Kralova *et coll.*, 2009) Osteoblast mobility on extracellular matrix (ECM) was studied by dual fluorescence imaging of proteins involved in mobility and cell organization process(Sivakumar *et coll.*, 2006) or transmitted light(Klein *et coll.*, 2007) to study bone healing. The method has also been used to monitor mineralization dynamics in primary osteoblast cultures.(Dallas *et coll.*, 2009) In our study, osteoblasts migration was found centripetal similar to the osteoconduction observed *in vivo* with calcium phosphate ceramics.(Daculsi *et coll.*, 1990) While it is well known that osteoblasts attach to calcium phosphate surfaces, the mechanisms for such migration are not completely understood.(Shu *et coll.*, 2003) Osteoblast attachment onto the β -TCP particles appeared to generate strains strong enough to displace the particles which were not anchored onto the bottom of the culture chamber. Most of the time, bulk and heavy materials (e.g., titanium or steel stubs) are studied by videomicroscopy; this may explain why this phenomenon does not seem to be reported yet.(Beuvelot *et coll.*, 2009) Similar observations can be made for macrophages like J774.2 cells which can erode biomaterials *in vitro* and make resorption areas.(Mabilleau *et coll.*, 2004) Attachment and strains exerted by macrophagic cells appeared huge and cells were able to displace β -TCP particles which were approximately 100 times larger than themselves. Two macrophage cell types were studied here because migration of J774.2 appeared poor on the video sequences whereas cells were observed colonizing the β -TCP

particles on the SEM images. In addition, mouse peritoneal macrophages were primary and activated cells in which the phagocytic capacities are stimulated. Mouse macrophages appeared more mobile and active than J774.2 on the video sequences. Recently, interaction of different bone cell types with a dense and fine-grained transparent hydroxyapatite has been investigated by videomicroscopy, showing the good biocompatibility of the biomaterial.(John *et coll.*, 2009) Osteoblast-like cells interactions with different dental implant surfaces have been investigated during 9 days by videomicroscopy with the development of cell clusters after 2 days of incubation.(Qu *et coll.*, 2007)

CONCLUSION

In this study, cytocompatibility and degradability of β -TCP particles was confirmed by dynamic observations of biomaterial colonization by cells. Videomicroscopy allowed a direct observation of living cells during an 8 day period without human intervention during the culture period. The observations made on the video sequences represent probably what happens in the very first times of *in vivo* β -TCP implantation: osteoblasts and macrophages are rapidly recruited from the vicinal bone marrow spaces and can colonize β -TCP particles. After *in vivo* implantation of β -TCP, biopsies have also shown the presence of endothelial capillaries associated with osteoblasts and macrophages but could be not tested in this study.

Acknowledgments

Authors are greatly indebted to Kasios, ZI La Croix, 31140 Launaguet – France for providing the biomaterial. This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat – Région “Pays de la Loire” in the Bioregos 2 program and INSERM. SEM analyses were performed at Service Commun d’Imagerie et d’Analyses Microscopiques (SCIAM), Université d’Angers.

REFERENCES

- [1] Hing KA. Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry. *Int J Appl Ceram Technol* 2005;2:184-199.
- [2] Meeder PJ, Eggers C. The history of autogenous bone grafting. *Injury* 1994;25 Suppl 1:A2-3.
- [3] Gunzburg R, Szpalski M. Use of a novel beta-tricalcium phosphate-based bone void filler as a graft extender in spinal fusion surgeries. *Orthopedics* 2002;25:591-595.
- [4] Hinz P, Wolf E, Schwesinger G, Hartelt E, Ekkernkamp A. A new resorbable bone void filler in trauma: early clinical experience and histologic evaluation. *Orthopedics* 2002;25:597-600.
- [5] Albee FH. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Ann Surg* 1920;71:32-39.
- [6] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res* 1981;259-278.
- [7] Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71:354-361.
- [8] Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002;23:4493-4502.
- [9] Saito M, Shimizu H, Beppu M, Takagi M. The role of beta-tricalcium phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci* 2000;5:275-282.
- [10] Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: A microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron* 2010.
- [11] Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M. Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 2008;29:2249-2258.
- [12] Filmon R, Retailleau-Gaborit N, Brossard G, Grizon-Pascaretti F, Baslé MF, Chappard D. Preparation of β -TCP granular material by polyurethane foam technology. *Image Anal. Stereol.* 2009; 28:1-10.
- [13] Chazono M, Tanaka T, Kitasato S, Kikuchi T, Marumo K. Electron microscopic study on bone formation and bioresorption after implantation of beta-tricalcium phosphate in rabbit models. *J Orthop Sci* 2008;13:550-555.
- [14] Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:542-549.
- [15] Frost HM. Some ABCs of skeletal pathophysiology. III: Bone balance and the delta B.BMU. *Calcif Tissue Int* 1989;45:131-133.

- [16] Ratzan KR, Musher DM, Keusch GT, Weinstein L. Correlation of increased metabolic activity, resistance to infection, enhanced phagocytosis, and inhibition of bacterial growth by macrophages from Listeria- and BCG-infected mice. *Infect Immun* 1972;5:499-504.
- [17] Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 1996;17:175-185.
- [18] Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999;44:31-43.
- [19] Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:137-150.
- [20] Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:103-111.
- [21] Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:287-294.
- [22] Zijderveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:432-440.
- [23] Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y, Ohtomo K. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of beta-tricalciumphosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. *Dent Mater J* 2009;28:595-601.
- [24] Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 2008;29:266-271.
- [25] Nyangoga H, Aguado E, Goyenvalle E, Baslé MF, Chappard D. A non steroidal anti inflammatory drug (ketoprofen) does not delay β -TCP bone graft healing. *Acta Biomater* 2010;accepted for publication:
- [26] Coelho PG, Coimbra ME, Ribeiro C, Fancio E, Higa O, Suzuki M, Marincola M. Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a β -TCP particulate material for bone augmentation. *Mat Sci Eng C* 2009;29:2085-2091.
- [27] Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, Basu D. In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;86:217-227.

- [28] Hou XJ, Mao KY, Chen DF. Bone formation performance of beta-tricalcium phosphate sintered bone. *J Clin Rehab Tiss Eng Res* 2008;12:9627-9630.
- [29] Zhang ZY, Teoh SH, Chong WS, Foo TT, Chng YC, Choolani M, Chan J. A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:2694-2704.
- [30] Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbuhl R, Bohner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* 2008;4:1904-1915.
- [31] Tao J, Sun Y, Wang QG, Liu CW. Induced endothelial cells enhance osteogenesis and vascularization of mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs* 2009;190:185-193.
- [32] Aybar B, Bilir A, Akcakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:119-125.
- [33] Inoue M, LeGeros RZ, Inoue M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Yamamoto T, Nagai N. In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:585-593.
- [34] Liu Q, Cen L, Yin S, Chen L, Liu G, Chang J, Cui L. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials* 2008;29:4792-4799.
- [35] Vesely P, Boyde A, Jones SJ. Behaviour of osteoclasts in vitro: contact behaviour of osteoclasts with osteoblast-like cells and networking of osteoclasts for 3D orientation. *J Anat* 1992;181:277-291.
- [36] Espinosa L, Paret L, Ojeda C, Tourneur Y, Delmas PD, Chenu C. Osteoclast spreading kinetics are correlated with an oscillatory activation of a calcium-dependent potassium current. *J Cell Sci* 2002;115:3837-3848.
- [37] Zhao X, Jain S, Benjamin Larman H, Gonzalez S, Irvine DJ. Directed cell migration via chemoattractants released from degradable microspheres. *Biomaterials* 2005;26:5048-5063.
- [38] Kralova V, Brigulova K, Cervinka M, Rudolf E. Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1497-1503.
- [39] Sivakumar P, Czirok A, Rongish BJ, Divakara VP, Wang YP, Dallas SL. New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts. *J Cell Sci* 2006;119:1350-1360.
- [40] Klein MO, Reichert C, Koch D, Horn S, Al-Nawas B. In vitro assessment of motility and proliferation of human osteogenic cells on different isolated extracellular matrix components compared with enamel matrix derivative by continuous single-cell observation. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:40-45.
- [41] Dallas SL, Veno PA, Rosser JL, Barragan-Adjemian C, Rowe DW, Kalajzic I, Bonewald LF. Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization

- dynamics in primary murine osteoblasts and the late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5. *Cells, tissues, organs* 2009;189:6-11.
- [42] Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raher S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990;24:379-396.
- [43] Shu R, McMullen R, Baumann MJ, McCabe LR. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:1196-1204.
- [44] Beuvelot J, Portet D, Lecollinet G, Moreau MF, Baslé MF, Chappard D, Libouban H. In vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD functionalized bisphosphonate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:873-881.
- [45] Mabileau G, Moreau MF, Filmon R, Baslé MF, Chappard D. Biodegradability of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) in the presence of the J774.2 macrophage cell line. *Biomaterials* 2004;25:5155-5162.
- [46] John A, Varma HK, Vijayan S, Bernhardt A, Lode A, Vogel A, Burmeister B, Hanke T, Domaschke H, Gelinsky M. In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic. *Biomed Mater* 2009;4:15007.
- [47] Qu Z, Rausch-Fan X, Wieland M, Matejka M, Schedle A. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:658-668.

FIGURE CAPTIONS

- Figure 1: Time lapse images showing SaOs-2 behavior between 20 and 180 hours. β -TCP particles appear in black. The arrow indicates cells moving toward the particle.
- Figure 2: SaOs-2 proliferation between 1 and 6 days. Cell proliferation was slow between 1 and 3 days and became more intensive after 6 days.
- Figure 3: Time lapse images showing J774.2 behaviors between 18 and 162 hours. The β -TCP particle appears in black. The arrows indicate A and B cells coming in direct contact with the particle.
- Figure 4: Time lapse images showing mouse macrophages behaviors between 50 and 90 hours. β -TCP particles appear in black. The arrows indicate A, B and C cells coming in direct contact with the particle. After 70h, A is under the particle. After 78h, B is under the particle and after 90h, A, B and C are under the particle.
- Figure 5: SEM observations of cells behaviors in contact with β -TCP. Cells emit cytoplasmic prolongations to fix on the particles (A, D). Osteoblasts-like and macrophage cells are well fixed on the β -TCP by filopodia (B, E, and H).

Figure 1

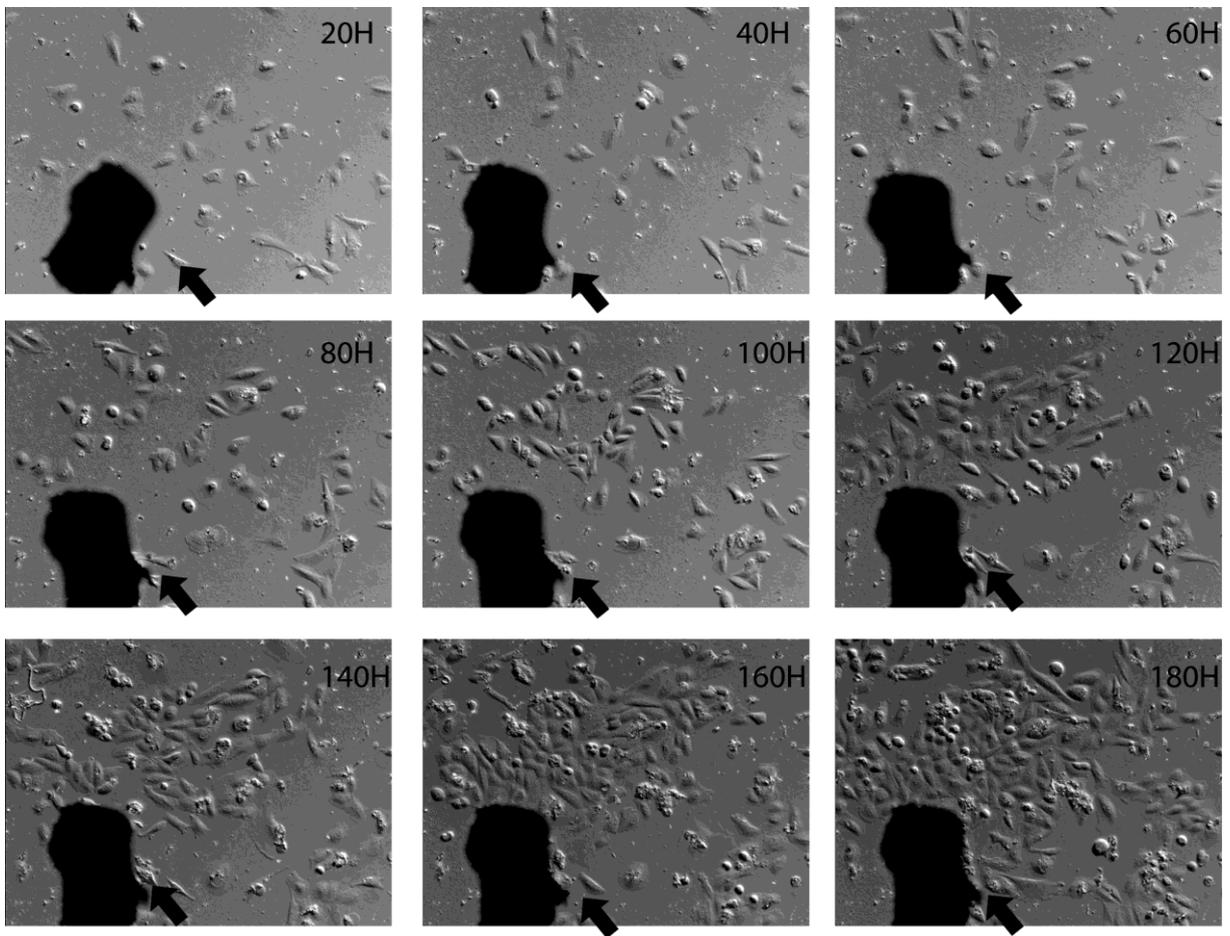


Figure 2

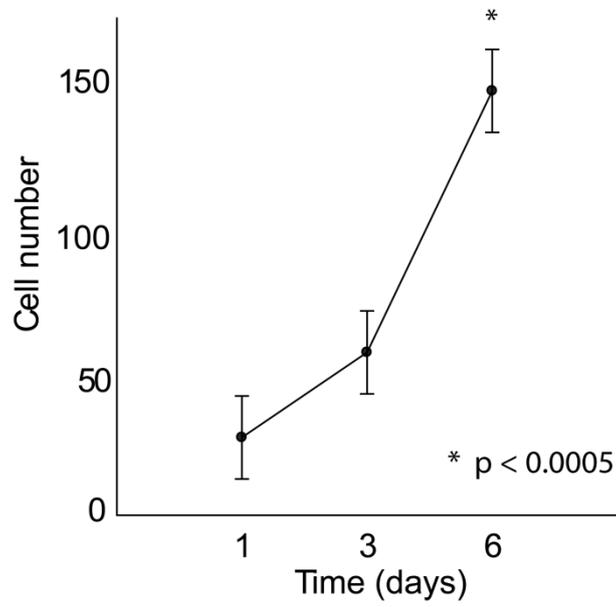


Figure 3

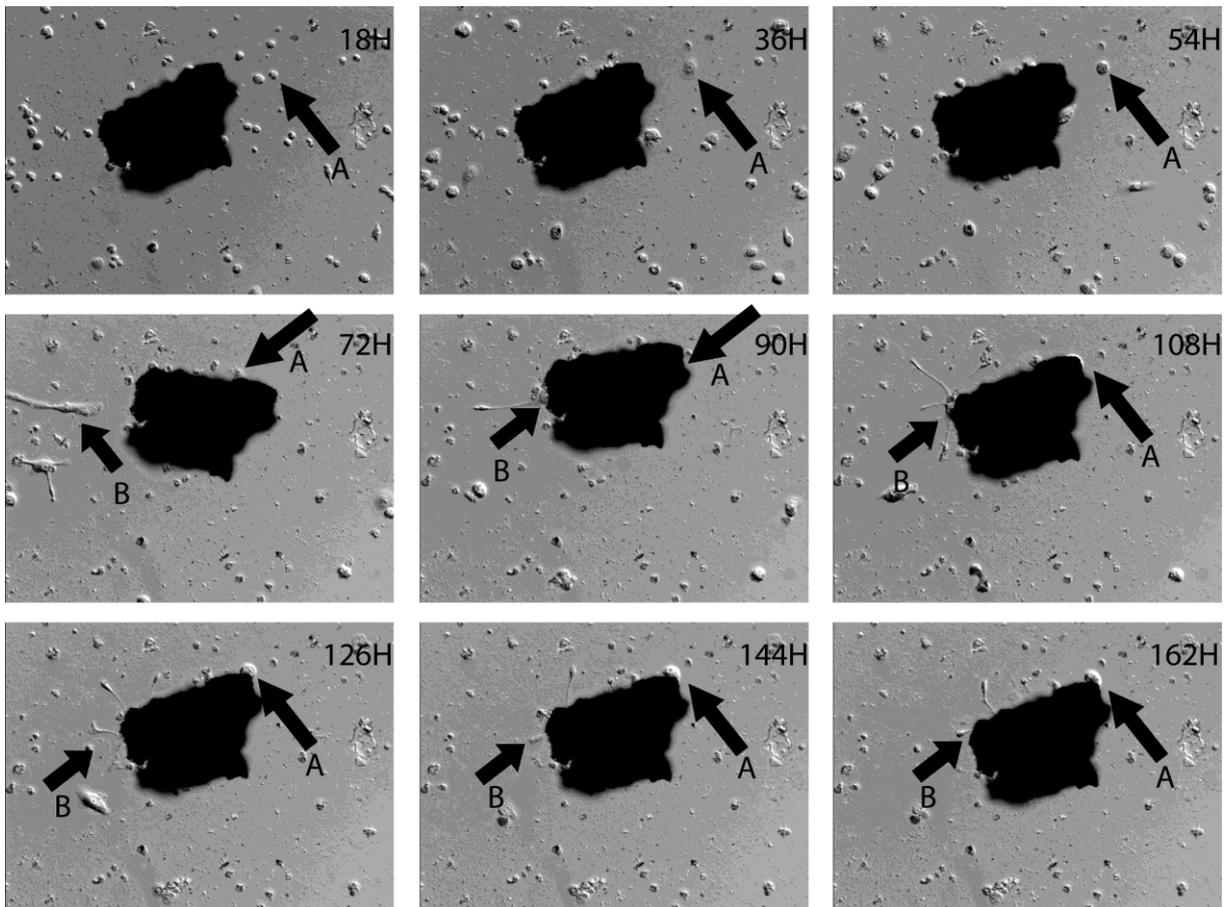


Figure 4

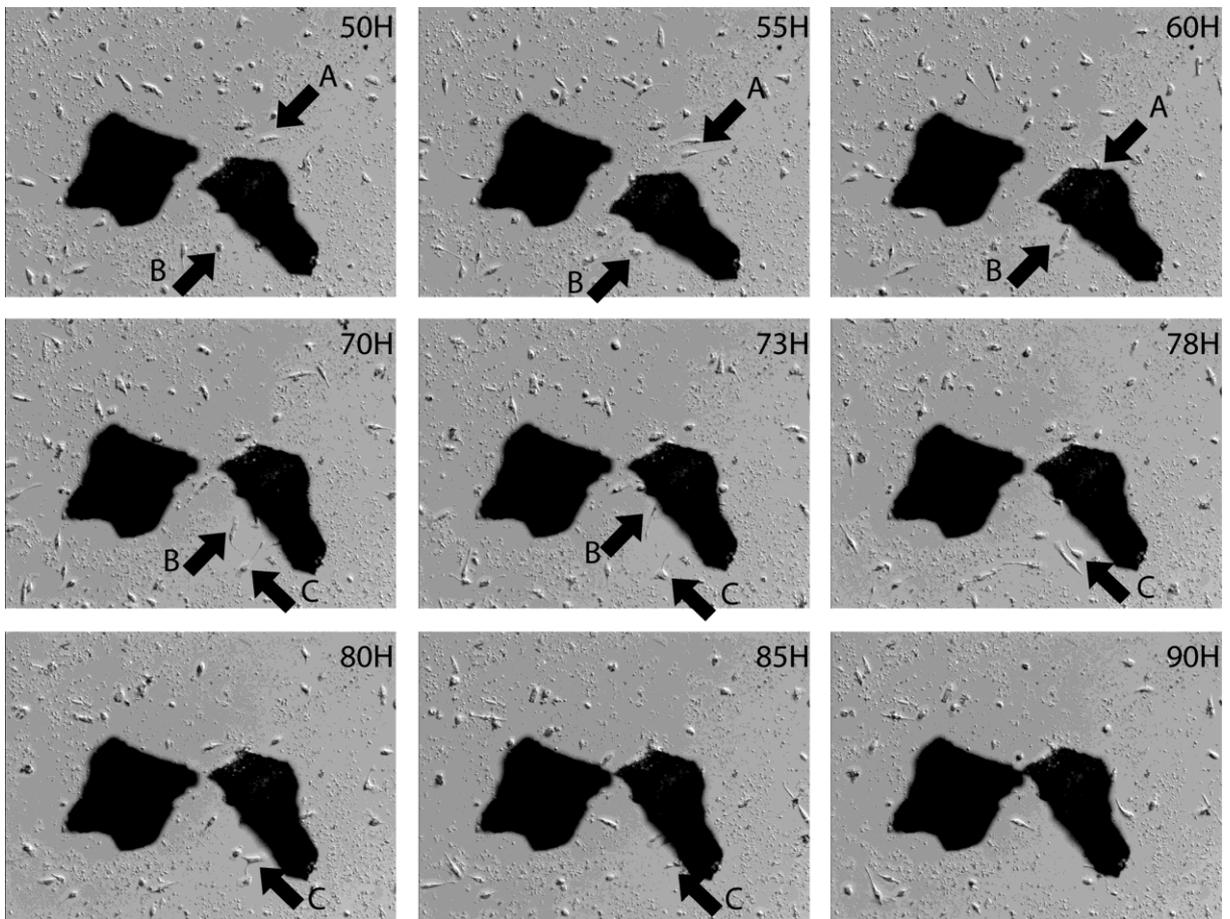
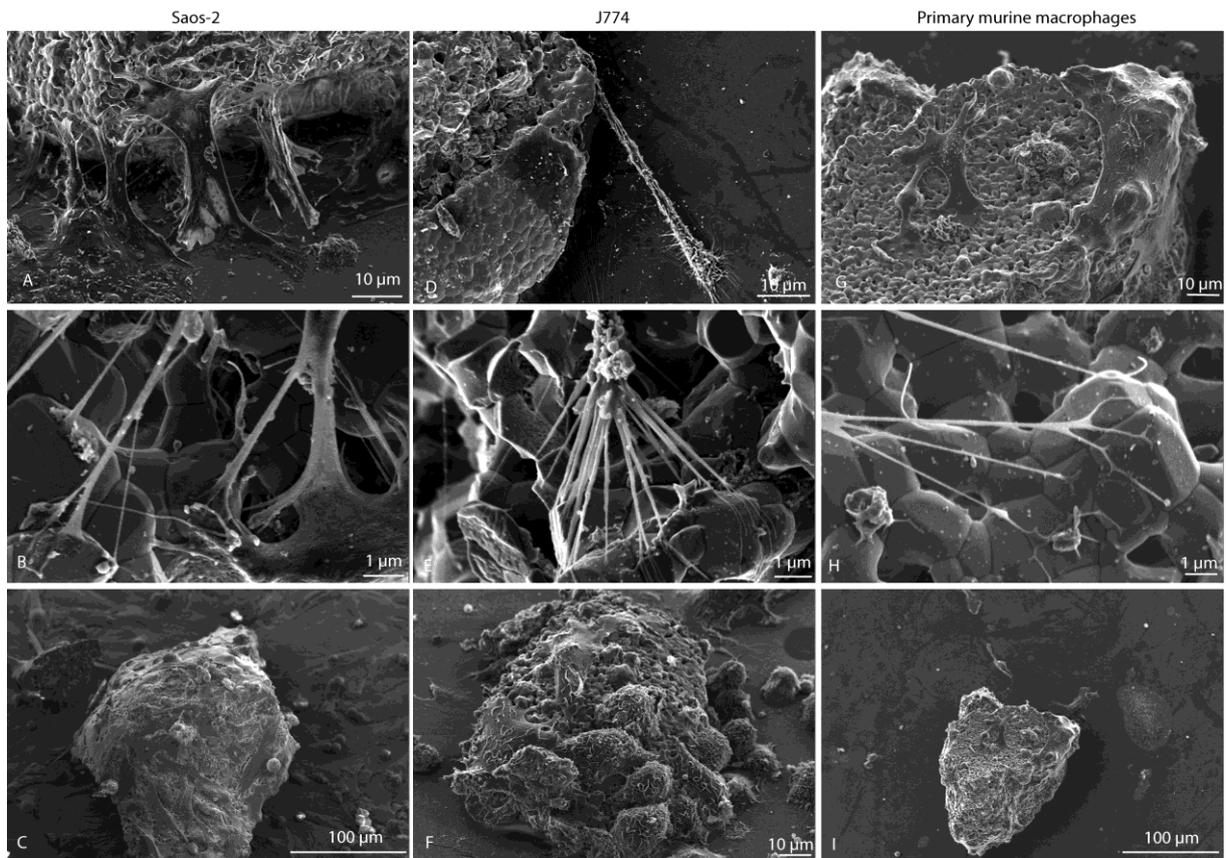


Figure 5



**In Vitro calcification of chemically functionalized carbon
nanotubes**

Beuvelot, J, Bergeret C., Mallet R., Fernandez V., Cousseau J., Baslé M.F.,
Chappard D.

Soumis à Acta Biomaterialia

Les CNTs sont une nouvelle classe de matériaux utilisables en biomédecine grâce à leurs propriétés mécaniques, physiques et chimiques intéressantes (Ajayan, 1999; Yu *et coll.*, 2000; Zanello *et coll.*, 2006). Les CNTs résistent à d'importantes contraintes axiales et possèdent une grande résistance à la rupture (Yu *et coll.*, 2000). Leur utilisation en tant que matériau implantable permettrait d'améliorer les propriétés mécaniques d'un os endommagé (Zanello *et coll.*, 2006).

Pour être utilisés dans le domaine biomédical, le problème majeur des nanotubes est leur manque de solubilité. Le récent développement de méthodes de modification et de fonctionnalisation des CNTs a rendu possible leur solubilisation et donc leur dispersion dans l'eau. La fonctionnalisation permet de les manipuler plus facilement et de les utiliser dans un environnement physiologique (Hirsch, 2002; Niyogi *et coll.*, 2002; Katz et Willner, 2004). Il existe 3 différentes méthodes pour modifier la surface des CNTs par des biomolécules ; l'attachement covalent, l'attachement non-covalent et l'hybridation. Il est possible, par exemple, de greffer à la surface des nanotubes de façon covalente des groupes RGD qui améliorent l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes (Zhang *et coll.*, 2009). Mais la méthode la plus souvent utilisée est la fonctionnalisation covalente des nanotubes par des fonctions carboxylique (-COOH). Ces fonctions sont introduites par une forte réaction d'oxydation réalisée avec un acide puissant. Les groupements -COOH se greffent principalement aux extrémités ouvertes ou sur des sites de défaut sur les parois latérales des nanotubes (Yang *et coll.*, 2007). La fonctionnalisation covalente par les groupements acide carboxylique est la méthode la plus simple pour modifier chimiquement des nanotubes. Mais l'excès d'oxydation peut aussi influencer significativement la structure et les propriétés des nanotubes en créant de trop nombreux défauts.

La fonctionnalisation non covalente permet de fonctionnaliser les nanotubes sans introduire de défaut à leur surface. Les molécules sont directement adsorbées à la surface des CNTs. Enfin, l'hybridation est un combiné des deux précédentes méthodes de fonctionnalisation. Elle consiste à greffer de façon non-covalente, par adsorption, une petite molécule d'ancrage sur laquelle va venir se fixer de façon covalente la molécule d'intérêt. Les cycles aromatiques ou les molécules hydrophobes sont idéaux pour être fixés de façon non-covalente à la surface des CNTs. De plus, la greffe non-covalente peut aussi bien se faire sur les extrémités que sur les parois latérales des CNTs. Le polyéthylène glycol (PEG) peut par exemple être greffé de façon non-covalente sur les nanotubes et prévenir l'adsorption de protéines non spécifiques (Shim *et coll.*, 2002). Le PEG greffé peut ensuite être modifié pour devenir un site de fixation

pour des protéines. Il est aussi possible d'adsorber des composés polyaromatiques, tel que le pyrène, fonctionnalisé par un groupe fonctionnel comme le N- Hydroxysuccinimide (NHS) sur lequel des protéines peuvent être attachées (Chen *et coll.*, 2001).

La fonctionnalisation confère aussi une meilleure biocompatibilité (Colvin, 2003; Shvedova *et coll.*, 2003; Warheit *et coll.*, 2004). Les nanotubes peuvent alors servir au transport de médicaments pour la chimiothérapie (Chaudhuri *et coll.*), d'antigènes ou pour la thérapie génique (Jung *et coll.*) ainsi que dans le comblement osseux. Les CNTs présentent un intérêt croissant mais comme ils ne sont pas biodégradables, il a fallu s'assurer que ce matériau n'était pas cytotoxique. La toxicité serait due à leur insolubilité initiale mais aussi aux résidus métalliques des catalyseurs (Bianco *et coll.*, 2005). Il a été montré *in vitro* que les nanotubes de carbone n'étaient pas toxiques pour les ostéoblastes et pouvaient être utilisés à de fins biomédicales (Chłopek *et coll.*, 2006; Kalbacova *et coll.*, 2007). Récemment, il s'est avéré que les CNTs provoquaient une diminution de la viabilité des macrophages humains *in vitro* en induisant une nécrose à leur contact à cause d'une phagocytose incomplète (Cheng *et coll.*, 2009) (Figure 30).

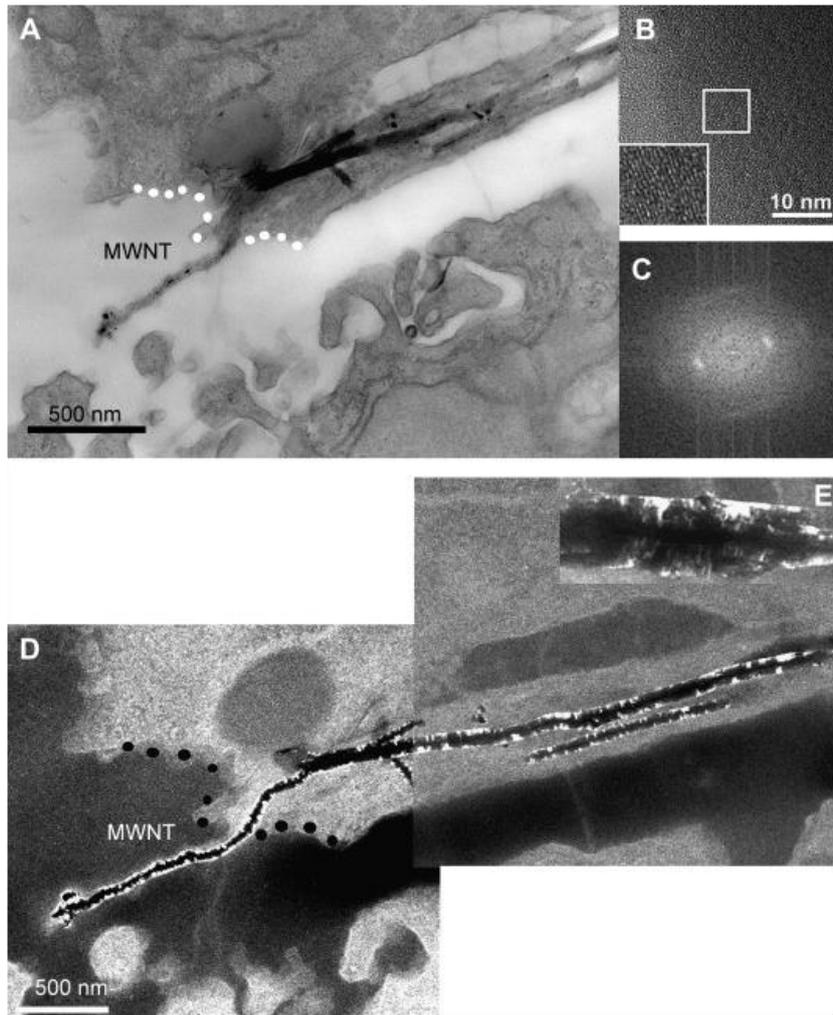


Figure 30 : CNT à l'intérieur d'un macrophage en microscopie électronique à transmission. A) Le CNT est inséré dans la cellule. Les points blancs délimitent la membrane plasmique. B) Maille cristalline du CNT intracellulaire confirmant que la structure cristallographique du CNT a été préservée dans la cellule. C) Transformée de Fourier dans la direction {001}. D) CNT pénétrant la membrane plasmique du macrophage délimitée par les points noirs. E) Agrandissement du CNT qui pénètre la membrane plasmique (Cheng *et coll.*, 2009).

Les nanotubes ont une structure qui imite la structure microfibrillaire du collagène. Après fonctionnalisation, les nanotubes dispersés dans l'eau se présentent sous forme de fibres, avec des dimensions comparables à celles des fibres de collagène. Une matrice composée de CNTs pourrait représenter un arrangement 3D comparable aux fibres de collagène déposées dans le woven bone.

Le but de notre étude a été de développer un nouveau biomatériau biomimétique qui aurait une structure similaire à celle du woven bone en initiant la minéralisation *in vitro* des nanotubes fonctionnalisés. Notre laboratoire a précédemment mis au point une technique de calcification *in vitro* du pHEMA qui consiste à les placer dans un liquide synthétique ayant les

mêmes concentrations ioniques que les liquides extracellulaires pour induire la formation de calcosphérites (Filmon *et coll.*, 2002).

Nous avons utilisé des nanotubes appelés « single walled carbon nanotubes » (SWCNT). Les SWCNT ont subi des traitements chimiques qui ont permis de les fonctionnaliser (Figure 31). La solution « piranha », composée d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène, est couramment utilisée en chimie pour purifier les CNTs des débris métalliques issus de leur fabrication. C'est une solution oxydante qui sert aussi à couper les CNTs. La solution d'acide nitrique (HNO_3) est une autre solution très oxydante qui est utilisée pour créer les fonctions –COOH sur les CNTs. Sans ces traitements, les SWCNT étant très hydrophobes, ils sont impossibles à disperser dans l'eau. La fonctionnalisation a été caractérisée par analyse XPS (X-ray Photoelectrons Spectroscopy). Lors d'une analyse XPS, l'échantillon est irradié par un faisceau de rayons X. Une mesure fournit la composition chimique d'un échantillon ainsi que la nature des liaisons chimiques du matériau dans les 10 premiers nanomètres sous la surface.

Les nanotubes traités ont ensuite été dispersés dans de l'eau ultra pure grâce à une sonde à ultrasons. 2 mL de ces solutions ont été placés dans du « body fluid » synthétique (BF) pendant 2 semaines. Après cette période, les échantillons ont été rincés et analysés par spectroscopies Raman et FTIR et la calcification a été observée par microscopie électronique à balayage et à transmission.

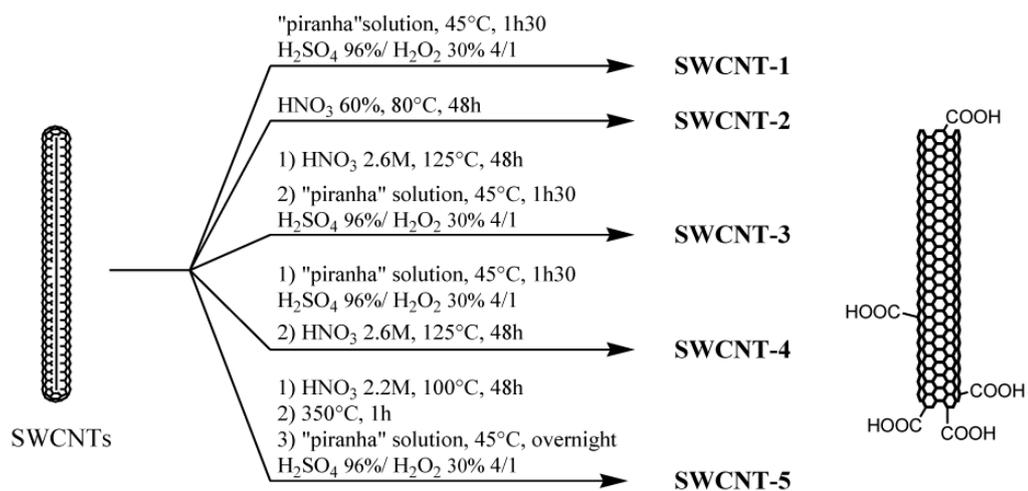


Figure 31 : Traitements chimiques des SWCNTs. Les échantillons 1 à 4 sont de type HiPco, l'échantillon 5 est de type Carbolex. Les nanotubes de type Carbolex sont moins purifiés que les HiPco et présentent plus d'impuretés.

Après 2 semaines dans le BF, on pouvait constater la formation d'amas au fond des tubes stériles dans lesquels ont été placés les nanotubes fonctionnalisés pour la calcification (Figure 32).

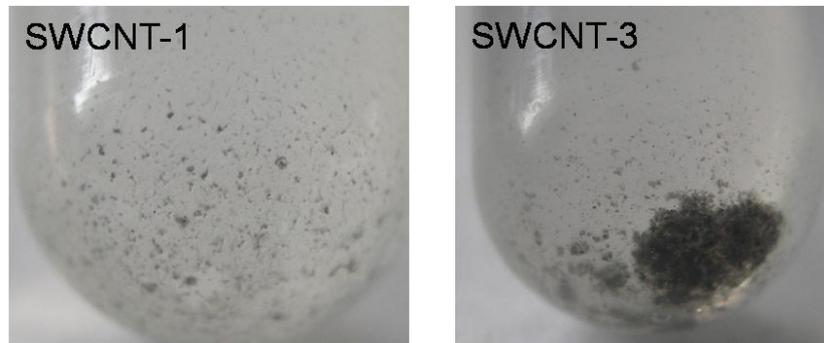


Figure 32: Précipitation des CNTs après 3 semaines de calcification dans le BF. On compare la précipitation de l'échantillon SWCNT-1 qui sert de témoin avec l'échantillon SWCNT-3.

Les images de microscopie électronique nous ont permis de voir les nanotubes enroulés autour de calcosphérites formées durant la période d'incubation (Figure 33). L'échantillon SWCNT-1 qui n'a pas induit de calcification car l'oxydation subie avec la solution « piranha » n'a pas permis la formation de fonctions $-COOH$ en quantité suffisante pour induire la calcification. Les échantillons SWCNT-2 à 5, qui possèdent des fonctions $-COOH$, ont permis la cristallisation des phosphates de calcium sous la forme de calcosphérites composés d'aiguilles d'HAP (Figure 33).

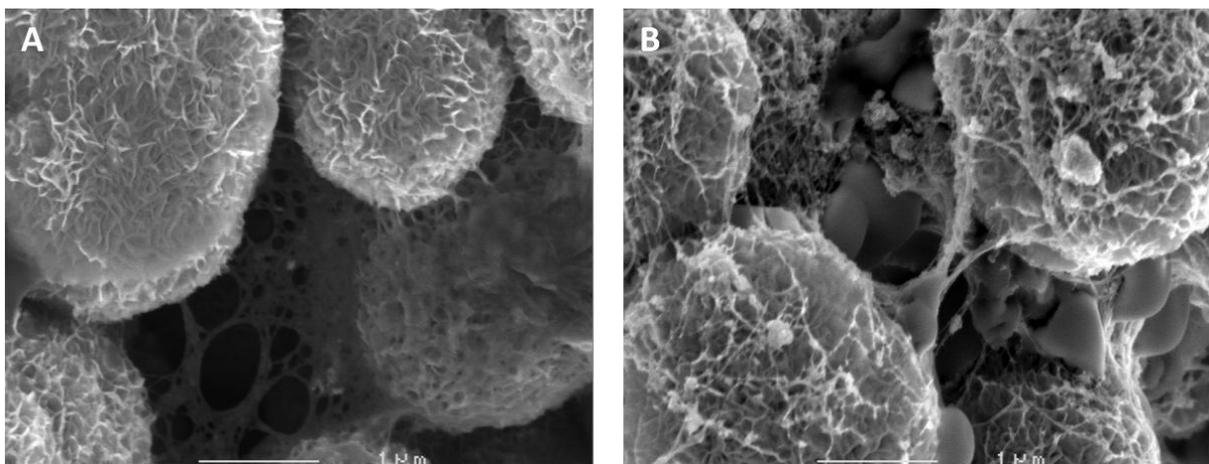


Figure 33 : Images MEB des nanotubes calcifiés. A) SWCNT-3, B) SWCNT-5. Les nanotubes porteurs de fonctions $-COOH$ ont permis la nucléation d'HAP et la formation de calcosphérites. B) l'échantillon SWCNT-5 a été réalisé à partir de nanotubes de type Carbolex. Les impuretés que l'on peut voir sont issues de la synthèse de ce type de nanotube.

Les analyses EDX ont indiqué la présence de Ca et P sur les échantillons SWCNT-2, 3, 4 et 5 mais pas sur SWCNT-1. Ce dernier spectre présentait du sodium et du chlore qui proviennent du BF et du silicium qui vient de la surface sur laquelle les échantillons ont été déposés pour les observations.

Les analyses spectroscopiques Raman (Figure 34) ont permis d'identifier la phase minérale formée sur les nanotubes. L'image A représente les spectres des échantillons avant calcification. Sur l'image B, qui représente les mêmes échantillons après incubation dans le BF, le pic du PO_4 apparaît pour les échantillons SWCNT-2, 3, 4 et 5 mais pas sur le spectre de SWCNT-1. Le pic le plus important à 1600 cm^{-1} est la bande G. Cette bande représente la vibration des nanotubes selon la longueur (Graupner, 2007). La seconde bande, observée entre 1300 et 1400 cm^{-1} est la bande D. Elle est caractéristique de défauts induits sur les nanotubes (Graupner, 2007). L'intensité de cette bande est très souvent étudiée pour caractériser la fonctionnalisation des CNTs (Dillon *et coll.*, 2005) (Simmons *et coll.*, 2006) (Strano *et coll.*, 2003). Le rapport des intensités de ces deux pics a donc été étudié, en plus des résultats d'XPS pour caractériser la fonctionnalisation. Les résultats de ces deux analyses sont en corrélation en ce qui concerne la fonctionnalisation des nanotubes (Tableau 2).

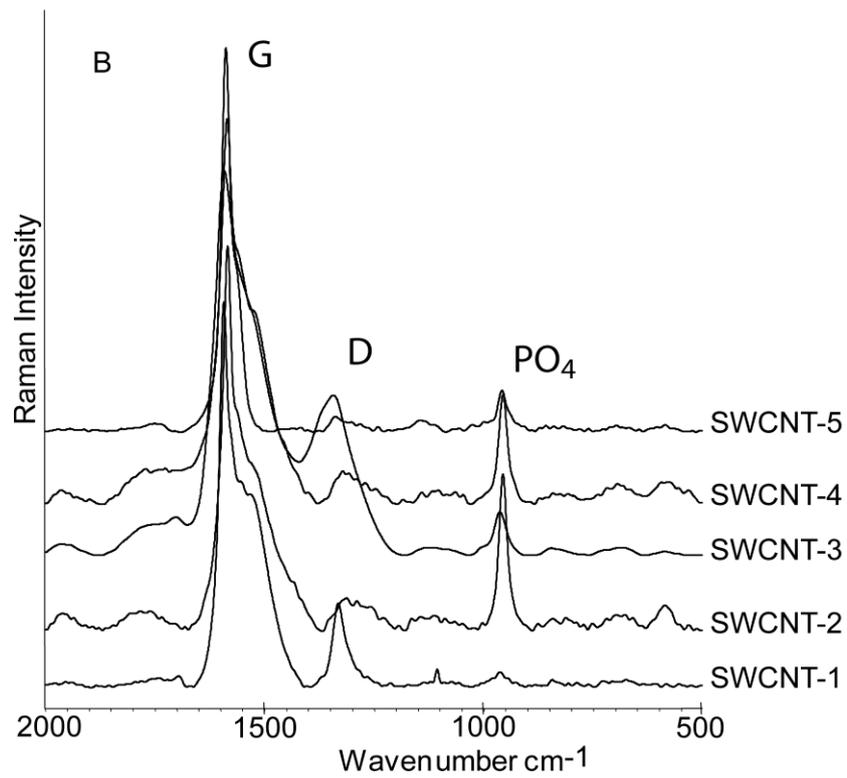
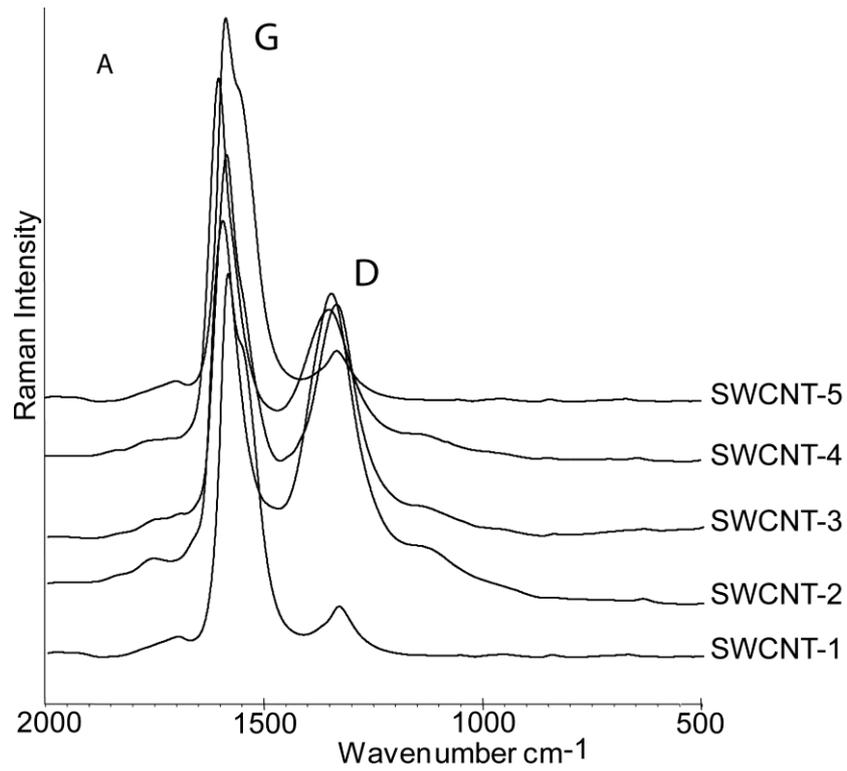


Figure 34 : Spectres Raman des échantillons A) avant et B) après la période d'incubation. Le pic du PO_4^{3-} apparaît sur les spectres des nanotubes incubés excepté sur SWCNT-1 qui n'a pas induit de calcification.

	SWCNT-1	SWCNT-2	SWCNT-3	SWCNT-4	SWCNT-5
O=C-OH (XPS)	4.82	10.51	8.14	6.93	4.84
Rapport D/G (Raman)	0.12	0.81	0.62	0.40	0.17

Tableau 2: Résultats des analyses XPS et Raman.

Sur les analyses de FTIR (Figure 35), la présence des pics du phosphate et du carbonate a apporté la confirmation de la formation d'HAP. L'échantillon SWCNT-1 n'a pas donné de spectre FTIR car rien ne s'était formé à sa surface.

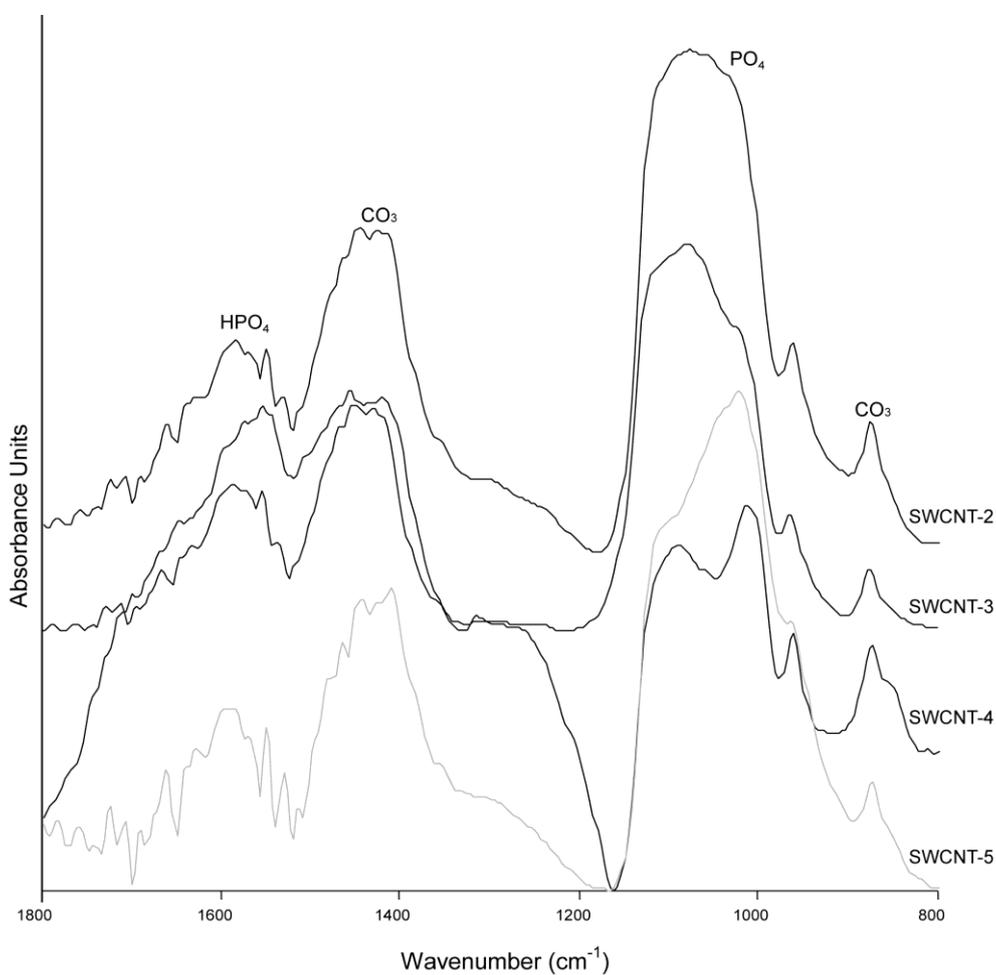


Figure 35 : Spectres FTIR des échantillons calcifiés après incubation.

L'étude montre que la formation de SWCNT carboxylés est dépendante de 2 facteurs principaux qui sont les conditions d'oxydation et la nature des nanotubes de départ. Les SWCNT dispersés dans un milieu aqueux restent entrelacés et ont une structure similaire aux fibres de collagène dans le woven bone. Nous avons décrit dans cette étude un nouveau modèle biomimétique de calcification *in vitro* acellulaire dans lequel des calcosphérites se développent à partir de nanotubes fonctionnalisés. La calcification a lieu sur les nanotubes qui se retrouvent entremêlés avec les calcosphérites. Ce procédé imite la calcification dans le woven bone humain dans lequel les calcosphérites se développent dans un réseau lâche de fibres collagéniques. Ce nouveau biomatériau devra être étudié *in vitro* au contact de cellules ostéoblastiques pour voir si ce système biomimétique peut favoriser la minéralisation et *in vivo* dans un modèle animal de défaut osseux pour tester son efficacité en tant que matériau de comblement osseux.

***In vitro* Calcification of Chemically Functionalized Carbon Nanotubes**

Johanne Beuvelot^a, Céline Bergeret^b, Romain Mallet^a, Vincent Fernandez,^d Jack Cousseau^b,
Michel.Félix Baslé^a, Daniel Chappard^{a*}

^a INSERM, U922 – LHEA, Faculté de Médecine, 49045 ANGERS Cedex -FRANCE.

^b CIMA Laboratory, UMR CNRS 6200, 49045 ANGERS Cedex – FRANCE.

^c Institut des Matériaux Jean Rouxel, UMR CNRS 6502, 44322, NANTES, FRANCE.

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.

Tel: (33) 241 73 58 64

INSERM, U922 – LHEA

Faculté de Médecine,

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

49045 ANGERS Cedex – France

Short running title: *In vitro* nanotubes calcification

Abstract

Bone is composed of two phases. The organic phase is made of collagen fibrils assembled in broad fibers acting as a template for mineralization. The mineral phase is formed of hydroxyapatite crystals (HAP) grown between and inside the collagen fibers. We have developed a biomimetic material using functionalized carbon nanotubes as scaffold to initiate *in vitro* mineralization. Biomimetic formation of HAP was performed on single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) which have been grafted with carboxylic groups. Two types of nanotubes, HiPco[®] and Carbon Solutions[®], were oxidized *via* various acidic processes, leading to five different groups of carboxylated nanotubes, fully characterized by physical methods (TGA, ATR-IR, and XPS analyses). All samples were dispersed in ultra-pure water and incubated for two weeks in a synthetic body fluid, in order to induce the calcification of the SWCNTs. SEM and EDX studies showed that Ca²⁺ and PO₄³⁻ ions were deposited as round-shaped nodules (calcospherites) on the carboxylated SWCNTs. FTIR and Raman spectroscopic studies confirmed the HAP formation, and image analysis made on SEM pictures showed that calcospherites and carboxylated SWCNTs were packed together. The size of calcospherites thus obtained *in vitro* from the HiPco[®] series was close to that issued from calcospherites observed *in vivo*. Functionalization of SWCNTs with carboxylic groups confers the capacity to induce calcification similar to woven bone.

Key words: Biomineralization, carbon nanotubes, hydroxyapatite, calcification.

Introduction

Bone is a connective tissue made of two phases: an organic and a mineral one. The organic phase, synthesized by osteoblasts, is made of 90% of type I collagen (Coll I) and non collagenous proteins. Coll I is synthesized in the form of broad fibers, made by an assembly of microfibrils. Microfibrils are composed of cross-linked collagen molecules which confer the elasticity to bone tissue (Landis, 1995; Abraham *et coll.*, 2008). The mineral phase is mainly composed of hydroxyapatite crystals ($\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$) (HAP). Two different mineralization processes exist in human: i) in fetal or rapidly forming bone (woven bone), matrix vesicles, produced and released by osteoblasts, have been shown to be the site of initial mineralization (Boskey *et coll.*, 1997; Hoshi et Ozawa, 2000). A first nucleus is formed within the vesicle and is used for secondary nucleation and crystal propagation. HAP crystals grow outside the vesicles to form mineralized nodules (calcospherites) (Anderson, 1989). ii) in adult bone, there is no visible matrix vesicle (excepted in the woven bone encountered in fracture callus or metaplastic proliferations). The mineralization process is initiated by non collagenous and acidic proteins. Both bone sialoprotein (BSP) and bone acid glycoprotein 75 (BAG-75) are localized on the mineralization front, suggesting that these proteins are necessary for the initiation of mineralization (Gordon *et coll.*, 2007; Midura *et coll.*, 2007). BSP is a phosphorylated acidic rich glycoprotein, containing several glutamic acid sites which allow to fix calcium ions in solution (Chen *et coll.*, 1994). HAP crystals formed are settled between and inside the collagen fibers and confer rigidity to bone tissue (Dorozhkin et Epple, 2002). The difference between adult and rapidly forming bone is at the texture level: in adult bone, collagen fibers are disposed in parallel lamellae packed together to form basic structure

units whereas in woven bone, collagen fibers are randomly distributed (Olszta *et coll.*, 2007).

Recently, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) have been proposed as a new class of materials usable in biomedicine, thanks to their interesting mechanical, physical and chemical properties and to their biocompatibility (Ajayan *et coll.*, 1999; Yu *et coll.*, 2000; Dumortier *et coll.*, 2006; Zanello *et coll.*, 2006). SWCNTs are recognized to appear among the strongest existing materials and their use for implantation may improve the mechanical properties of damaged bone (Yu *et coll.*, 2000; Zanello *et coll.*, 2006). On a chemical point of view, SWCNTs can be used to form chemical attachments at their walls or ends able to induce interactions with other molecules (Sinnott, 2002). Moreover, nanotubes mimic collagen due to their microfibrillar structure, as revealed by electron microscopy. Thus SWCNT templates could represent suitable 3D arrangements similar to the randomly distributed collagen fibrils in woven bone making them a suitable scaffold allowing the growth of a mineral phase. From all these properties, SWCNTs appear to be privileged candidates for inducing calcification, provided they are conveniently dispersed in aqueous medium.

The aim of this study was to functionalize SWCNTs with carboxylic acid groups (previously known to initiate mineralization on polymers) (Filmon *et coll.*, 2002; Song *et coll.*, 2003; Song *et coll.*, 2005) as a biomimetic material to support the growth of a mineral phase. In this work, various carboxylated SWCNTs were prepared *via* acid oxidizing conditions and characterized by TGA, ATR-IR and XPS. They were incubated *in vitro* in a synthetic body fluid known to favor the calcification process. The resulting HAP mineralized carbon nanotubes were unambiguously characterized by spectroscopic (FTIR, Raman) and microscopic (SEM, EDX) studies.

Materials and Methods

Two types of nanotubes were used in the present study. The HiPco[®] SWCNTs were purchased from Unidym, Inc. Menlo Park, CA (lots R0539 and R0546). The Carbon Solutions[®] SWCNTs were purchased from Carbon Solutions, Inc. Riverside, CA (lot AP-225). Aqueous nitric acid 68-70%, hydrogen peroxide 100 volumes (> 30% w/v) (Acros Organics, Halluin, France), and sulfuric acid 95% (Fisher Scientific, Paris, France) were used as received. Aqueous nitric acid (2.2 M, 2.6 M or 60% depending on reaction conditions) was used to purify pristine SWCNTs and to generate –COOH functions on SWCNTs (Liu *et coll.*, 1998; Rinzler *et coll.*, 1998; Hwang *et coll.*, 2006), and a "piranha" solution made of sulfuric acid/hydrogen peroxide mixture was used to cut and further oxidize the SWCNTs (Ziegler *et coll.*, 2005).

Preparation of carboxylated SWCNTs (Figure 1)

HiPco[®] SWCNTs. SWCNT-1 nanotubes: pristine SWCNTs (95 mg) were added to a freshly prepared "piranha" solution (H₂SO₄ 96% /H₂O₂ 30% 4/1 v/v) previously cooled between 30-35 °C in an ice bath (95 mL). The resulting mixture was heated at 45 °C under vigorous stirring for 90 min. The reaction medium was then transferred into an Erlenmeyer flask containing 100 g ice. After cooling for 10 minutes, the mixture was filtered through a 0.22 μm polyvinylidene fluoride Millipore membrane (PVDF). The remaining black solid was washed with deionised water up to pH 7, then dried overnight under vacuum at 60 °C giving the oxidized and cut SWCNT-1 nanotubes (83 mg).

SWCNT-2 nanotubes: pristine SWCNTs (110 mg) were oxidized by stirring at 80 °C for 24 hours in aqueous nitric acid 60% (110 mL). The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered through a PVDF membrane. The remaining black solid was washed with deionised water up to pH 7 and dried for 2 days under vacuum at 60 °C giving the oxidized SWCNT-2 nanotubes (77 mg).

SWCNT-3 nanotubes: pristine SWCNTs (250 mg) were stirred at 125 °C for 48 hours in *aq.* nitric acid 2.6 M (250 mL). The reaction mixture was cooled to room temperature, and then filtered through a PVDF membrane. The remaining black solid was washed with deionised water up to pH 7, then with 5 mL 0.001 M NaOH solution to remove carboxylated carbeneous fragments (Shao *et coll.*, 2007), and finally with deionised water up to neutrality. Then the solid was dried at 60 °C under vacuum for 2 days, thus leading to purified SWCNTs (170 mg). In a second step, purified SWCNTs (170 mg) were cut and further oxidized by adding a freshly prepared "piranha" solution previously cooled between 30-35 °C in an ice bath (170 mL). The resulting mixture was heated at 45 °C under vigorous stirring for 90 minutes, then transferred into an Erlenmeyer flask containing 175 g ice. After cooling for 10 min, the reaction medium was filtered through a PVDF membrane, then the remaining black solid was washed with deionised water up to pH 7. The solid was dried overnight under vacuum at 60 °C giving oxidized and cut SWCNT-3 nanotubes (140 mg).

SWCNT-4 nanotubes: SWCNT-1 nanotubes (72 mg) were stirred at 125 °C for 48 hours in aqueous nitric acid 2.6 M (72 mL). The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered through a PVDF membrane. The remaining black solid was washed with deionised water up to pH 7. The solid was dried for 2 days under vacuum at 60 °C giving cut and oxidized SWCNT-4 nanotubes (51 mg).

Carbon Solutions[®] SWCNTs. SWCNT-5 nanotubes: Pristine SWCNTs (350 mg) were stirred at 100 °C for 48 hours in *aq.* nitric acid 2.2 M (53 mL). The reaction mixture was cooled to room temperature. The resulting suspension was centrifuged (1400 g) for 2x15 min and most of the supernatant acid *aq.* phase was discarded, leaving a more concentrated suspension which was filtered through a PVDF membrane. The obtained black solid was washed with deionised water up to neutrality, dried at 110 °C for 2 days and heated at 350 °C for 1 hour, thus leading to purified SWCNTs (225 mg). In a second step, purified nanotubes (180 mg) were added to a freshly prepared "piranha" solution previously cooled between 30-35 °C in an ice bath (180 mL). The resulting mixture was heated overnight at 45 °C under vigorous stirring. The reaction medium was then transferred into an Erlenmeyer flask containing 130 g ice. After cooling for 10 min, the mixture was filtered through a PVDF membrane and washed with deionised water up to pH 7. The remaining black solid was dried overnight under vacuum at room temperature giving oxidized and cut nanotubes from *Carbon Solutions*[®] SWCNT-5 (145 mg).

For each type of oxidized SWCNT, 2 mg were dispersed in 100 mL of ultra pure water using a sonicator for 2 hours and kept at 4 °C until use.

Thermo-gravimetric analyses (TGA)

TGA was used to determine changes in weight in relation to change in temperature. TGA analyses were performed with a TGAQ 500 instrument from TA Instruments (New Castle, Delaware, USA) under a nitrogen flow (60 mL min⁻¹).

X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

XPS was used to quantify the elemental composition of the SWCNTs. The XPS measurements were obtained with a Kratos Axis Ultra (Kratos Analytical/ Shimadzu Group, Manchester, UK) spectrometer using the monochromatic Al KR X-ray source (1486.6 eV) at 150 W. Samples were deposited on the sample holder by a conductive double-sided tape. A pass-energy of 20 eV was used for the core level measurements. The instrumental resolution was 0.47 eV.

Calcification of SWCNTs in synthetic body fluid

A standard synthetic body fluid (BF) mimicking the extracellular fluids was prepared according to Yamada and al. (Yamada *et coll.*, 1994) Its composition was as follows: Na⁺: 171.25 mM; Ca²⁺: 3.11 mM; Mg²⁺: 1.87 mM; HCO₃: 5.25 mM; Cl⁻: 172.5 mM; HPO₄: 1.12 mM; SO₄: 0.62 mM; K⁺: 4.85 mM. One mL of each type of dispersed nanotubes was dropped in sterile polypropylene tubes with 3 mL of BF. BF was changed every 2 days. Tubes were placed at 37 °C for 2 weeks.

Scanning and Transmission Electron Microscopic observations (SEM and TEM)

After 2 weeks of incubation, each tube was centrifuged for 15 min at 2000 rpm. The supernatant was removed and nanotubes were rinsed with 3 mL of ultra pure water. The procedure was repeated 3 times. SWCNTs were concentrated in 0.5 mL of deionised water and 5 µL of this solution were disposed on cleaned silicon wafer. SEM observations were performed on a JEOL 6301F (JEOL, Tokyo, Japan) field emission microscope with an accelerating 10 kV voltage at a distance of 15 mm, equipped with an energy dispersive X-ray micro-analysis machine (EDX; Link ISIS, Oxford Instruments, Oxford, UK). Ten pictures per

samples were taken at a magnification of 4000x without tilt. The size of calcospherites developed on nanotubes was measured by image analysis on 20 calcospherites per image. The frequency histogram of calcospherite size was computed for each sample.

For TEM analysis, SWCNTs were rinsed and transferred onto copper grids (mesh 200) coated with a film of collodion; no contrast agent was used. TEM studies were done on a JEOL 100 CX at 80 kV.

Fourier Transformed Infrared analysis (FTIR)

Infra-Red spectra of SWCNTs before incubation in the BF were recorded on a Bruker interferometer model Vertex 70 (Bruker Optiks GmbH, Ettlingen, Germany) with attenuated total reflectance (ATR-IR) Diamond simple reflexion equipment. After 2 weeks in BF, rinsed SWCNTs were placed on a barium window and dried in an oven at 37 °C overnight. Five areas were analyzed on each sample using a Bruker Hyperion 3000 microscope (Bruker Optiks) equipped with a standard single element Mercury Cadmium Telluride (MCT) detector. FTIR spectra were recorded in the range of 950–4000 cm^{-1} at 32 scans per spectrum at 8 cm^{-1} resolution in the reflexion mode. A background spectrum was collected, containing data from the environment, the instrument and the optical discs.

Raman microspectroscopy

Raman analysis was performed on a Senterra microscope with the OPUS 5.5 software (Bruker Optik). The excitation laser wavelength was 562 nm. The long working distance of the 20x microscope objective gave a spot size in the order of 2 μm . SWCNTs were observed before and after 2 weeks in BF; five areas were analyzed on each sample.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Systat 11 statistical software (Systat Software, Inc., San Jose, CA). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). The frequency distribution of calcospherite size for each sample was assessed; if the distribution was lognormal, data were converted to logarithmic values and differences between SWCNT groups were analyzed by ANOVA with Fisher's Least Significant difference post-hoc test. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

Results

TGA

A first evaluation of the oxidized carbon nanotubes was done by TGA in a nitrogen atmosphere ($\Delta T = 10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). The results associated to the progressive decomposition of these nanotubes can be classified in two series. In the first one, including the SWCNT-2, -3, -4 and -5 nanotubes, the corresponding diagrams (Figure 2A) exhibited, in the 150-400°C temperature range, a steeper profile, which can be associated to the following mass losses, respectively 20% (160-415°C), 15% (150-360°C), 12% (160-335°C) and 7% (140-340°C). These mass losses are likely to be ascribed to a CO₂ release from the carboxylic sites, as already observed in other works (Figueiredo *et coll.*, 1999). In the second series (Figure 2B), no strong profile variation was observed in the diagram provided by the SWCNT-1 sample in the 150-400°C temperature range, and the specific mass loss due to a CO₂ release was not easily distinguished in this case, probably because of a weaker corresponding loss.

ATR-IR

Solid state ATR-IR spectra have been performed on the carbon nanotubes involved in the overall oxidative treatment which leads to oxidized SWCNT-3 samples from pristine ones. These spectra are shown in Figure 3. As expected, the pristine sample (spectrum a) does not show any absorption band between 800 and 2000 cm^{-1} . On the contrary, two bands were clearly detected at 1576 cm^{-1} and 1739 cm^{-1} in spectra b and c (these spectra being issued from samples isolated after the two oxidation steps using successively nitric acid -spectrum b- then a "piranha" solution -spectrum c). The band at 1576 cm^{-1} was assigned to the activated C=C stretching mode (Mawhinney *et coll.*, 2000; Hamon *et coll.*, 2002; Qin *et coll.*, 2003; Kobashi *et coll.*, 2007) while the band at 1739 cm^{-1} was due to the presence of C=O bonds from the carboxylic acid groups (Liu *et coll.*, 2007).

XPS

Several oxygenated groups, such as C-O in ethers, C=O in carbonyl derivatives and O=C-O in carboxylic acids, are likely to be produced by the oxidation processes. In order to evaluate the contributions of these groups, a curve fitting was carried out from the high resolution C1s spectra. In each spectrum, the main peak at 284.5 eV was assigned to the sp^2 carbons of the nanotubes. After deconvolution, the other components of the fitting was assigned to C1s peaks issued from the following groups: i) the C-O bonding at 286.2 eV, ii) the C=O bonding at 287.5 eV and iii) the O=C-O group at 288.7 eV (Bergeret *et coll.*, 2008) (Hiura *et coll.*, 1995). As examples, the C1s spectra issued from the SWCNT-1 and SWCNT-2 samples are shown in Figure 4. Table 1 lists the relative proportions (%) of functional groups assigned to the fit components associated with the corresponding SWCNT-1 to -5 samples. From these results, we clearly observed that the SWCNT-2, -3 and -4 samples possess the highest –

COOH contents, while the carboxylation content of SWCNT-1 and -5 samples appeared to be much weaker.

Raman

Raman spectra of SWCNTs analyzed before and after incubation in BF are shown in Figure 6. The Raman spectra of SWCNTs were run in the 500-2000 cm^{-1} range (Figure 5A), using $e_{\text{exc}} = 562$ nm. The most intense band, the G-band, was observed at 1600 cm^{-1} , associated to the tangential vibration mode. The intensity of the D band at ~ 1300 cm^{-1} appeared to be consistent with the formation of carboxylic groups: the most intense D band was observed from the SWCNT-2 sample which is the most carboxylated, while the least carboxylated SWCNT-1 sample was characterized by a very weak D band. G and D-bands were also observed on spectra of all SWCNTs after the incubation period (Figure 5B). PO_4^{3-} peak indicating mineralized deposits was observed at 950 cm^{-1} on spectra of SWCNT-2, -3, -4 and -5, but not on the spectrum of SWCNT-1.

FTIR analysis

After incubation in BF, heaps of nanotubes tended to precipitate in the test tubes containing SWCNT-2 to -5. After drying, a white material was collected. The SWCNT-1 sample provided no clear absorption in the 800-1800 cm^{-1} range, whereas the SWCNT-2 to -5 samples gave rise to the IR spectra which are shown in Figure 6. The most noticeable feature in these spectra concerns the presence of a strong absorption band at 1000-1100 cm^{-1} characteristic of the PO_4^{3-} group (Slosarczyk *et coll.*, 2005). All spectra from calcified

SWCNTs (SWCNT-2, -3, -4 and -5) showed peaks at 1470 and 880 cm^{-1} , corresponding to stretching vibrations of CO_3^{2-} .

Raman analysis

Likewise, in Raman spectra, a single PO_4^{3-} peak indicating mineral deposits was also observed at 950 cm^{-1} on spectra of SWCNT-2, -3, -4 and -5 samples, but not on the spectrum of SWCNT-1 (Figure 5B).

SEM observations and EDX

SEM evidenced mineralized nodules by on all samples except on SWCNT-1 (Figure 7 images A, B, C, D and E). Mineralized nodules had a rounded shape (calcospherites) and were made of elementary tablets or plates of hydroxyapatite packed together. SWCNTs were interlaced with the calcospherites and progressively became entrapped within them. From EDX spectra, Ca and P were localized on SWCNT-2, -3, -4 and -5 samples but not on SWCNT-1 (Figure 6H and I). The EDX spectrum of SWCNT-1 shows peaks of carbon and silicon coming from the wafer, and peaks of Na and Cl coming from the remaining BF. The sizes of the calcospherites exhibited a typical lognormal distribution for the four different chemical treatments performed on SWCNTs. Calcospherite's size differed statistically between the four groups (Table 2). The smaller calcospherites were observed on SWCNT-5 which contained the lowest amount of carboxylic groups.

Discussion

The design of biomimetic bone tissue engineering materials could restore and improve damaged bone. The objective of the study was the generation of functionalized nanotubes to induce the calcification *in vitro*. Nanotubes mimic collagen due to their microfibrillar structure, as revealed by electron microscopy. Thus the nanotubes scaffolds represent suitable 3D arrangements similar to the randomly distributed collagen fibrils in woven bone (Li *et coll.*, 2005; Edwards *et coll.*, 2009). Carbon nanotubes appear to be privileged candidates for inducing the mineralization of HA.

Several oxidation processes have been used towards SWCNTs issued from HiPco[®] and Carbon Solutions[®] series, leading respectively to SWCNT -1 to -5 samples as depicted in Figure 1. Aqueous nitric acid 2.2 M, 2.6 M or 60% (depending on reaction conditions) was used to purify and oxidize pristine SWCNTS (Liu *et coll.*, 1998; Rinzler *et coll.*, 1998; Hwang *et coll.*, 2006), while the “piranha” solution is also able to cut the nanotubes, both of these processes generating –COOH groups on the nanotubes (Ziegler *et coll.*, 2005).

In the HiPco[®] series, the processes have been chosen in order to generate different –COOH contents in the corresponding SWCNT-1 to -4 samples, and to check later the influence of these contents on the degree of mineralization of these samples with HAP. The SWCNT-5 Carbon Solutions[®] sample was obtained through an oxidation process similar to that leading to the SWCNT-3 oxidized HiPco[®] nanotubes, in order to compare the compositions of these two oxidized samples, then their reactivity towards the body fluid. To assess the nanotubes Functionalization, XPS and Raman spectroscopy have been processed. XPS is a very fruitful technique, well adapted to the study of surfaces (Ghosh *et coll.*). In this work this technique has been used to probe the surface chemical structure of the SWCNT-1 to -5 samples obtained after the different oxidation processes. This measurement complements the characterization of

the samples, following the previous results obtained from TGA analyses and FTIR spectra. Despite the intrinsic uncertainty of the curve fitting, these latter results are fully consistent with the CO₂ mass losses estimated from the TGA diagrams, and also allow evaluating the -COOH contents associated to the SWCNT-1 sample which could not be satisfactorily estimated from TGA. Raman spectroscopy was previously used to assess the carboxylation of carbon nanotubes (Bergeret *et coll.*, 2008). The D band is characteristic of the functionalization rate and was ascribed to the formation of hydrogen-bonded structures from -COOH groups, thus reinforcing the interconnection between the SWCNT bundles and contributing to the D-band intensity. Moreover, the D/G ratio of peak intensity confirmed the XPS results (values from SWCNT-1 to 5 were respectively 0.12, 0.81, 0.62, 0.40, and 0.17). Previously, SWCNTs functionalized with water soluble ester or amide groups were found to be mineralized by HAP, through the use of an aqueous solution containing CaCl₂ and Na₂HPO₄. However, this work also showed that calcification was very weak from SWCNTs functionalized by -COOH groups (Zhao *et coll.*, 2005). More recently, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) have been reported to be involved in the formation of crystalline HAP in different experimental processes, using carboxylated MWCNTs (Aryal *et coll.*, 2006; Tasis *et coll.*, 2006; Li et Gao, 2007), bamboo-like MWCNTs (Liao *et coll.*, 2007), or MWCNT/chitosan-based scaffolds (Hortigüela *et coll.*, 2008). *In vivo*, calcification of bone is induced by -COOH rich proteins such as the glutamic regions of BSP. *In vitro*, biomimetism consists in initiating HAP growth on biomaterial surfaces (Barrère *et coll.*, 1999). A procedure previously developed in our laboratory consisted in initiating the calcospherite growth on poly (2-hydroxyethyl) methacrylate (pHEMA) with immobilized alkaline phosphatase (Filmon *et coll.*, 1996). We also reported that carboxymetylation (which allows the graft of -COOH groups on the pHEMA surface) initiates HAP nucleation and calcospherite deposition (Filmon *et coll.*, 2002). Carboxylic groups can attract Ca²⁺ cations and initiate calcium-phosphate precipitation

and reproduce the effect of biological molecules such as BSP. This *in vitro* model has been extensively used to characterize the effect of pharmacological drugs, metallic ions or proteins that can interfere with bone calcification (Filmon *et coll.*, 2000; Guggenbuhl *et coll.*, 2008; Libouban *et coll.*, 2009; Mabileau *et coll.*, 2009). Others studies have used functionalized pHEMA hydrogels or copolymers to induce an *in vitro* HAP deposition (Song *et coll.*, 2003; Song *et coll.*, 2005). They employed thermodecomposition of urea to modulate the pH and generate an anionic surface to initiate HAP nucleation. This model allowed to design a synthetic bonelike composite made of HAP layer with with a structure and thickness ideal for bone implant applications (Song *et coll.*, 2003; Song *et coll.*, 2005).

In the woven bone, collagen fibrils do not lie parallel to one another but are interweaving and dispersed (Martino *et coll.*, 1979; Su *et coll.*, 2003). Interweaved and dispersed SWCNTs appear comparable to the collagen fibrils organization in woven bone. In ours study, the presence of PO_4^{3-} and CO_3^{2-} functional groups is characteristics of natural and synthetic apatites (Antonakos *et coll.*, 2007; O'Donnell *et coll.*, 2008). However, biocompatibility of carbon nanotubes is very controversial. MWCNTs have been proved to induce necrosis of human macrophages incomplete phagocytosis and insertion into the nucleus (Cheng *et coll.*, 2009). Carbon nanotubes are shown to be invariably cytotoxic when they are used as suspension in a cellular culture, although they appear well tolerated when they are used to reinforce or to modify a surface (Davoren *et coll.*, 2007; Verdejo *et coll.*, 2009).

This work clearly shows that the formation of carboxylated single walled carbon nanotubes is strongly dependent on two main factors, the experimental conditions used in the oxidation processes and the nature of the starting carbon nanotubes. The characterization of the obtained carboxylation was unambiguously performed by the use of joined physical methods (TGA, IR

and XPS), among which XPS plays a key role for the quantitative evaluation of the generated –COOH groups. Furthermore, the present study reports a new acellular *in vitro* model in which calcospherites develop on carboxylated SWCNTs. Calcification proceeds and entraps into the nanotubes networks. This process mimics the development of calcification in the human woven bone where calcospherites develop in a loose network of collagen fibers. Further *in vitro* studies will be necessary to test this biomimetic material with osteoblast cells and to see if this biomimetic system may improve the formation of bone nodules.

Acknowledgments

This work was made possible by grants from Contrat Régional “Pays de la Loire” Bioregos2 program and INSERM. TEM and SEM analyses were done at SCIAM (service commun d'imagerie et analyse microscopiques - Université d'Angers).

References

- [1] Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 1995;16:533-44.
- [2] Abraham LC, Zuena E, Perez-Ramirez B, Kaplan DL. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87:264-85.
- [3] Boskey AL, Boyan BD, Schwartz Z. Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int* 1997;60:309-15.
- [4] Hoshi K, Ozawa H. Matrix vesicle calcification in bones of adult rats. *Calcif Tissue Int* 2000;66:430-4.
- [5] Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989;60:320-30.
- [6] Midura RJ, VasANJI A, Su X, Wang A, Midura SB, Gorski JP. Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen. *Bone* 2007;41:1005-16.
- [7] Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007;41:462-73.
- [8] Chen J, McKee MD, Nanci A, Sodek J. Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin. *Histochem J* 1994;26:67-78.
- [9] Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002;41:3130-46.
- [10] Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mat Sci Eng R* 2007;58:77-116.
- [11] Yu MF, Files BS, Arepalli S, Ruoff RS. Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties. *Phys Rev Lett* 2000;84:5552-5.
- [12] Ajayan PM, Charlier J, Rinzler AG. Carbon nanotubes: from macromolecules to nanotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14199-200.
- [13] Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett* 2006;6:562-7.
- [14] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett* 2006;6:1522-8.
- [15] Sinnott SB. Chemical functionalization of carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol* 2002;2:113-23.

- [16] Filmon R, Grizon F, Baslé MF, Chappard D. Effects of negatively charged groups (carboxymethyl) on the calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *Biomaterials* 2002;23:3053-9.
- [17] Song J, Malathong V, Bertozzi CR. Mineralization of synthetic polymer scaffolds: a bottom-up approach for the development of artificial bone. *J Am Chem Soc* 2005;127:3366-72.
- [18] Song J, Saiz E, Bertozzi CR. A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: an efficient process toward 3-dimensional bonelike composites. *J Am Chem Soc* 2003;125:1236-43.
- [19] Liu J, Rinzler AG, Dai H, Hafner JH, Bradley RK, Boul PJ, et al. Fullerene pipes. *Science* 1998;280:1253-6.
- [20] Rinzler AG, Liu J, Dai H, Nikolaev P, Huffman CB, Rodriguez-Macías FJ, et al. Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: Process, product, and characterization. *App Phy A* 1998;67:29-37.
- [21] Hwang SH, Moorefield CN, Dai L, Newkome GR. Functional nanohybrids constructed via complexation of multiwalled carbon nanotubes with novel hexameric metallomacrocyles. *Chem Mater* 2006;18:4019-24.
- [22] Ziegler KJ, Gu Z, Peng H, Flor EL, Hauge RH, Smalley RE. Controlled oxidative cutting of single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2005;127:1541-7.
- [23] Shao L, Tobias G, Salzmann CG, Ballesteros B, Hong SY, Crossley A, et al. Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalisation of single-walled carbon nanotubes. *Chem Commun* 2007;5090-2.
- [24] Yamada S, Nakamura T, Kokubo T, Oka M, Yamamuro T. Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic by a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res - Part A* 1994;28:1357-63.
- [25] Figueiredo JL, Pereira MFR, Freitas MMA, Orfao JJM. Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* 1999;37:1379-89.
- [26] Hamon MA, Hui H, Bhowmik P, Itkis HME, Haddon RC. Ester-functionalized soluble single-walled carbon nanotubes. *App Phys A: Mater Sci Process* 2002;74:333-8.
- [27] Kobashi K, Chen Z, Lomeda J, Rauwald U, Hwang WF, Tour JM. Copolymer of single-walled carbon nanotubes and poly(p-phenylene benzobisoxazole). *Chem Mater* 2007;19:291-300.
- [28] Mawhinney DB, Naumenko V, Kuznetsova A, Yates Jr JT, Liu J, Smalley RE. Infrared spectral evidence for the etching of carbon nanotubes: Ozone oxidation at 298 K [7]. *J Am Chem Soc* 2000;122:2383-4.
- [29] Qin Y, Shi J, Wu W, Li X, Guo ZX, Zhu D. Concise Route to Functionalized Carbon Nanotubes. *J Phy Chem B* 2003;107:12899-901.
- [30] Liu M, Yang Y, Zhu T, Liu Z. A general approach to chemical modification of single-walled carbon nanotubes with peroxy organic acids and its application in polymer grafting. *J Phys Chem C* 2007;111:2379-85.

- [31] Bergeret C, Cousseau J, Fernandez V, Mevellec JY, Lefrant S. Spectroscopic evidence of carbon nanotubes' metallic character loss induced by covalent functionalization via nitric acid purification. *J Phys Chem C* 2008;112:16411-6.
- [32] Hiura H, Ebbesen TW, Tanigaki K. Opening and purification of carbon nanotubes in high yields. *Adv Mater* 1995;7:275-6.
- [33] Slosarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiewicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J Mol Struct* 2005;744-747:657-61.
- [34] Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005;26:599-609.
- [35] Edwards SL, Church JS, Werkmeister JA, Ramshaw JA. Tubular micro-scale multiwalled carbon nanotube-based scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:1725-31.
- [36] Ghosh K, Kumar M, Maruyama T, Ando Y. Tailoring the field emission property of nitrogen-doped carbon nanotubes by controlling the graphitic/pyridinic substitution. *Carbon* 2010;48:191-200.
- [37] Zhao B, Hu H, Mandal SK, Haddon RC. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chem Mater* 2005;17:3235-41.
- [38] Li W, Gao C. Efficiently stabilized spherical vaterite CaCO₃ crystals by carbon nanotubes in biomimetic mineralization. *Langmuir* 2007;23:4575-82.
- [39] Aryal S, Bhattarai SR, K.C RB, Khil MS, Lee DR, Kim HY. Carbon nanotubes assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite from simulated body fluid. *Mater Sci Eng A* 2006;426:202-7.
- [40] Tasis D, Kastanis D, Galiotis C, Bouropoulos N. Growth of calcium phosphate mineral on carbon nanotube buckypapers. *Phys Stat Solidi (B)* 2006;243:3230-3.
- [41] Liao S, Xu G, Wang W, Watari F, Cui F, Ramakrishna S, et al. Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes. *Acta Biomater* 2007;3:669-75.
- [42] Hortigüela MJ, Gutiérrez MC, Aranaz I, Jobbagy M, Abarrategi A, Moreno-Vicente C, et al. Urea assisted hydroxyapatite mineralization on MWCNT/CHI scaffolds. *J Mater Chem* 2008;18:5933-40.
- [43] Barrère F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg²⁺ and HCO₃. *Bone* 1999;25:107S-11S.
- [44] Filmon R, Chappard D, Monthéard JP, Baslé MF. A composite biomaterial: Poly 2(hydroxyethyl) methacrylate / alkaline phosphatase initiates mineralization in vitro. *Cell Mater* 1996;6:11-20.

- [45] Mabileau G, Filmon R, Petrov PK, Baslé MF, Sabokbar A, Chappard D. Cobalt, chromium and nickel affect hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Acta Biomater* 2009;DOI 10.1016/j.actbio.2009.10.035:
- [46] Filmon R, Baslé MF, Barbier A, Chappard D. Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: a composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:849-68.
- [47] Guggenbuhl P, Filmon R, Mabileau G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;57:903-10.
- [48] Libouban H, Filmon R, Mauréac A, Baslé MF, Chappard D. Fetuin and osteocalcin interact with calcospherite formation during the calcification process of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in vitro: A Raman microspectroscopic monitoring. *J Raman Spectrosc* 2009;40:1234-9.
- [49] Martino LJ, Yeager VL, Taylor JJ. An ultrastructural study of the role of calcification nodules in the mineralization of woven bone. *Calcif Tissue Int* 1979;27:59-64.
- [50] Su X, Sun K, Cui FZ, Landis WJ. Organization of apatite crystals in human woven bone. *Bone* 2003;32:150-62.
- [51] Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 2007;28:3043-54.
- [52] O'Donnell MD, Fredholm Y, de Rouffignac A, Hill RG. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomater* 2008;4:1455-64.
- [53] Cheng C, Muller KH, Koziol KK, Skepper JN, Midgley PA, Welland ME, et al. Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials* 2009;30:4152-60.
- [54] Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottineau B, Chambers G, Byrne HJ, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21:438-48.
- [55] Verdejo R, Jell G, Safinia L, Bismarck A, Stevens MM, Shaffer MS. Reactive polyurethane carbon nanotube foams and their interactions with osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:65-73.

Legends of Figures

Figure 1: Synthesis pathways of oxidized **SWCNT-1** to **-5** carbon nanotubes.

Figure 2: Mass loss profiles from TGA of: A) **SWCNT-2** to **-5** and B) **SWCNT-1** samples.

Figure 3: ATR-IR spectra of Hipco[®] nanotubes: a) pristine SWCNTs; b) SWCNTs purified by 2.6M aq. nitric acid ; c) **SWCNT-3** sample. The band at 1739 cm^{-1} and 1576 cm^{-1} in spectra b) and c) are respectively assigned to the presence of C=O bonds from the carboxylic acid groups and C=C stretching mode.

Figure 4: XPS C1s experimental curve and fitted components of (a) **SWCNT-1** and (b) **SWCNT-2** samples.

Figure 5: Raman spectra obtained from **SWCNT-1** to **-5** samples: A) before, and B) after the mineralization period. Note the appearance of the peak at 950 cm^{-1} corresponding to the $\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$ of HAP.

Figure 6: Infra-red spectra of mineralized **SWCNT-2** to **-5** samples after incubation in body fluid. The spectrum from **SWCNT-1** is not figured since only noise is visible due to the complete absence of calcification.

Figure 7: SEM images after two weeks in BF: A) **SWCNT-1**, B) **SWCNT-2**, C) **SWCNT-3**, D) **SWCNT-4**, and E) **SWCNT-5** samples. TEM images of **SWCNT-3** F) before, and G) after the mineralization period. EDX spectra of a) **SWCNT-1** and b) **SWCNT-2** to **-5** samples after incubation.

Figure 1

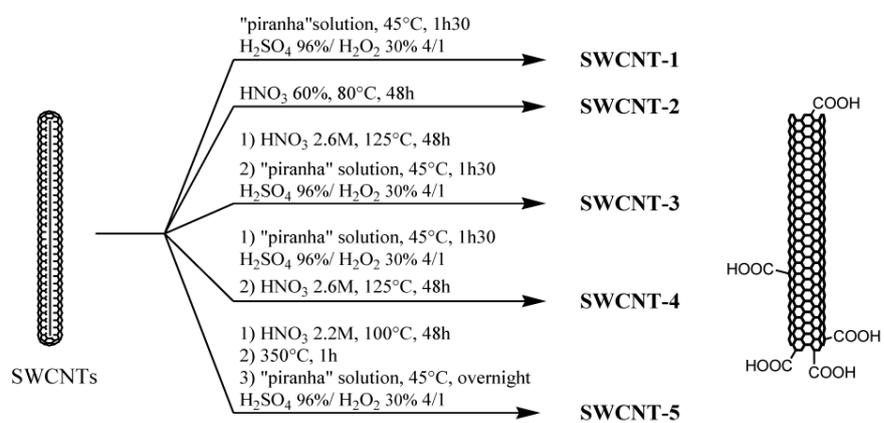


Figure 2

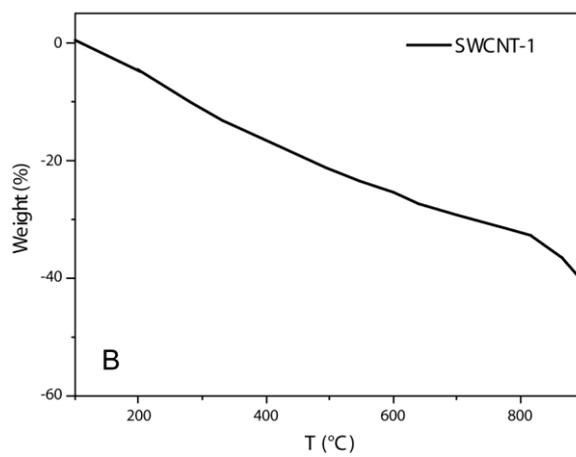
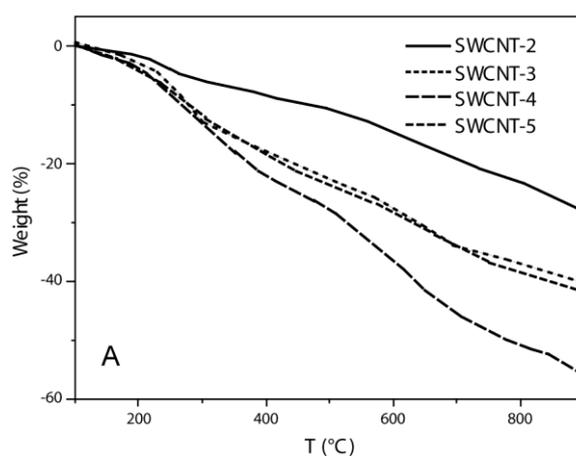


Figure 3

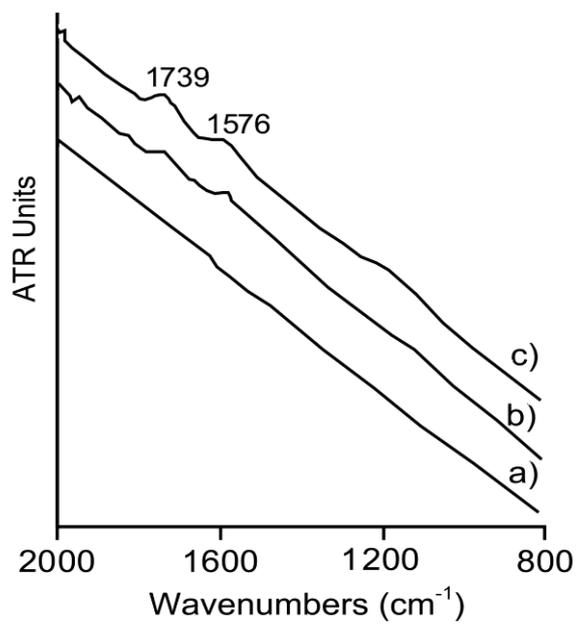


Figure 4

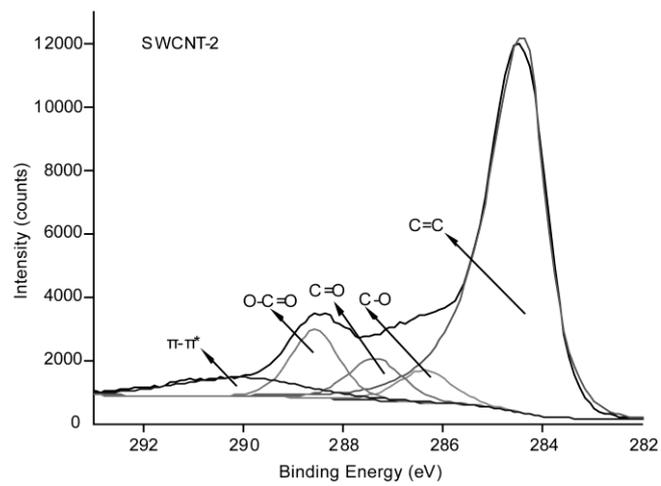
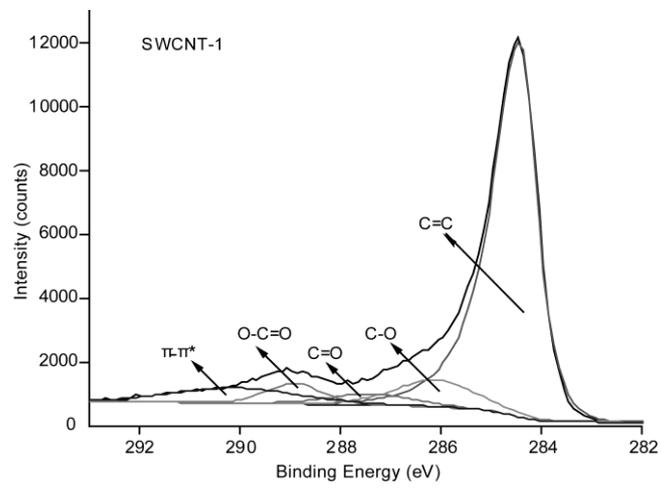


Figure 5

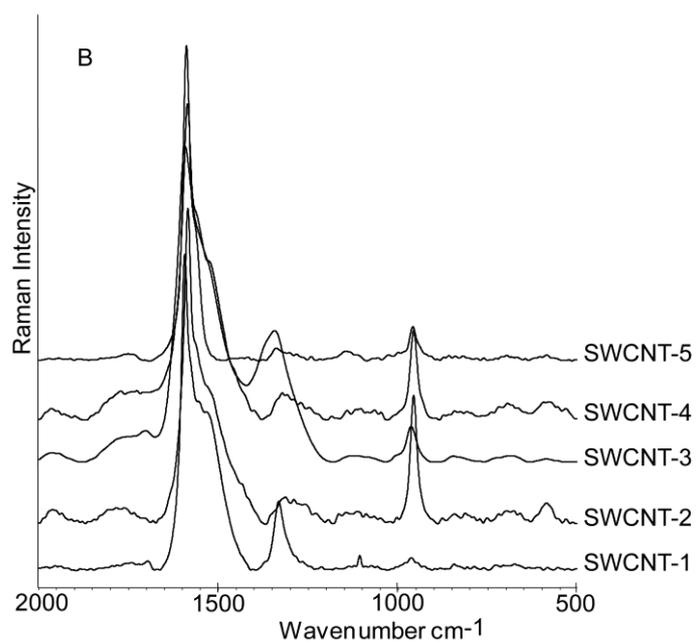
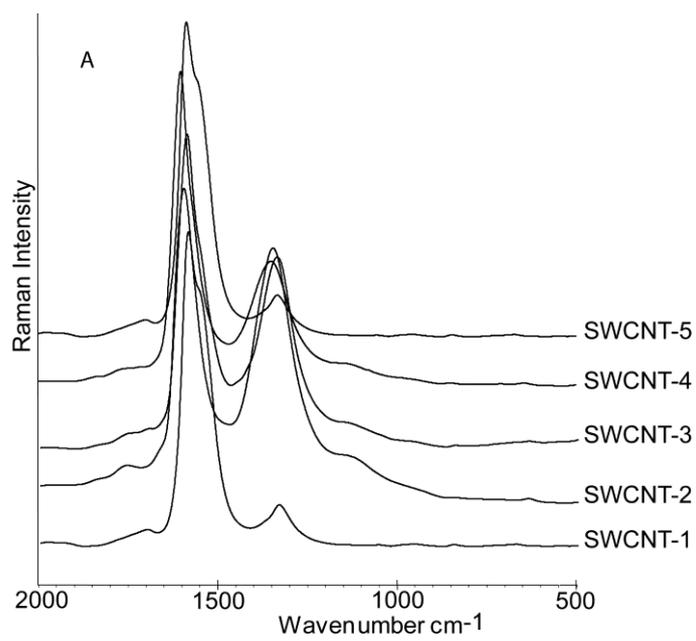


Figure 6

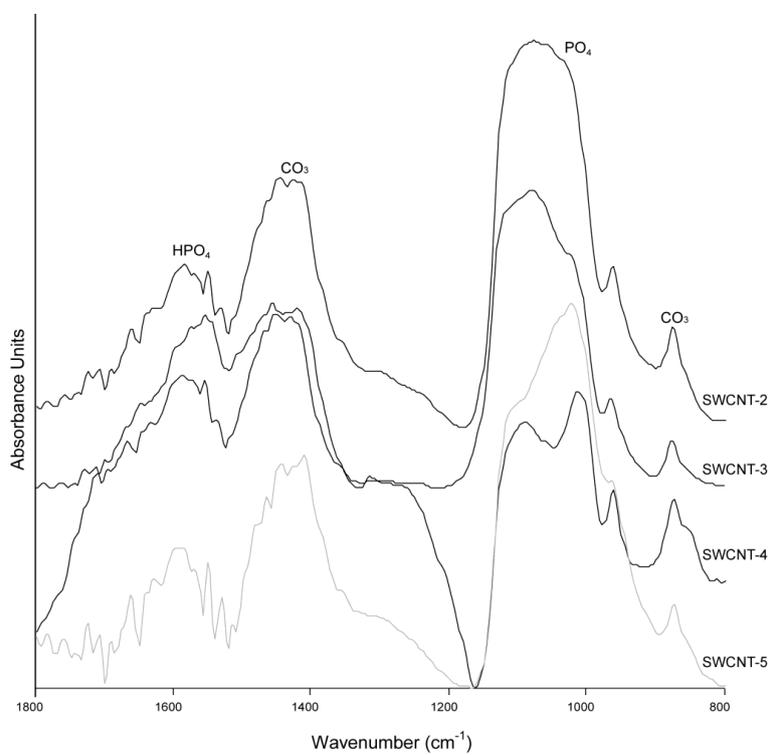
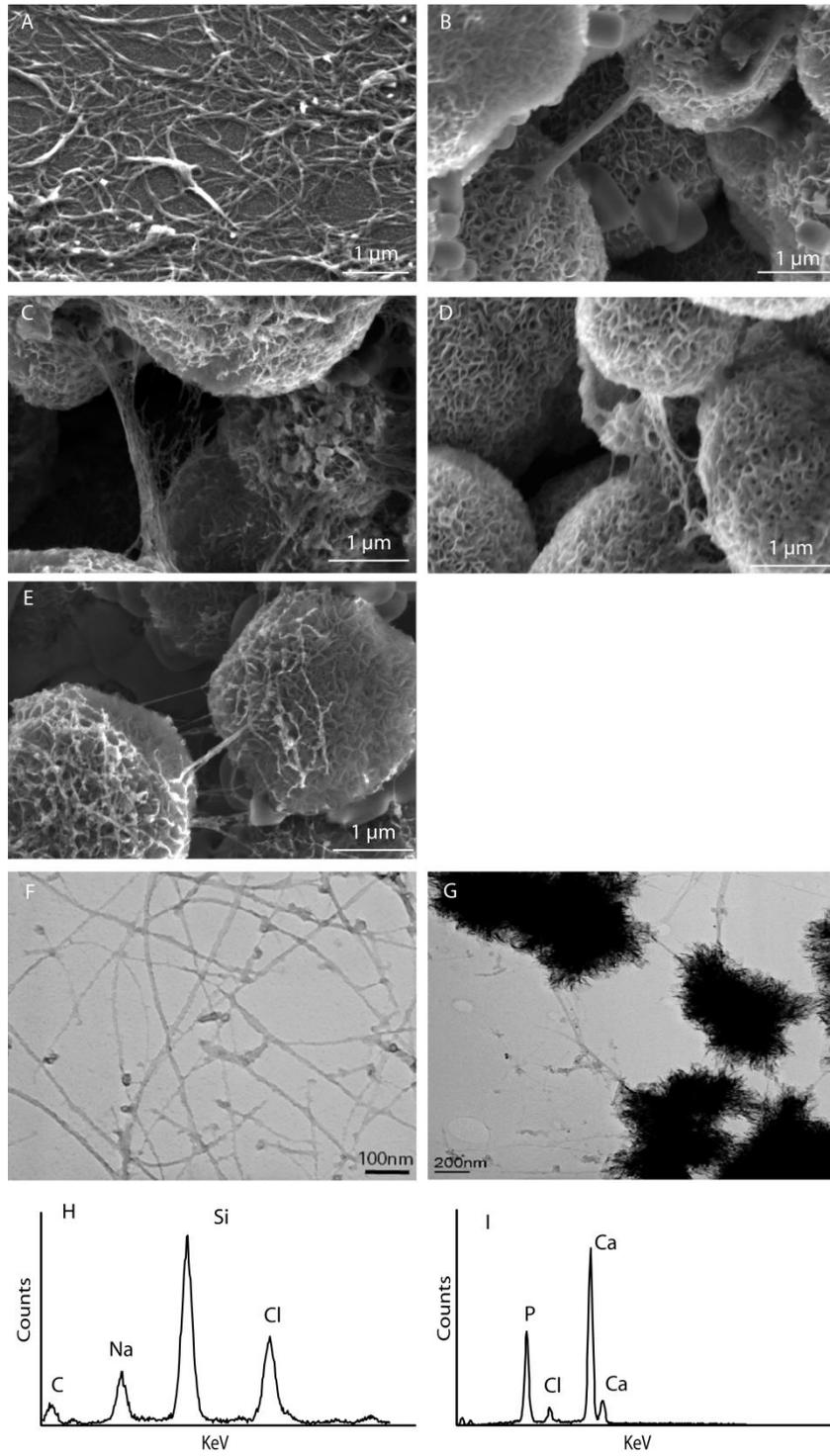


Figure 7



Strontium adsorption and desorption on hydroxyapatite crystals

in vitro

Beuvelot, J, Filmon R., Mauras Y., Libouban H., Baslé M.F., Chappard D.

Le tissu osseux est composé de 2 phases : une phase organique, qui lui confère son élasticité, et une phase minérale qui lui confère sa solidité. La phase organique est appelée matrice extracellulaire. Elle est principalement constituée de collagène de type I, qui agit comme armature pour la minéralisation osseuse et qui dirige l'orientation de la phase minérale (cristaux d'hydroxyapatite) (Fonseca, 2008). Le tissu osseux possède des propriétés adaptées aux contraintes mécaniques qu'il subit. Il possède aussi la faculté de réparer une fracture et sert de réservoir d'ions Ca^{2+} . Pour assurer ces propriétés, le tissu osseux est en perpétuel renouvellement grâce au remodelage osseux. C'est au cours de ce processus que l'os ancien est résorbé par les ostéoclastes et qu'il est remplacé par de l'os nouveau par les ostéoblastes. Le remodelage osseux est caractérisé par un équilibre entre résorption et formation. Plusieurs mécanismes peuvent dérégler cet équilibre et être responsables de maladies osseuses, dont l'ostéoporose.

En 1985, une faible dose de strontium (Sr^{2+}) administrée à des rats a permis de stimuler la formation de tissu ostéoïde, mettant en évidence la stimulation de la formation osseuse (Marie *et coll.*, 1985; Marie et Hott, 1986; Grynepas et Marie, 1990). Les effets d'un sel de strontium divalent ont été testés sur des rates ovariectomisées (Marie *et coll.*, 1993). Le strontium a un mécanisme d'action qui, en découplant la résorption et la formation osseuses, permet de prévenir la perte osseuse trabéculaire chez la rate déficiente en œstrogène. Il inhibe la résorption sans réduire la formation (Marie *et coll.*, 1993). Ce traitement permet aussi d'augmenter le nombre de sites de formation osseuse sans avoir d'effet délétère sur la minéralisation, la composition chimique ou le profil cristallographique du minéral (Grynepas *et coll.*, 1996). Par la suite, de nombreuses études ont montré l'efficacité du strontium dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique (Canalis *et coll.*, 1996 ; Buehler *et coll.*, 2001; Bonnellye *et coll.*, 2008). Le strontium possède un double effet sur le remodelage osseux : il stimule la formation des ostéoblastes (et par conséquent augmente la formation osseuse), tout en diminuant la différenciation des ostéoclastes, ce qui va inhiber la résorption (Marie, 2006). Les études réalisées sur biopsies osseuses de patients traités ont permis de montrer que le Sr^{2+} s'accumulait dans l'os (Boivin *et coll.*, 1996; Meunier *et coll.*, 2002; Meunier *et coll.*, 2004). Une plus grande quantité de strontium s'accumule dans l'os trabéculaire nouvellement formé par rapport à l'os cortical (Dahl *et coll.*, 2001). Mais la quantité de Sr^{2+} décroît chez les animaux sacrifiés 6 semaines après la fin du traitement. Le Sr^{2+} apparaît donc faiblement lié au cristal osseux mature et donc facilement échangeable (Boivin *et coll.*, 1996).

Le but de cette étude a été d'observer l'incorporation et la désorption du Sr^{2+} dans un modèle de minéralisation acellulaire développé au laboratoire, basé sur la calcification d'un support polymérique. Nous avons utilisé des pastilles de pHEMA carboxyméthylées (pHEMA-CM) qui permettent de mimer la calcification du woven bone (Filmon *et coll.*, 2002). Le polymère est incubé dans un « body fluid » (BF) synthétique contenant des ions Sr^{2+} en concentration croissante. Les effets de l'incorporation du Sr^{2+} sur le développement du cristal, sa cristallinité et ses paramètres cristallographiques ont été étudiés. La désorption du Sr^{2+} des cristaux d'HAP a aussi été étudiée en plongeant les supports polymériques minéralisés dans une solution saline sans Sr^{2+} , de façon à mimer les effets de l'arrêt du traitement chez les patients.

L'étude s'est déroulée sur 2 mois, soit 10 semaines (Figure 36). Après l'élaboration des supports en poly(2-hydroxyéthyle méthacrylate) (pHEMA) sous forme de pastilles de 8 mm de diamètre, ces derniers ont été immergés dans une solution de body fluid synthétique à S0. Durant une semaine, la minéralisation s'est amorcée à la surface des supports polymériques. Passé ce délai, les ions strontium (Sr^{2+}) ont été incorporés à S1 au BF aux concentrations 130, 260 et 390 $\mu\text{mol/L}$. La calcification s'est déroulée en présence de Sr^{2+} pendant 2 semaines. A S3, les échantillons ont été divisés en 2 groupes : le premier groupe a été utilisé pour des analyses chimiques (dosage du Ca^{2+} , PO_4^{3-} et Sr^{2+}), il a été étudié par spectroscopie Raman, FTIR et diffraction X et il a subi des analyses morphologiques (microscopie électronique à balayage). Les échantillons du deuxième groupe ont servi à l'étude de la désorption du Sr^{2+} . Ces échantillons ont été placés dans une solution saline et des prélèvements ont été réalisés après 1, 4, 8, 16, 32, 48, et 61 jours. Les quantités de Ca^{2+} , PO_4^{3-} et Sr^{2+} contenues dans les prélèvements ont été dosées respectivement par les laboratoires de Biochimie (Modular spectrometer, Roche diagnostics, Meylan, France) et de Pharmacologie (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry - ICP-AES - Jobin Yvon JY 238 Ultrace, HORIBA JOBIN-YVON, Longjumeau, France) du CHU d'Angers. Les échantillons ont été analysés chimiquement et caractérisés par spectroscopie Raman, FTIR et diffraction X après la désorption.

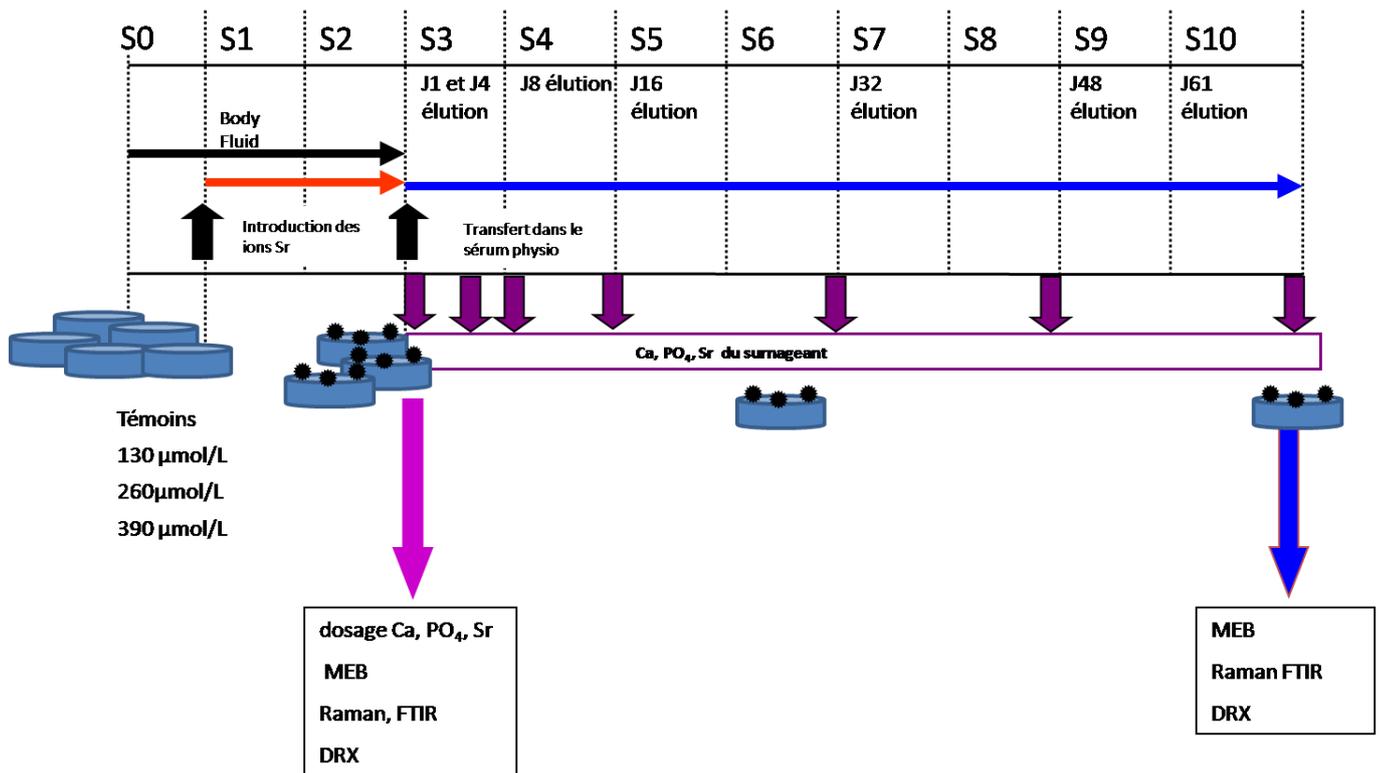


Figure 36 : Déroulement de l'étude.

Après une semaine d'incubation dans le BF, les observations MEB ont montré la formation de nodules minéralisés de forme ronde : les calcosphérites (Figure 37). Ils sont constitués d'un assemblage de tablettes d'hydroxyapatite. Après cette étape, les ions Sr²⁺ ont été ajoutés au BF aux concentrations déterminées pendant 2 semaines.

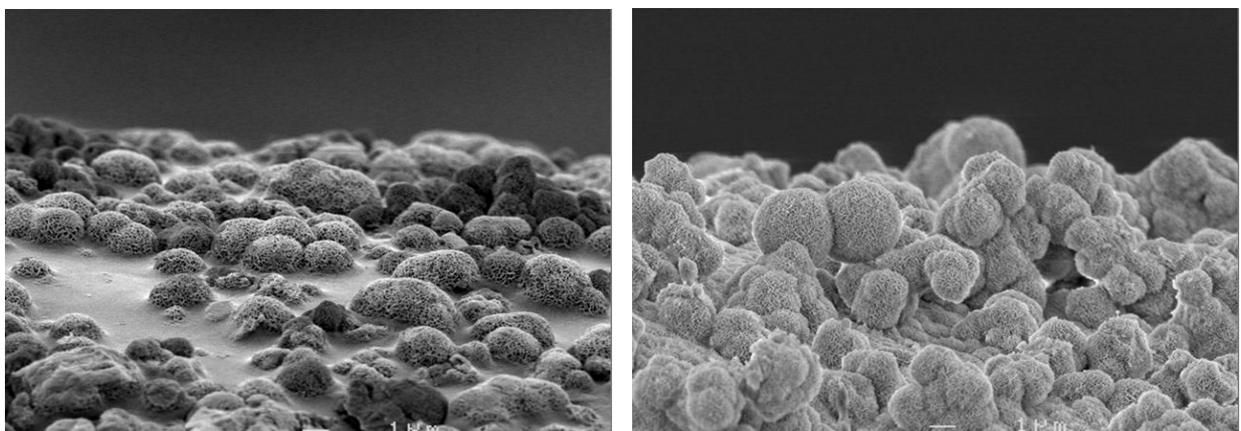


Figure 37 : Calcosphérites à la surface du pHEMA après 1 semaine dans le BF.

Les analyses structurelles réalisées avant la désorption ont permis de mesurer la taille des calcosphérites. L'analyse d'images a montré des différences significatives de taille des calcosphérites en fonction de la concentration en ions Sr^{2+} (Figure 38). La taille des calcosphérites a diminué lorsque la concentration en ions Sr^{2+} a augmenté. Néanmoins, on constate que les calcosphérites formées quelque soit la concentration de Sr^{2+} restaient de forme et de taille similaire aux calcosphérites observées *in vivo* dans les os humains (Filmon *et coll.*, 2000).

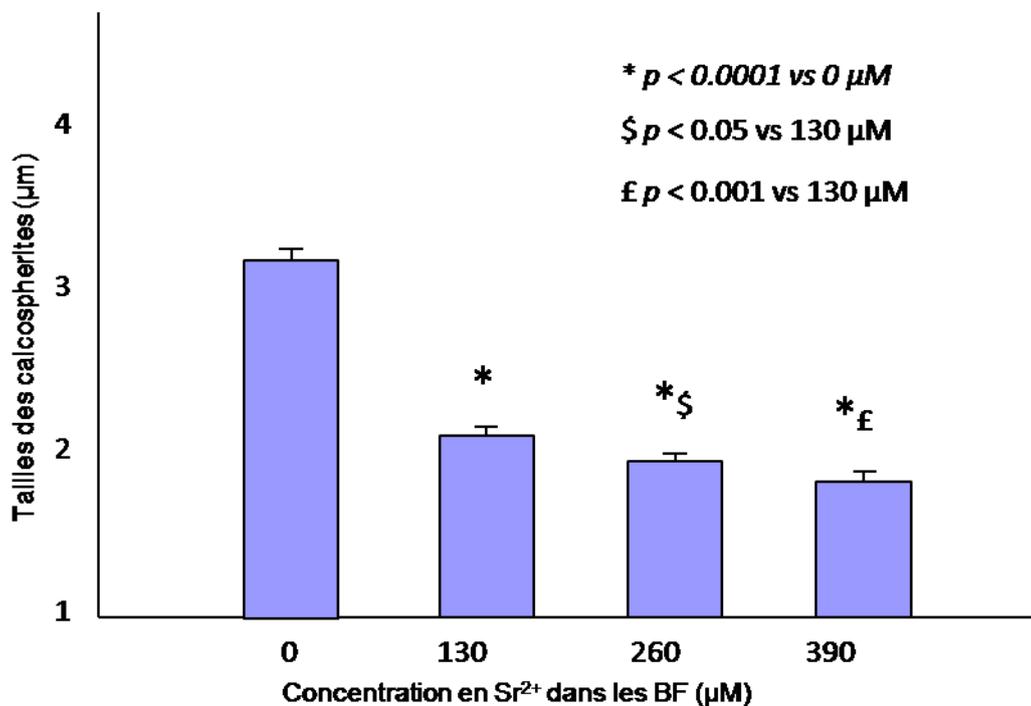


Figure 38 : Evolution de la taille des calcosphérites en fonction de la concentration en Sr^{2+} .

La quantité de Sr^{2+} intégrée dans les calcosphérites a augmenté quand la concentration de Sr^{2+} a augmenté dans le BF (Figure 39).

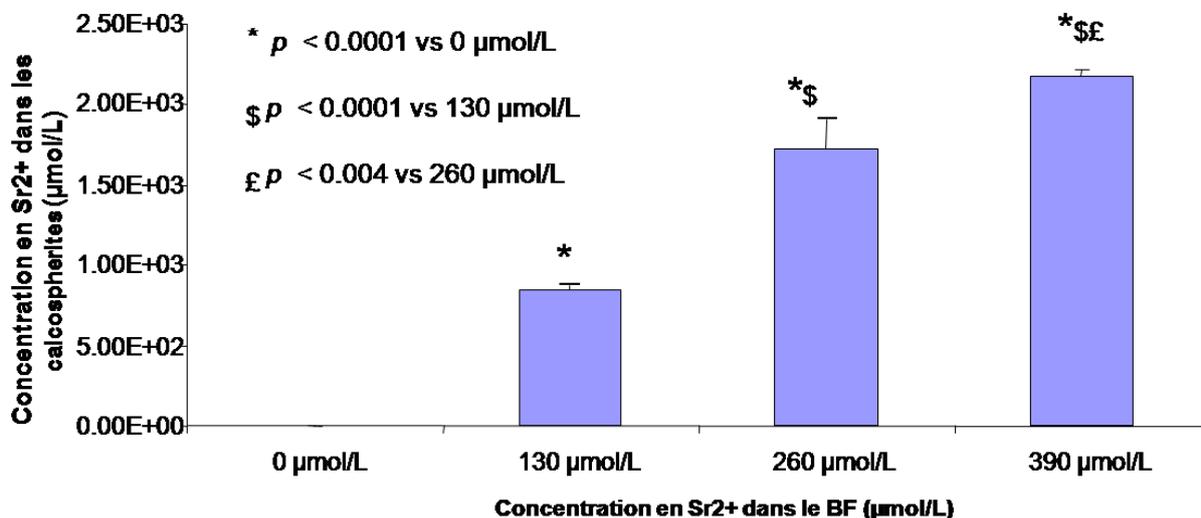


Figure 39 : Quantité de strontium intégrée dans les calcosphérites en fonction de la concentration en Sr^{2+} dans le BF.

Cependant, les quantités de calcium ou de phosphate qui formaient les calcosphérites n'ont pas varié de façon significative en fonction de la concentration de Sr^{2+} introduite dans le BF (Figure 40).

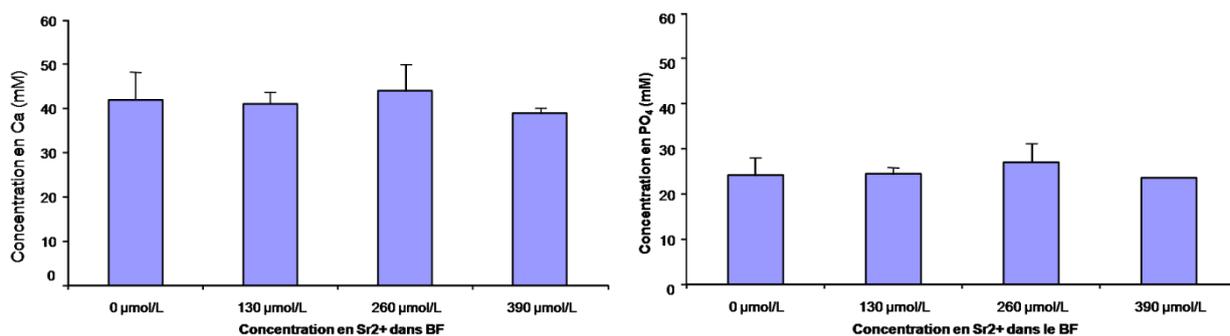


Figure 40 : Quantités de calcium et de phosphate intégrées dans les calcosphérites.

Les analyses effectuées en spectroscopie infrarouge (FTIR) ont permis de caractériser la composition de chaque échantillon en fonction de la concentration de Sr^{2+} . L'allure générale

des spectres a confirmé la formation d'une couche d'hydroxyapatite (Antonakos *et coll.*, 2007) (Figure 41). Tous les spectres, quelque soit la concentration de Sr^{2+} introduite dans le BF, présentaient un large pic d'absorption du PO_4^{3-} vers 1150 cm^{-1} et un pic plus faible vers 960 cm^{-1} (Antonakos *et coll.*, 2007). L'ensemble des spectres présentait aussi le pic d'étirement (stretching) des CO_3 (1430 and 1460 cm^{-1}) et le pic de pliage (bending) (873 cm^{-1}) dus à la substitution des ions phosphate par les ions carbonate (substitution de type B) dans la structure de l'hydroxyapatite (Landi *et coll.*, 2007). Le pic à 1750 cm^{-1} correspond au groupement $-\text{COOH}$, issu de la carboxyméthylation des pastilles de pHEMA.

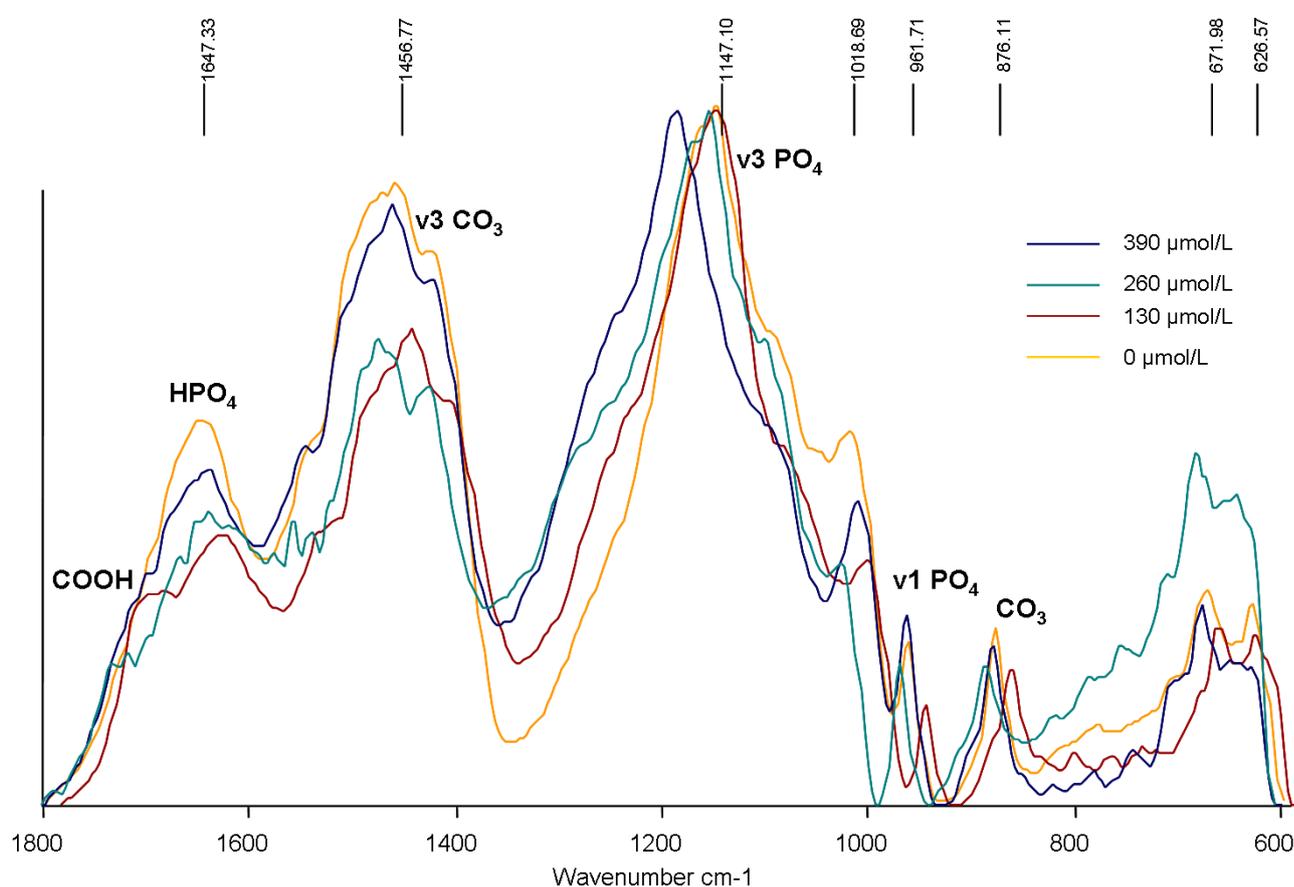


Figure 41 : Spectres FTIR des échantillons calcifiés à S3.

Les spectres issus des analyses infrarouges des échantillons calcifiés analysés après la désorption (Figure 42) présentaient les mêmes pics que les spectres faits avant la désorption. On peut en déduire que la désorption du Sr^{2+} n'a induit aucune modification dans la composition de la phase calcifiée.

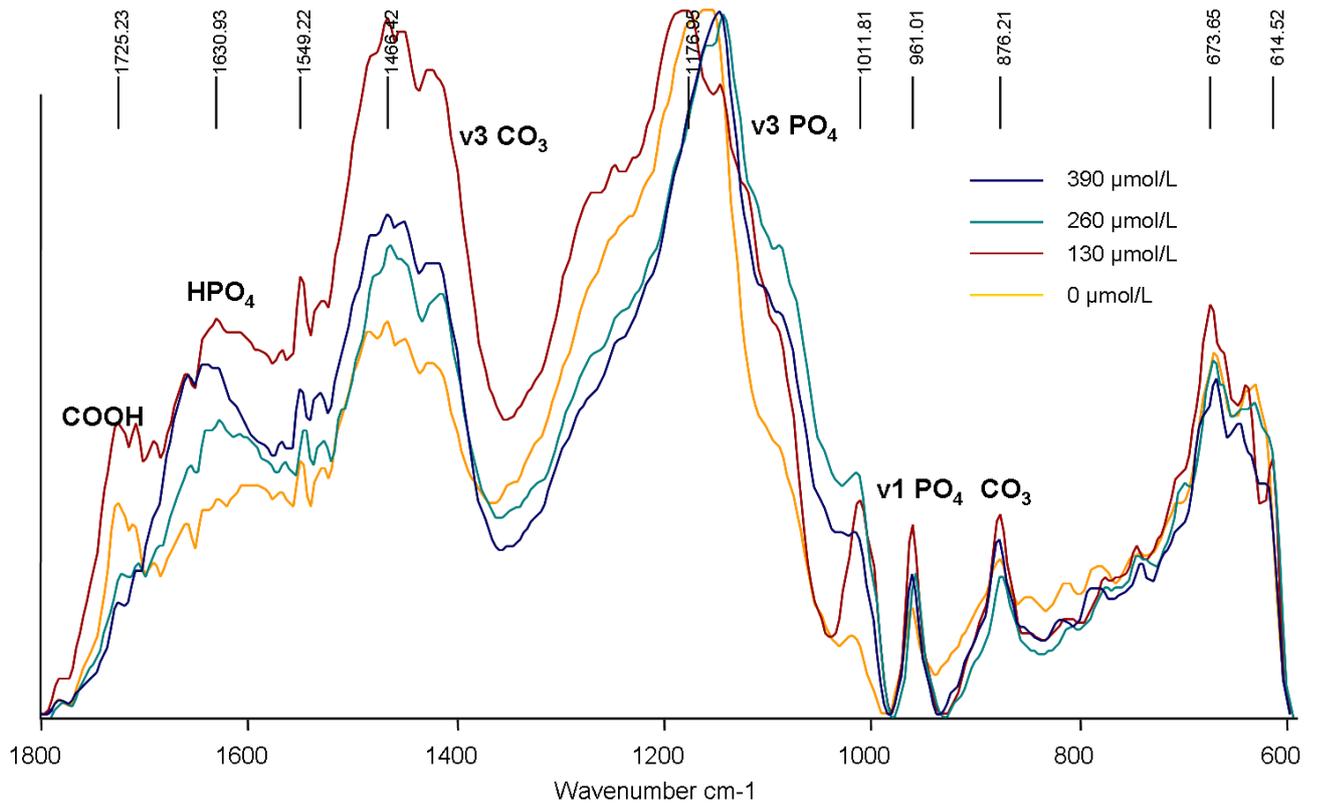


Figure 42 : Spectre FTIR des échantillons calcifiés à S10.

Tous les spectres réalisés en spectroscopie Raman présentaient les pics caractéristiques de l'HAP (Figure 43) : les pics PO_4 v1, v2, v4 et v3 respectivement à 960 cm^{-1} , entre 400 et 500 cm^{-1} , entre 550 et 650 cm^{-1} et entre 1000 et 1100 cm^{-1} (Ou-Yang *et coll.*, 2000; Koutsopoulos, 2002; Zou *et coll.*, 2005).

Sur tous les spectres, le pic v2 CO_3 a été observé à 879 cm^{-1} (Antonakos *et coll.*, 2007). Ce pic se superpose à celui du HPO_4 en 873 cm^{-1} (Penel *et coll.*, 1998).

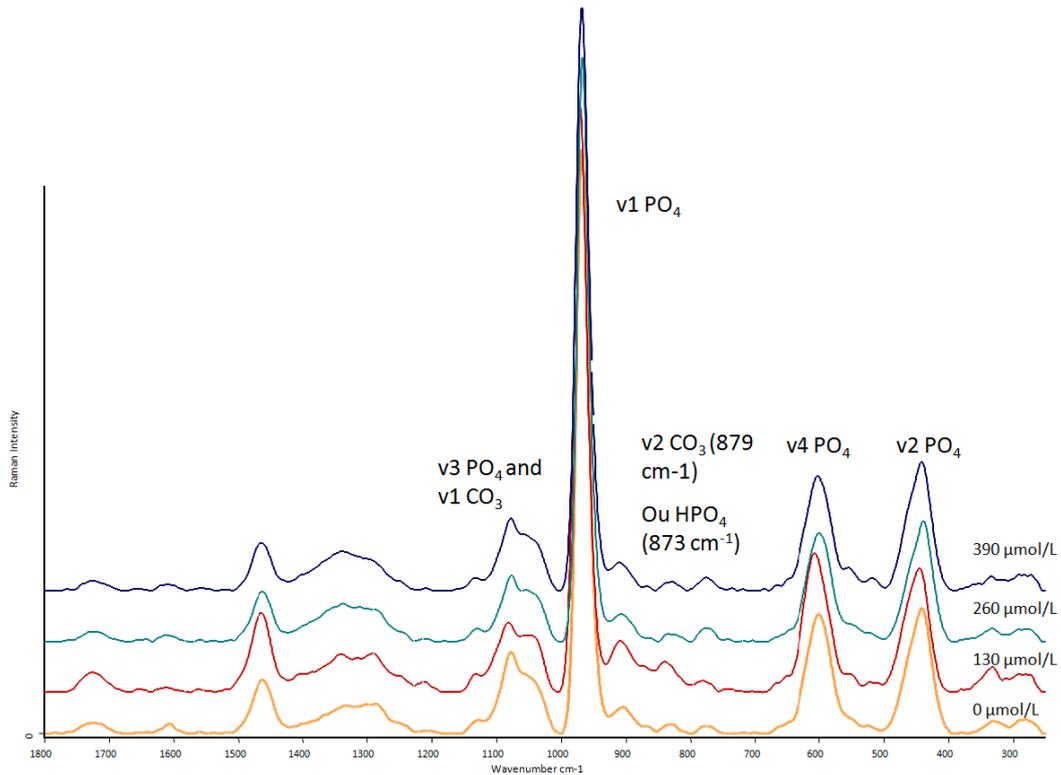


Figure 43 : Spectre Raman à S3.

Les analyses faites par diffraction des rayons X (DRX) ont permis de déterminer les paramètres a et c du cristal formé sur les supports polymériques. Les mesures ont été effectuées au laboratoire CIMA (Faculté des Sciences, Angers) avec un diffractomètre D8 possédant une source monochromatique à anode de cuivre (Bruker, France). La DRX est une technique d'analyse basée sur la diffraction des rayons X par la matière. La diffraction n'a lieu que sur la matière cristalline (pour les matériaux non-cristallins, on parle de diffusion). Les mesures s'effectuent avec un diffractomètre et les données collectées forment le diagramme de diffraction ou diffractogramme. La DRX est une méthode d'analyse chimique qui ne fonctionne que sur la matière cristallisée (minéraux, métaux, céramiques, produits organiques cristallisés) et pas sur la matière amorphe (liquides, polymères, verres). Elle permet de reconnaître des produits ayant la même composition chimique brute, mais une forme de cristallisation différente, par exemple de distinguer les différentes silices (qui ont toutes la même formule brute SiO_2 : quartz, cristobalite) ou les différents aciers (acier ferritique, austénite).

On prépare l'échantillon sous la forme d'une poudre aplanie dans une coupelle, ou bien sous la forme d'une plaquette solide plate. On envoie des rayons X sur cet échantillon, et un détecteur fait le tour de l'échantillon pour mesurer l'intensité des rayons X selon la direction (Figure 44).

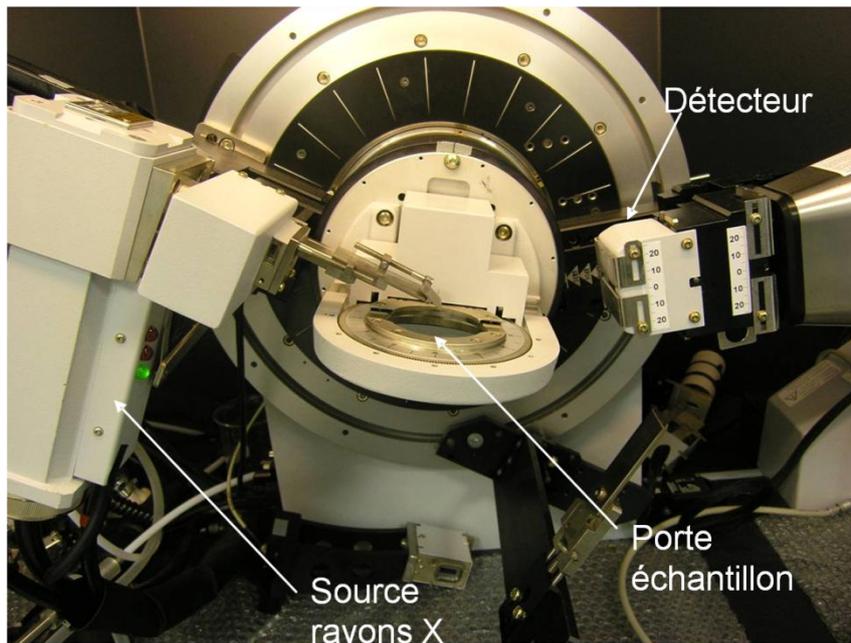


Figure 44 : Diffractomètre du laboratoire CIMA (Faculté des Sciences, Angers).

Les rayons X, comme toutes les ondes électromagnétiques, provoquent un déplacement du nuage électronique par rapport au noyau dans les atomes. Les oscillations induites provoquent une réémission d'ondes électromagnétiques de même fréquence. Ce phénomène est appelé diffusion de Rayleigh (Figure 45).

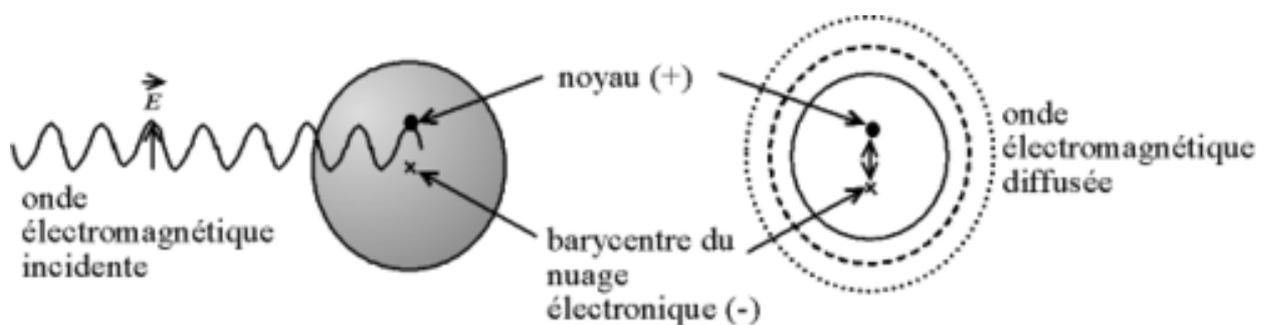


Figure 45 : Représentation de la Diffusion de Rayleigh : l'onde électromagnétique déforme le nuage électronique des atomes, le barycentre des charges négatives oscille ainsi par rapport au noyau (charge positive). Le dipôle électrostatique ainsi créé rayonne, c'est ce rayonnement induit qui constitue la diffusion de Rayleigh.

La longueur d'onde des rayons X étant de l'ordre de grandeur des distances interatomiques, les interférences des rayons diffusés vont être alternativement constructives ou destructives (Figure 46). Selon la direction de l'espace, on va donc avoir un flux important de photons X, ou au contraire très faible ; ces variations selon les directions forment le phénomène de diffraction X. Ce phénomène a été découvert par Max von Laue (Prix Nobel en 1914) et longuement étudié par William Henry Bragg et son fils William Lawrence Bragg (prix Nobel commun en 1915). Les directions dans lesquelles les interférences sont constructives, appelées « pics de diffraction », peuvent être déterminées par la formule suivante, dite loi de Bragg :

$$2 d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

Avec

d = distance interréticulaire, c'est-à-dire distance entre deux plans cristallographiques ;

θ = demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur) ;

n = ordre de réflexion (nombre entier) ;

λ = longueur d'onde des rayons X.

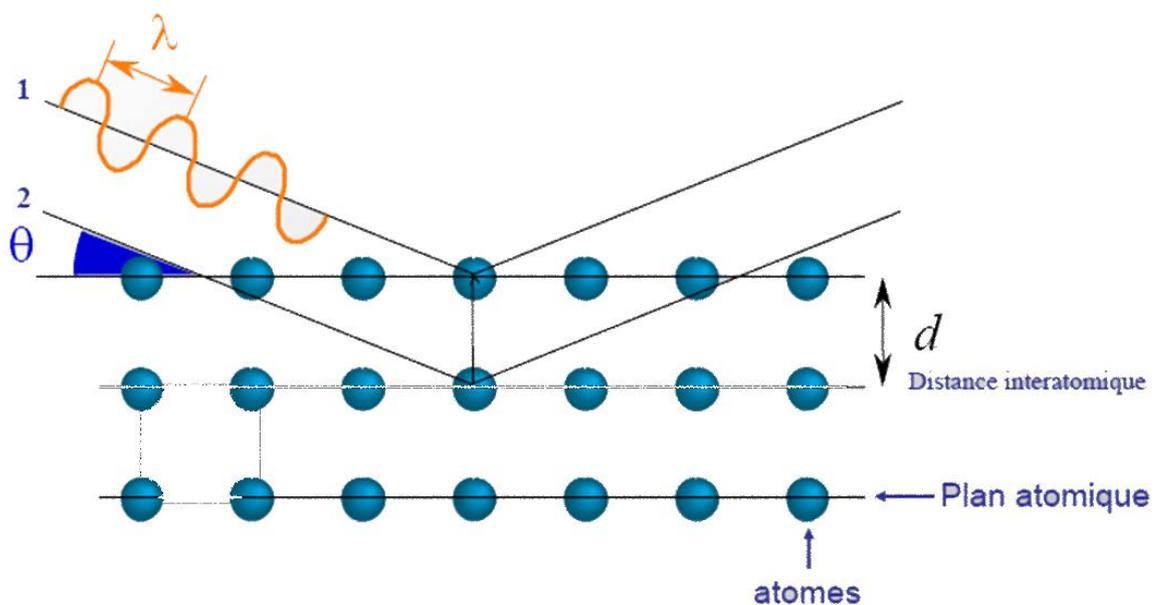


Figure 46 : Diffraction de rayons X par une famille de plans atomiques. Le rayon X de longueur d'onde λ entre en contact avec les atomes de ces plans ; il va les faire vibrer de façon constructive (apparition d'un pic sur le diffractogramme) ou destructive (pas de pic).

Comme les plans cristallographiques peuvent être repérés par les indices de Miller $\{hkl\}$, on peut indexer les pics de diffraction selon ces indices. La DRX nous a permis d'évaluer les spécificités cristallographiques du minéral formé.

A partir des diffractogrammes obtenus en analysant les pastilles avec les différentes concentrations de Sr^{2+} , les paramètres de maille a et c ont été calculés (Farlay *et coll.*, 2005).

Les paramètres a et c ne varient pas de façon significative en fonction de la quantité de Sr^{2+} intégré dans le minéral (Tableau 3 et Figure 47).

In vitro, il a été montré que la substitution des ions Ca^{2+} par les ions Sr^{2+} n'entraînait pas de modification significative des paramètres a et c (Christoffersen *et coll.*, 1997). Chez le singe, les variations des paramètres a et c n'étaient pas significatives entre les animaux contrôle et les animaux traités au strontium (Boivin *et coll.*, 1996). Des comparaisons ont été faites sur l'incorporation du Sr^{2+} chez le rat, le singe et l'homme ; chez ces trois espèces, quelque soit la dose de Sr^{2+} administrée, le Sr^{2+} incorporé dans l'os n'entraîne pas de changement dans les paramètres du cristal, même si le rayon ionique du Sr^{2+} (0,113 nm) est légèrement plus élevé que celui du Ca^{2+} (0,099 nm) (Dahl *et coll.*, 2001).

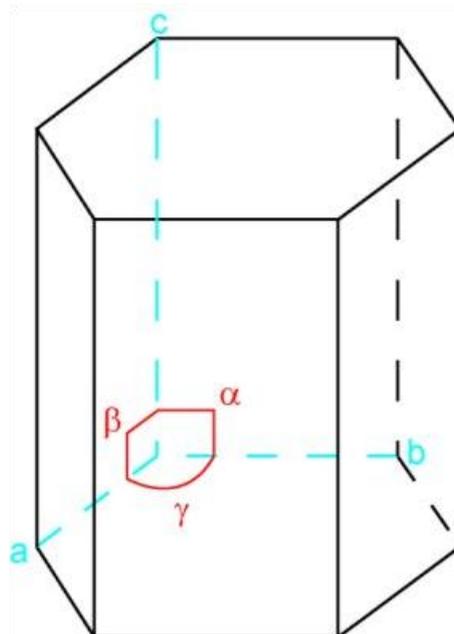


Figure 47 : Maille élémentaire hexagonale de l'HAP.

Sr ²⁺ (μmol/L) dans BF	Sr ²⁺ /Ca ²⁺ (% intégré dans minéral)	Paramètre c (Å)	Paramètre a (Å)
0	0.0032 ± 0,0001	6.848 ± 0.030	9.654 ± 0.053
130	2.1 ± 0.3	6.833 ± 0.006	9.610 ± 0.009
260	4.0 ± 0.1	6.846 ± 0.066	9.616 ± 0.092
390	5.61 ± 0.09	6.862 ± 0.019	9.652 ± 0.033

Tableau 3 : Variation des paramètres a et c du cristal d'HAP en fonction de la concentration de Sr²⁺.

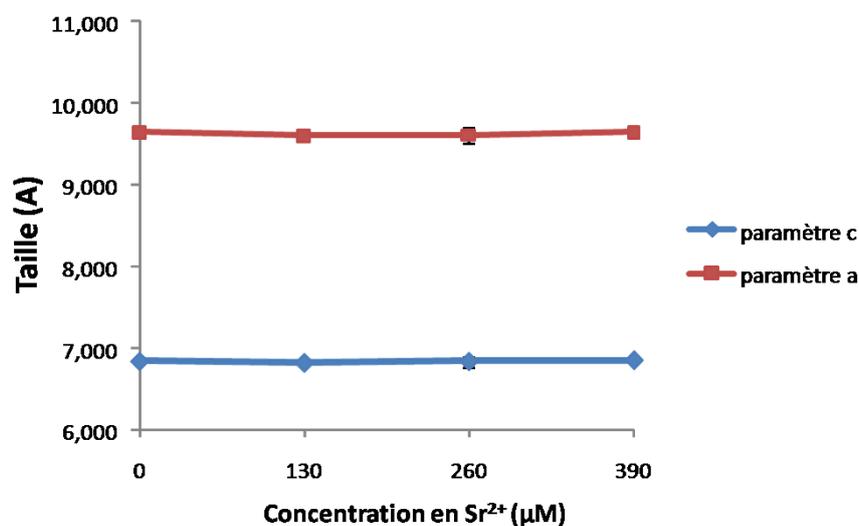


Figure 48 : Variations des paramètres de maille en fonction de la concentration en Sr²⁺.

L'étude de la désorption a permis de mesurer la quantité de Sr²⁺ libérée dans le milieu au cours du temps (Figure 48). L'allure générale des courbes est la même quelque soit la concentration en Sr²⁺ de départ. Les courbes indiquent une libération importante dans les premiers temps (jusqu'à J8) et une libération plus lente qui tend vers un palier par la suite. A J61, ce qui correspond à 8 semaines de libération, il reste environ 70 % du Sr²⁺ qui avait été intégré dans les calcosphérites au départ.

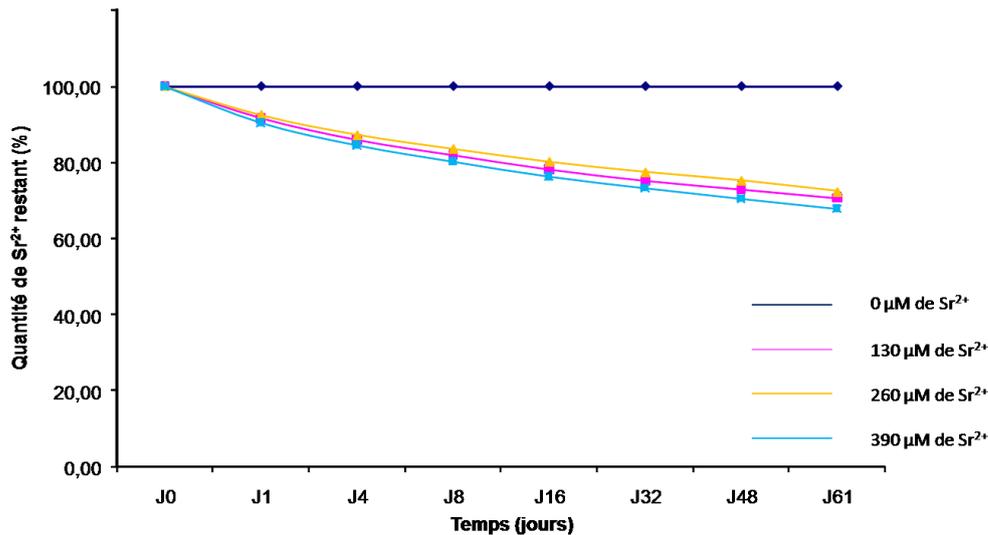


Figure 49 : Graphique de désorption du Sr²⁺.

Les échantillons ont été analysés en DRX après la période de désorption. La variation des paramètres de maille a et c est représentée Figure 49. Ces paramètres restent constants quelque soit la concentration en Sr²⁺ au départ et sont identiques aux paramètres mesurés avant la désorption.

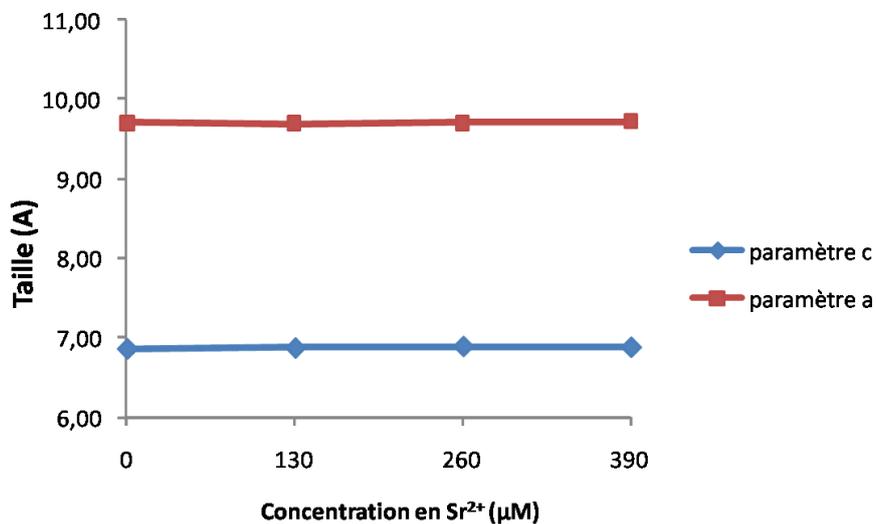


Figure 50 : Variation des paramètres a et c après la désorption en fonction de la concentration en Sr²⁺.

Notre modèle *in vitro* de calcification a permis d'étudier l'influence de la présence d'ions Sr²⁺ sur le processus de calcification. L'étude a montré que 30% du Sr²⁺ intégré dans les calcosphérites a été libéré après 8 semaines par élution passive. Les calculs théoriques réalisés

grâce au logiciel TableCurve ont permis de déterminer les équations qui correspondent le mieux à la courbe de désorption du Sr^{2+} (Tableau 4). Nous nous sommes basés sur les coefficients de corrélation (R^2) et sur l'ajustement des courbes sur les valeurs qui ont été dosées (Figure 51). Pour toutes ces équations, le temps d'élution total du Sr^{2+} est relativement long. Les calculs montrent que l'élution de 50% du Sr^{2+} intégré dans les calcosphérites varie de 147 à 740 jours (Tableau 4). Cependant, les résultats diffèrent de ceux obtenus lors des études *in vivo* qui indiquent une élution plus rapide. Ces résultats s'expliquent en considérant que notre modèle *in vitro* ne tient pas compte des échanges de strontium liés aux protéines ni des événements cellulaires qui se produisent lors du remodelage osseux. De plus, les analyses de diffraction X ont montré que l'incorporation de Sr^{2+} ne modifiait pas la cristallinité ou les paramètres de maille du cristal d'hydroxyapatite. Ces résultats suggèrent que le Sr^{2+} est principalement incorporé par échange d'ions à la surface du cristal.

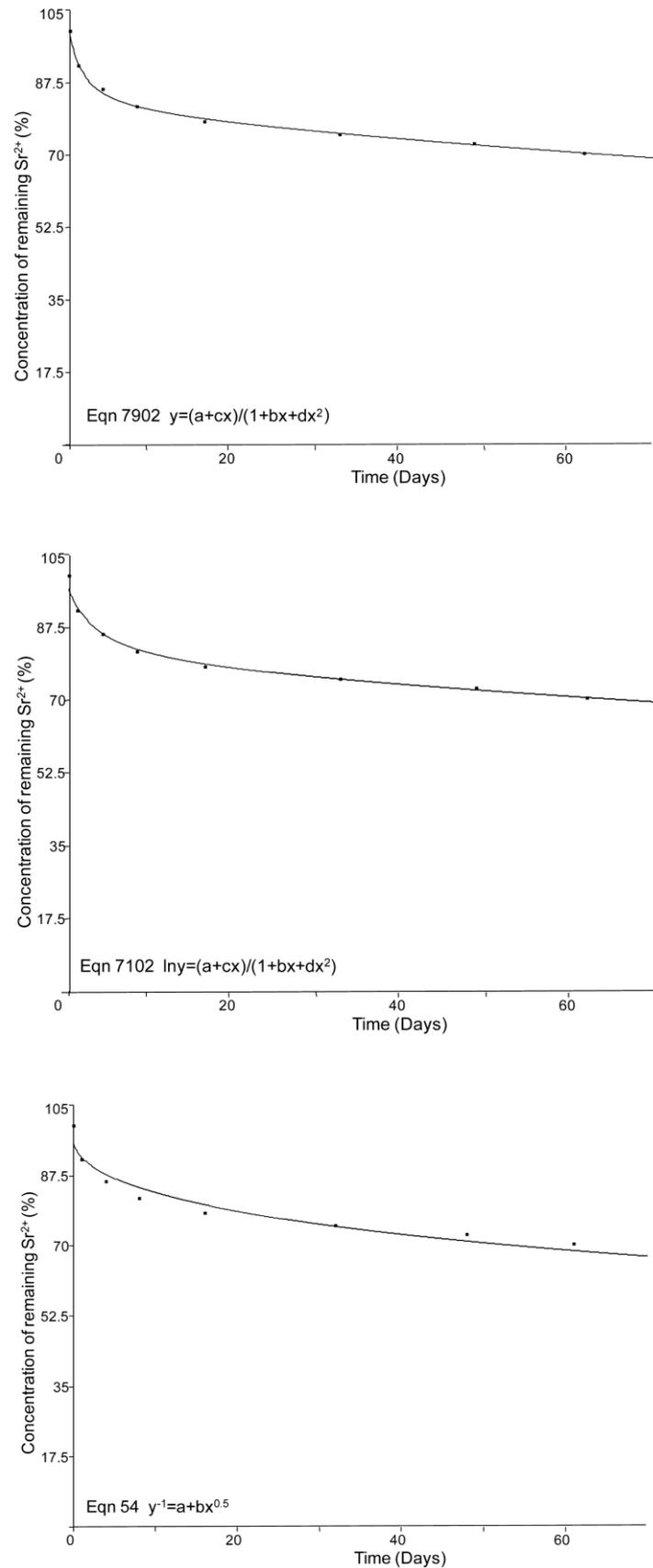


Figure 51 : Représentations d'après TableCurve des équations 7902, 7102 et 54. Les points représentent les valeurs de Sr²⁺ qui ont été dosées lors de la période d'éluion. Ils se superposent aux courbes avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,95.

N° équation d'après TableCurve	Equation	R ²	a	b	c	d	x with y=50%
7902	$y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,997457919	99,817	0,5643	44,7616	0,0012	740 days
1384	$\ln y = a+bx^{0,5}+c\exp(-x)$	0,994072254	4,5067	-0,032	0,0118		350 days
1174	$y = a+bx^{0,5}+c\exp(-x)$	0,992983237	89,6197	-2,4905	10,6426		250 days
7102	$\ln y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,984207155	4,5737	0,242	1,0511	9,73E-05	147 days
7112	$y^{0,5} = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,980686618	9,8239	0,2402	2,1041	0,0002	293 days
7002	$y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,972295144	95,7779	0,214	16,2904	0,0003	380 days
54	$y^{-1} = a+bx^{0,5}$	0,958702852	0,01	0,0005			400 days

Tableau 4 : Les équations qui correspondent aux points d'élution déterminés lors des dosages. R2 est le coefficient de corrélation, x représente le temps en jours et y la quantité de Sr²⁺ éluée en %.

Strontium adsorption and desorption on hydroxyapatite crystals *in vitro*

J. Beuvelot¹, R. Filmon¹, Y. Mauras², H. Libouban¹, M.F. Baslé¹, D. Chappard¹

¹ INSERM, U 922 "Remodelage osseux et Biomatériaux" LHEA Faculté de Médecine,
Angers, France

² Laboratoire de Pharmacologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Please send all correspondence to:

* Daniel CHAPPARD, M.D., Ph.D.

Tel: (33) 241 73 58 65

INSERM U922 – LHEA

Faculté de Médecine,

E-Mail: daniel.chappard@univ-angers.fr

49045 ANGERS Cedex - FRANCE

Key words:

ABSTRACT

Strontium ranelate is an antiosteoporotic agent which stimulates bone formation and decreases bone resorption. Sr^{2+} binds to hydroxyapatite (HA) crystals by ionic exchange. Little is known about the physico-chemical mechanisms of Sr^{2+} desorption from bone. We investigated the effect of Sr^{2+} on HA characteristics and its release *in vitro*. Pellets of a carboxymethylated polymer were incubated 1 week in BF to induce mineralization, then 2 weeks in a body fluid containing 0, 130, 260 or 390 μM of Sr^{2+} to allow growth and maturation of calcospherites. They were then dissolved in HCl and Ca^{2+} , PO_4^{3-} and Sr^{2+} content measured. Sr^{2+} desorption was assessed by transferring other pellets covered by calcospherites in saline during 61 days; saline was collected at regular intervals to measure the released ions and their remaining fraction in the calcospherites. HA was characterized by SEM and X-ray diffraction (XRD). At the end of the maturation period, Sr^{2+} was incorporated as a function of its concentration in BF. Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the calcospherites remained constant whatever Sr^{2+} concentration in BF. During desorption, Sr^{2+} was progressively released; the slope of elution was similar whatever the initial concentration; about 30% Sr^{2+} was released after 61 days in saline. XRD showed that incorporation of Sr^{2+} produced no significant change in crystal lattice parameters or cristallinity before and after the desorption period. Sr^{2+} was dose-dependently incorporated to HA crystals without modifying the crystal parameters.

1. INTRODUCTION

Strontium ranelate (S12911, PROTELOS[®]) (SrRan) is composed of 2 atoms of stable strontium (Sr^{2+}) combined with an organic part (ranelic acid) which acts as carrier (Marie, 2005). SrRan is an antiosteoporotic agent which has a dual effect on bone remodeling (Canalis *et coll.*, 1996; Buehler *et coll.*, 2001; Bonnelye *et coll.*, 2008). It has been shown that Sr^{2+} acts by decreasing bone resorption while increasing bone formation (Marie *et coll.*, 1993; Marie, 2006). This effect is responsible for the SrRan efficacy in postmenopausal osteoporosis treatment, by reduction of vertebral and non vertebral fractures, observed at all stages of osteoporosis and also in the elderly (Meunier *et coll.*, 2004; Reginster *et coll.*, 2005; Seeman *et coll.*, 2006). Sr^{2+} is able to increase pre-osteoblasts replication, osteoblasts differentiation and in the same time to inhibit osteoclasts differentiation and activity (Baron et Tsouderos, 2002; Choudhary *et coll.*, 2003; Mentaverri *et coll.*, 2006; Choudhary *et coll.*, 2007; Zhu *et coll.*, 2007; Bonnelye *et coll.*, 2008). Sr^{2+} acts on osteoblasts by increasing the replication of osteoblast precursors (Caverzasio, 2008). Sr^{2+} may directly interact with a calcium-sensing receptor which regulates the recruitment, differentiation and survival of osteoblasts (Caverzasio, 2008; Marie, 2010) (Coulombe *et coll.*, 2004; Brown *et coll.*, 2009; Fromigué *et coll.*, 2009). It was also found to regulate osteoclast differentiation by inducing apoptosis of osteoclast precursors (Bonnelye *et coll.*, 2008) and increasing osteoprotegerin levels in the bone marrow (Atkins *et coll.*, 2009).

Sr^{2+} is also a metal cation that can be trapped in the bone matrix by hydroxyapatite crystals (HAP) (Pors Nielsen, 2004). It can be incorporated either by adsorption onto the crystal or by substitution of Ca^{2+} ions (Boivin et Meunier, 2003). Sr^{2+} was found to accumulate in bone as evidenced in bone biopsies performed in the patients and studied by X-ray microanalysis (Meunier *et coll.*, 2002; Meunier *et coll.*, 2004). However, recent clinical data indicate that it is tightly bound to the mineral phase of the bone matrix and easily exchangeable. In animals

treated, Sr^{2+} deposited in bone was found restricted to the newly formed bone packets and its amount did not increase upon time (Boivin *et coll.*, 1996). The bone Sr^{2+} content dramatically decreased in the animals sacrificed 6 weeks after the end of the treatment. Sr^{2+} appeared to be easily exchangeable from bone mineral and was slightly linked to mature crystals through ionic substitutions (Boivin *et coll.*, 1996). This tends to indicate a tight binding of Sr^{2+} onto the outer shell of the crystal rather than a substitution of Ca^{2+} by Sr^{2+} in the depth of the crystals.

The aim of the present study was to evaluate the incorporation and clearance of Sr^{2+} in an *in vitro* model of calcification based on polymer pellets. We have used a modified polymer, carboxymethylated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA-CM) which can mimic the calcification of woven bone with the development of HA nodules (calcospherites) (Filmon *et coll.*, 2002). Pellets of the polymer were incubated in a synthetic body fluid containing Sr^{2+} at increasing concentrations. The effects Sr^{2+} incorporation on crystal growth, crystallinity and crystallographic characteristics were investigated. Clearance of Sr^{2+} from HAP was also studied by transferring the pellets in saline devoided of Sr^{2+} to mimic the effects of the cessation of treatment in patients.

2. MATERIAL AND METHODS

1. Preparation of pellets of carboxylated polymer

Commercial 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (Aldrich Chemical, Illkirsh, France) contains residual methacrylic acid and EGDMA because of the fabrication process. The polymerization inhibitor 4-methoxyphenol (added by the manufacturer before shipping, at a concentration of 350 ppm) also needs to be removed. HEMA was purified and distilled under reduced pressure (5×10^{-2} mbar, 50°C).

Polymer was prepared by bulk polymerization. The polymerization mixture was composed of HEMA (10mL) and benzoyl peroxide 0.2g used as initiator. The mixture was accelerated by *N,N*-dimethyl-*para*-toluidine in a 100:1 (mol/mol) ratio of initiator to accelerator. The monomer was polymerized at 4°C for 2h in polypropylene wells (Delta Microscopies, Labège, France) to obtain calibrated pellets of pHEMA as previously described (Filmon *et coll.*, 2002; Guggenbuhl *et coll.*, 2008). Pellets were carboxymethylated by soaking in 0.5M bromoacetic acid in a 2M NaOH solution during 24h at room temperature, under gentle agitation (Filmon *et coll.*, 2002). Pellets of the carboxymethylated polymer were washed 3 times (10 minutes each) in deionized water and dried in an oven at 40°C. They were sterilized by UV radiation (360 nm for 3 hours) before use. The success of carboxymethylation was assessed by Fourier Transformed Infra-Red (FTIR) measurement. Infrared spectra in the range of 950–4000cm⁻¹ were recorded at 32 scans per spectrum at 8cm⁻¹ resolution using a Bruker Hyperion 3000 rapid microscope (Bruker optics, Germany) equipped with a single element Mercury Cadmium Telluride (MCT) detector.

2. Incubation of pellets in synthetic body fluid (BF)

A standard synthetic body fluid (BF) mimicking the extracellular fluids was prepared according to Yamada and al. (Yamada *et coll.*, 1994). Its composition was as follows: Na⁺: 171.25 mM; Ca²⁺: 3.11 mM; Mg²⁺: 1.87 mM; HCO₃: 5.25 mM; Cl⁻: 172.5 mM; HPO₄: 1.12 mM; SO₄: 0.62 mM; K⁺: 4.85 mM. The medium was supplemented with penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (500 µg/ml) to avoid mould and bacterial contamination. Pellets of pHEMA-CM materials were distributed in sterile capped vials containing 50 mL of the synthetic medium at 37°C. The calcification of the pellets was initiated during 1 week without adding of Sr²⁺. After this period, the development of HA calcospherites took place during 14

days in BF containing 0, 130, 260 and 390 $\mu\text{mol/L}$ of Sr^{2+} (Fig. 1). The media were changed every 2 or 3 days.

3. Scanning Electron Microscopy analysis (SEM)

SEM observation of pellets covered by calcospherites was performed on a JEOL 6301F (JEOL, Tokyo, Japan) field emission microscope with an accelerating 10 kV voltage at a distance of 15 mm. The microscope is equipped with an energy dispersive X-ray micro-analysis machine (EDX; Link ISIS, Oxford Instruments, Oxford, UK). Ten pictures per pellets were taken at a magnification of 4000x without tilt to measure the size of calcospherites with the ImageJ 1.34s software (NIH) on 20 calcospherites per image.

4. Chemical analysis

At the end of the mineralization period, pellets from 0, 130, 260 and 390 $\mu\text{mol/L}$ Sr^{2+} concentrations were rinsed in deionized water for 3 x 10 minutes to remove the non-crystallized ions. Transfer of the pellets in HCl 0.2M (2 mL) for 24 hours led to a complete dissolution of calcium/phosphate crystals. Calcium was dosed on a Modular spectrometer (Roche diagnostics, Meylan, France) by colorimetry with cresol phtaleine complexon and phosphate was dosed by colorimetry with ammonium phosphomolybdate. Sr^{2+} was dosed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) on a Jobin Yvon JY 238 Ultrace (HORIBA JOBIN-YVON, Longjumeau, France). Each measure was performed on 3 pellets incubated in the same conditions.

5. FTIR analysis

Mineralized pellets were dried in oven during 24h at 37 °C. Fourier Transformed Infra-Red (FTIR) analysis was performed to characterize the calcospherites formed on the pHEMA substrates. Spectra in a range of 950-4000 cm^{-1} were recorded at 32 scans per spectrum at 8 cm^{-1} resolution using a Bruker Hyperion 3000 scan microscope (Bruker) with a single element Mercury Cadmium Telluride (MCT) detector. Infrared spectra were recorded in the reflexion mode. A background spectrum was collected, containing data from the environment, the instrument and the optical discs. Dried mineralized pHEMA pellets were disposed on the spectrometer and spectra were done on 3 samples from 0, 130, 260 and 390 $\mu\text{mol/L}$ of Sr^{2+} concentrations. Five different areas were analyzed on each sample and a mean spectrum was obtained for each concentration with the Bruker's proprietary Opus Software (release 5.5).

6. Raman analysis

Raman microspectroscopy was performed on a Senterra microscope (Bruker Optik, also working with the Opus software). The excitation laser wavelength was 785 nm. The long working distance of the 20x microscope objective gave a spot size in the order of 2 μm . Automatic baseline correction removed residual fluorescent background, resulting in fluorescent-free spectra. Dried mineralized pHEMA pellets were disposed on the spectrometer and spectra were done on 3 samples prepared with 0, 130, 260 and 390 $\mu\text{mol/L}$ of Sr^{2+} concentrations. Five different areas were analyzed on each sample and a mean spectrum was realized for each concentration.

7. X-ray diffraction

X-ray diffraction was used to characterize mineral deposits on the pellets. Dried mineralized pellets were rapidly moistened with water and pressed under a pressure of 2 bars to obtain a very flat sample. Flat pellets were placed onto a metallic support and examined with a D8 X-ray diffractometer with Cu K α cathode (Bruker, France). The spectra were recorded at room temperature between 20 and 56° corresponding to 2 θ and a measure was performed every 0.2°. Parameters a and c of the crystal unit cell were calculated (Farlay *et coll.*, 2005).

8. Strontium desorption measurement

Once pellets have been incubated with Sr²⁺, they were rapidly rinsed in saline to remove the non-crystallized ions and placed in sterile tubes containing 2mL of saline. tubes were placed with a gentle agitation at 37 °C. The supernatant was collected and changed after 1, 4, 8, 16, 32, 48 and 61 days and Sr²⁺, Ca²⁺ and P released in the saline were dosed. Four pellets were incubated for each period and the analysis was done twice.

9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Systat 11 statistical software (Systat Software, Inc., San Jose, CA). All data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). The frequency distribution of calcospherite size for each sample was assessed; if the distribution was lognormal, data were converted to logarithmic values and differences between groups were analyzed by ANOVA with a post-hoc test (Fisher's least significant difference). Differences were considered as significant when $p < 0.05$. Determination of equations of Sr²⁺ release was computed with TableCurve (Systat Software) and the best fit values were retained.

3. RESULTS

1. Calcification of pHEMA pellets

After one week of incubation, SEM showed the formation of round nodules on the pHEMA-CM surface (Fig. 2). Mineralized nodules had a rounded shape (calcospherites) and were made of elementary tablets or plates of HAP packed together. After 2 weeks of incubation in presence of Sr^{2+} in the BF, the size of calcospherites decreased slightly but significantly ($p < 0.0001$) when Sr^{2+} concentration increased (Fig. 3). Calcospherites were significantly smaller in BF with 260 and 390 $\mu\text{mol/L}$ of Sr^{2+} than with 130 $\mu\text{mol/L}$ (respectively, $p < 0.05$ and $p < 0.001$).

2. Chemical analysis

After dissolution of the calcospherites formed on the pellets, Sr^{2+} , Ca^{2+} and PO_4^{3-} amounts appear on Fig. 4. The amount of Sr^{2+} fixed in the calcospherites significantly paralleled Sr^{2+} concentration in BF. A negligible amount of Sr^{2+} was detected in calcospherites formed in BF without Sr^{2+} , corresponding to the resolution of the dosage method. Ca^{2+} and PO_4^{3-} content in calcospherites did not vary when Sr^{2+} concentration increased in BF.

3. FTIR analysis

All FTIR spectra of dried pellets were similar (Fig. 5). Whatever the Sr^{2+} concentration in BF, a broad peak of $\nu_3 \text{PO}_4$ was observed at 1150 cm^{-1} and a weaker peak at 960 cm^{-1} , representing $\nu_1 \text{PO}_4$ (Antonakos *et coll.*, 2007). All spectra showed peaks at 1470 and 880 cm^{-1} , corresponding to stretching vibrations of CO_3^{2-} . The peak observed at 1750 cm^{-1} was affected to the $-\text{COOH}$ function which came from the carboxymethylation of the pellets.

4. Raman analysis

On the raman spectra (Fig. 6), ν_1 , ν_2 , ν_4 and ν_3 of PO_4^{3-} were observed respectively at 960 cm^{-1} , 400-500 cm^{-1} , 550- 650 cm^{-1} and 1000-1100 cm^{-1} (Ou-Yang *et coll.*, 2000; Koutsopoulos, 2002; Zou *et coll.*, 2005). All spectra presented the ν_2 band of CO_3^{2-} at 879 cm^{-1} (Koutsopoulos, 2002; Zou *et coll.*, 2005). This peak was overlapped on the HPO_4^{2-} peak (Penel *et coll.*, 1998).

5. X-ray diffraction

Table 1 showed the variation of a and c crystal parameters with the Sr^{2+} concentrations in BF. The lengths of the a and c axes did not vary significantly whatever the Sr^{2+} concentration in BF.

6. Clearance of Sr^{2+}

Whatever the Sr^{2+} concentration in BF to allow the growth of calcospherites, the curves had the same shape (Fig. 7). Until 8 days, the desorption of Sr^{2+} was important, around 20% of the incorporated Sr^{2+} . After 8 days, the slope of the curve was slower and a 30% release of Sr^{2+} was obtained after 61 days. There were several equations fitting with the measured values during the range of the experiment, however, some provided aberrant curves when one tempted to extrapolate to prolonged times. Finally, the best equations that were retained took into account the correlation coefficient (R^2) and a rational shape of curve during prolonged times. Fig. 8 depicts the shape of 3 relevant equation applied to calcospherites grown with 130 μM of Sr^{2+} . The best-fit equations are shown in Table 2. Whatever the equation, the time necessary to eluate 50% of Sr^{2+} was calculated and ranged between 147 and 740 days.

4. DISCUSSION

The efficacy of Sr^{2+} in post menopausal osteoporosis treatment has been proven in a large number of studies (Meunier *et coll.*, 2002; Meunier *et coll.*, 2004; Reginster *et coll.*, 2005). Our study aimed to observe the effect of Sr^{2+} on the formation of hydroxyapatite which constitutes the main phase of the bone mineral in an *in vitro* system that do not imply cell or protein intervention in a biomimetic approach (Barrère *et coll.*, 1999). This procedure was originally developed in our laboratory and consisted in initiating the calcospherites growth on pHEMA pellets with immobilized alkaline phosphatase (Filmon *et coll.*, 1996). We further reported that carboxymethylation (which grafts -COOH groups on the pHEMA surface) was sufficient to initiate HAP nucleation and calcospherites deposition (Filmon *et coll.*, 2002). Carboxylic groups can attract Ca^{2+} cations and initiate calcium-phosphate precipitation into HAP and reproduce the effects of biological molecules such as BSP known to induce bone calcification *in vivo* (Hunter *et coll.*, 1996; Gordon *et coll.*, 2007). This *in vitro* model has been extensively used to characterize the effect of pharmacological drugs, metallic ions or proteins known to interfere with bone calcification (Filmon *et coll.*, 2000; Guggenbuhl *et coll.*, 2008; Libouban *et coll.*, 2009; Mabilieu *et coll.*, 2009). In this study, CM-pHEMA pellets were used and FTIR assessment confirmed the presence of HAP at the pellet's surface (Antonakos *et coll.*, 2007).

In vivo, Sr^{2+} level in the bone structure units vary at the end of the treatment according to the bone site (Dahl *et coll.*, 2001). Higher amounts of Sr^{2+} are found in cancellous than in cortical bone and an higher concentration is observed in newly-formed bone packets. In addition, it has been shown that Sr^{2+} is dose-dependently taken up by the mineral phase of the bone matrix (Boivin *et coll.*, 1996), but only one Sr^{2+} ion is incorporated for 10 Ca^{2+} in the crystal

lattice (Marie *et coll.*, 2001). In this study, Sr²⁺ incorporation into the calcospherites increased as a function of its concentration in BF. The calcospherites formed were similar in form and size to those formed *in vivo* in human woven bone {Filmon, 2000 #23}. Incorporation of Sr²⁺ in HAP did not affect the crystal parameters as shown by others in *in vitro* studies (Christoffersen *et coll.*, 1997; Li *et coll.*, 2007). In a monkey study, variations of parameters a and c were not significant between control and animals receiving a 13-week treatment with high doses SrRan (Boivin *et coll.*, 1996). Comparisons were made between Sr²⁺ incorporation in the rat, monkey and human bones; it was shown that, whatever the dose administered, Sr²⁺ incorporation in bone did not affect the crystal lattice parameters even if the ionic radius of Sr²⁺ is higher than that of Ca²⁺ (0.113 vs 0.099 nm) (Slat *et coll.*, 1971; Boivin *et coll.*, 1996; Dahl *et coll.*, 2001; Ammann *et coll.*, 2004; Farlay *et coll.*, 2005). In our study, values measured for a and c parameters were very close to those reported for bone mineral (a = b = 0.9432 and c = 0.6881 nm), whatever the Sr²⁺ concentration in BF (Kay *et coll.*, 1964). Furthermore, Sr²⁺ incorporation in calcospherites did not affect crystallinity whatever the Sr²⁺ concentration in BF.

The present study was also designed to study the release of Sr²⁺ from the mineral and we found that 30% of the incorporated Sr²⁺ was released after 61 days. *In vivo* studies done on monkeys have shown a rapid release of strontium after treatment discontinuation (Farlay *et coll.*, 2005). The animals had received a one year treatment with SrRan at 200, 500, 1250 mg/kg/day orally doses (giving up to 3 times the plasma Sr²⁺ level seen at therapeutic dose in human); 10 weeks after the arrest of the treatment, the iliac crest bone Sr²⁺ content was decreased by 50% when measured by X-ray microanalysis and quantitative microradiography. It has been shown in postmenopausal women treated by SrRan during 4 years that bone mineral density (BMD) had increased by ~15% vs baseline (Meunier *et coll.*, 2009). In one arm of the SOTI study, SrRan was discontinued after 4 years while other patients continued

the treatment during a 5th year. A significant decrease of BMD progressively occurred in the untreated arm. This observation indicates that BMD decreases as a consequence of Sr²⁺ elimination leading. A recent study aimed to investigate bone Sr²⁺ content during and after treatment discontinuation by DXA and DPA (dual photon absorptiometry) (Barenholdt *et coll.*, 2009). They have used a mathematical model based on radioactive radium elution (Marshall, 1969). However, the ionic radius of radium is 0.215 nm which is twice that of Ca²⁺ or Sr²⁺ radius, making their data not comparable. Moreover, radioactive radium has a short half life whereas the bone remodeling cycle takes approximately 120 days and the use of long-lived stable radioisotope such as ⁴¹Ca would have been more appropriate (Lin *et coll.*, 2004). In our model incorporation of Sr²⁺ was used with concentrations that corresponded to 1x, 2x and 3x values reached in the serum of patients receiving a SrRan for the treatment of post-menopausal osteoporosis (Meunier *et coll.*, 2004).

The spontaneous release of Sr²⁺ occurred in this model and followed a typical elution curve. However, the results markedly differ from those obtained in *in vivo* studies which indicate that much more Sr²⁺ is released. This can be explained by considering that our *in vitro* model did not take into account a possible exchange pool of strontium linked to proteins and that no cellular event are present *in vitro*. The calcospherites grown on CM-pHEMA pellets released Sr²⁺ that was faintly linked to crystals by ionic substitution. It is likely that bone remodeling and the *in vivo* environment accelerate the Sr²⁺ release process by additional mechanisms such as matrix resorption by osteoclasts. The present study also confirmed by X-ray analysis that the uptake of Sr²⁺ preserved bone crystallinity and characteristics of crystal units. These findings corroborate previous studies suggesting that Sr²⁺ is mainly incorporated by ion exchange onto the crystal surface and can be released upon time.

Acknowledgments

This work was made possible by grants from Contrat de Plan Etat – Région “Pays de la Loire” Bioregos. SEM analyses were performed at Service Commun d’Imagerie et d’Analyses Microscopiques (SCIAM), Université d’Angers with many thanks to Romain Mallet and Sonia Georgeault. DRX analyses were performed at CIMA Laboratory, Université d’Angers with Magali Allain. Ion measurements were performed at the Pharmacology and Biochemistry Laboratories - CHU of Angers.

REFERENCES

1. Marie PJ (2005) Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int* 16 Suppl 1:S7-10
2. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P (2008) Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 42:129-138
3. Buehler J, Chappuis P, Saffar JL, Tsouderos Y, Vignery A (2001) Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 29:176-179
4. Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ (1996) The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 18:517-523
5. Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, Tsouderos Y (1993) An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res* 8:607-615
6. Marie PJ (2006) Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr Opin Rheumatol* 18 Suppl 1:S11-15
7. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 350:459-468
8. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A, Goemaere S, Sorensen OH, Felsenberg D, Meunier PJ (2005) Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2816-2822
9. Seeman E, Vellas B, Benhamou C, Aquino JP, Semler J, Kaufman JM, Horszowski K, Varela AR, Fiore C, Brixen K, Reginster JY, Boonen S (2006) Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res* 21:1113-1120
10. Choudhary S, Halbout P, Alander C, Raisz L, Pilbeam C (2007) Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J Bone Miner Res* 22:1002-1010
11. Choudhary S, Wadhwa S, Raisz LG, Alander C, Pilbeam CC (2003) Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 18:1813-1824
12. Zhu LL, Zaidi S, Peng Y, Zhou H, Moonga BS, Blesius A, Dupin-Roger I, Zaidi M, Sun L (2007) Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochem Biophys Res Commun* 355:307-311

13. Baron R, Tsouderos Y (2002) In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 450:11-17
14. Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, Kamel S, Terwilliger EF, Brazier M, Brown EM (2006) The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J* 20:2562-2564
15. Caverzasio J (2008) Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* 42:1131-1136
16. Marie PJ (2010) The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 46:571-576
17. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Alvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG (2009) Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 24:153-161
18. Coulombe J, Faure H, Robin B, Ruat M (2004) In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1184-1190
19. Fromigué O, Hajj E, Barbara A, Petrel C, Traiffort E, Ruat M, Marie PJ (2009) Calcium sensing receptor-dependent and -independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *J Cell Mol Med* 13:2189-2199
20. Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, Findlay DM (2009) Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int* 20:653-664
21. Pors Nielsen S (2004) The biological role of strontium. *Bone* 35:583-588
22. Boivin G, Meunier PJ (2003) The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3:S19-24
23. Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, Lorenc R, Pors-Nielsen S, De Vernejoul MC, Roces A, Reginster JY (2002) Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2060-2066
24. Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, Allain P, Tsouderos Y, Meunier PJ (1996) Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 11:1302-1311
25. Filmon R, Grizon F, Baslé MF, Chappard D (2002) Effects of negatively charged groups (carboxymethyl) on the calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *Biomaterials* 23:3053-3059
26. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabilieu G, Baslé MF, Chappard D (2008) Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 57:903-910

27. Yamada S, Nakamura T, Kokubo T, Oka M, Yamamuro T (1994) Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic by a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res - Part A* 28:1357-1363
28. Farlay D, Boivin G, Panczer G, Lalande A, Meunier PJ (2005) Long-term strontium ranelate administration in monkeys preserves characteristics of bone mineral crystals and degree of mineralization of bone. *J Bone Miner Res* 20:1569-1578
29. Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T (2007) Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 28:3043-3054
30. Koutsopoulos S (2002) Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res* 62:600-612
31. Ou-Yang H, Paschalis EP, Boskey AL, Mendelsohn R (2000) Two-dimensional vibrational correlation spectroscopy of in vitro hydroxyapatite maturation. *Biopolymers* 57:129-139
32. Zou S, Huang J, Best S, Bonfield W (2005) Crystal imperfection studies of pure and silicon substituted hydroxyapatite using Raman and XRD. *J Mater Sci-Mater Med* 16:1143-1148
33. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E (1998) MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int* 63:475-481
34. Barrère F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K (1999) Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg²⁺ and HCO₃. *Bone* 25:107S-111S
35. Filmon R, Chappard D, Monthéard JP, Baslé MF (1996) A composite biomaterial: Poly 2(hydroxyethyl) methacrylate / alkaline phosphatase initiates mineralization in vitro. *Cell Mater* 6:11-20
36. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA (2007) Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 41:462-473
37. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317 (Pt 1):59-64
38. Filmon R, Baslé MF, Barbier A, Chappard D (2000) Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: a composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process. *J Biomater Sci Polym Ed* 11:849-868
39. Libouban H, Filmon R, Mauréac A, Baslé MF, Chappard D (2009) Fetuin and osteocalcin interact with calcospherite formation during the calcification process of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in vitro: A Raman microspectroscopic monitoring. *J Raman Spectrosc* 40:1234-1239
40. Mabileau G, Filmon R, Petrov PK, Baslé MF, Sabokbar A, Chappard D (2009) Cobalt, chromium and nickel affect hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Acta Biomater* DOI 10.1016/j.actbio.2009.10.035:

41. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C (2001) Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 28:446-453
42. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C (2001) Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 69:121-129
43. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, Barenholdt O (1997) Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 20:47-54
44. Li ZY, Lam WM, Yang C, Xu B, Ni GX, Abbah SA, Cheung KM, Luk KD, Lu WW (2007) Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* 28:1452-1460
45. Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R (2004) Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res* 19:2012-2020
46. Slat B, Kostial K, Harrison GE (1971) Reduction in the absorption and retention of strontium in rats. *Health Phys* 21:811-814
47. Kay MI, Young RA, Posner AS (1964) Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature* 204:1050-1052
48. Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Diaz-Curiel M, Compston J, Marquis P, Cormier C, Isaia G, Badurski J, Wark JD, Collette J, Reginster JY (2009) Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 20:1663-1673
49. Barenholdt O, Kolthoff N, Nielsen SP (2009) Effect of long-term treatment with strontium ranelate on bone strontium content. *Bone* 45:200-206
50. Marshall JH (1969) The power function model. In Comar CL, Bronner, F. (ed) *Mineral Metabolism, and Advance Treatise*. Academic Press, New York and London.
51. Lin Y, Hillegonds DJ, Gertz ER, Van Loan MD, Vogel JS (2004) Protocol for assessing bone health in humans by tracing long-lived ⁴¹Ca isotope in urine, serum, and saliva samples. *Anal Biochem* 332:193-195

Legends of Figures

Figure 1: Flow chart of the study. Pellets of CM-pHEMA were immersed in BF during 1 week to initiate calcification, then Sr^{2+} ions were added during 2 weeks in the BF (3 different concentrations). One part of the pellets was analyzed and others were used for Sr^{2+} elution. Saline was analyzed at day 1, 4, 8, 16, 32, 48 and 61. At day 61, pellets were dried and analyzed for calcospherite morphology and composition.

Figure 2: Calcospherite formation and growth at the pellet surfaces. A) the growth of calcospherites starts at the surface of the polymer; B) calcospherite grown in presence of Sr^{2+} ions during 2 weeks.

Figure 3: Calcospherite diameter and Sr^{2+} concentrations in body fluid. With increasing Sr^{2+} concentration, calcospherite decreased slightly in diameter.

Figure 4: Amounts of (A) Sr^{2+} , (B) calcium and (C) phosphate measured in the calcospherites after the incubation period. The Sr^{2+} amount increased with the Sr^{2+} concentration in BF whereas calcium and phosphate did not vary.

Figure 5: Infra-red spectra of mineralized pellets after incubation in BF. Broad peak of ν_3 PO_4^{3-} was observed at 1150 cm^{-1} and a weaker peak at 960 cm^{-1} , representing ν_1 PO_4^{3-} . All spectra showed peaks at 1470 and 880 cm^{-1} , corresponding to stretching vibrations of CO_3^{2-} .

Figure 6: Raman spectra obtained from pellets incubated in presence of 0, 130, 260 and 390 $\mu\text{mo/L}$ of Sr^{2+} . Note the appearance of the peak at 950 cm^{-1} corresponding to the ν_1 PO_4^{3-} of HAP.

Figure 7: Sr^{2+} desorption from the calcospherites up to 61 days. After 8 days, ~20% of the incorporated Sr^{2+} was eluated, at 61 days: ~30%.

Figure 8: Tablecurve representations of equations 7902, 7102 and 54. Dots are the measurements of eluated Sr^{2+} superposed with curves from 3 different equations with correlation coefficient superior to 0.95. These 3 equations fit with the Sr^{2+} release measurements.

Table 1: Variations of crystal parameters a and c as a function of the Sr^{2+} concentration in BF and of Sr^{2+} amount integrated in calcospherites.

Table 2: Equations fitting with the elution points measured. R^2 is the correlation coefficient, x represents the time and y the Sr^{2+} concentration.

Figure 1

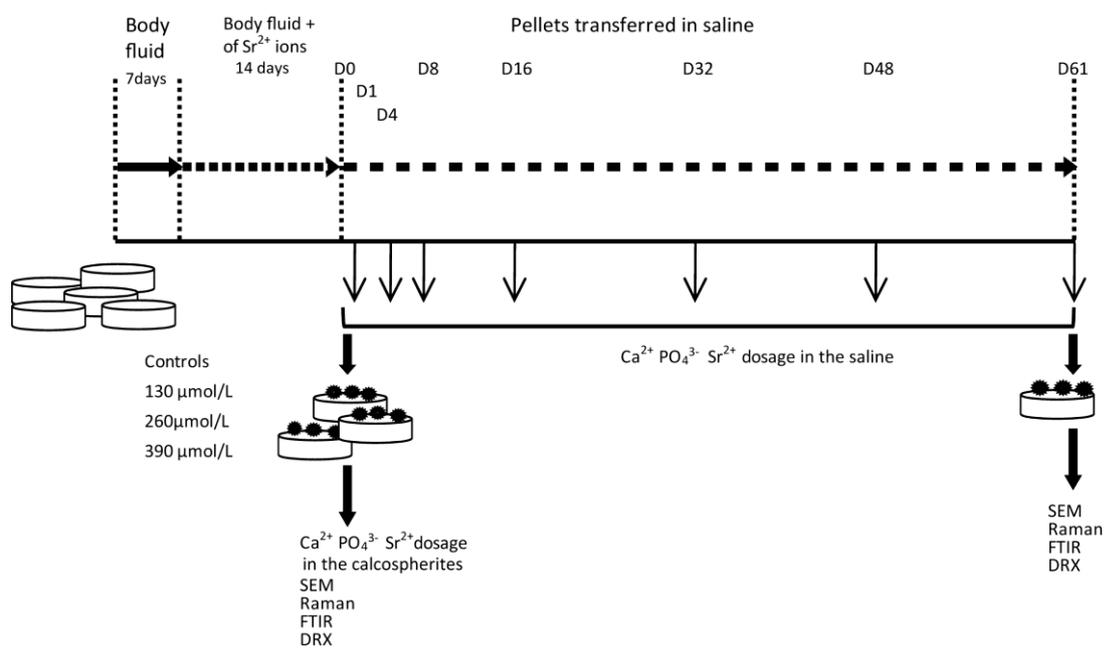


Figure 2

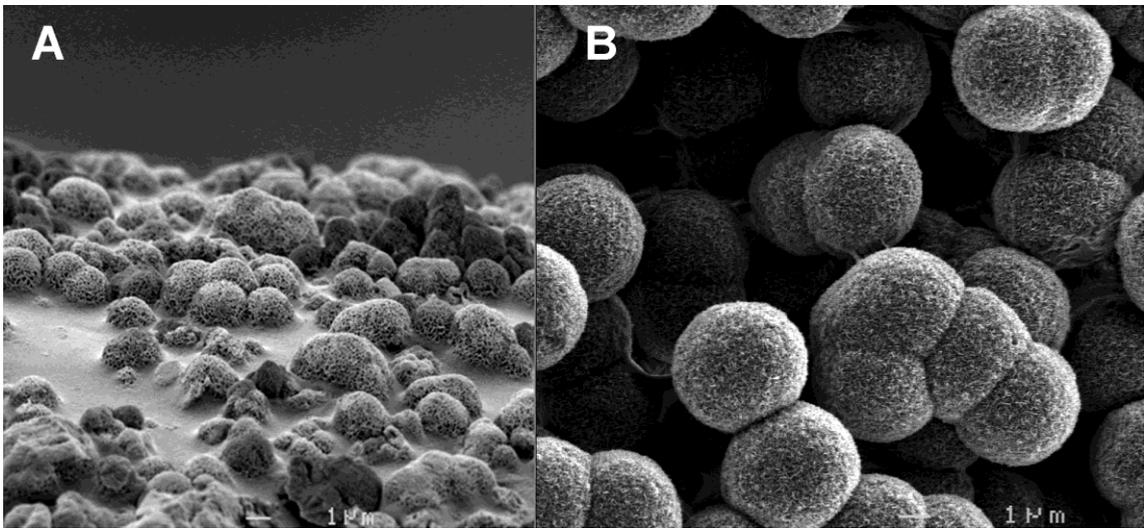


Figure 3

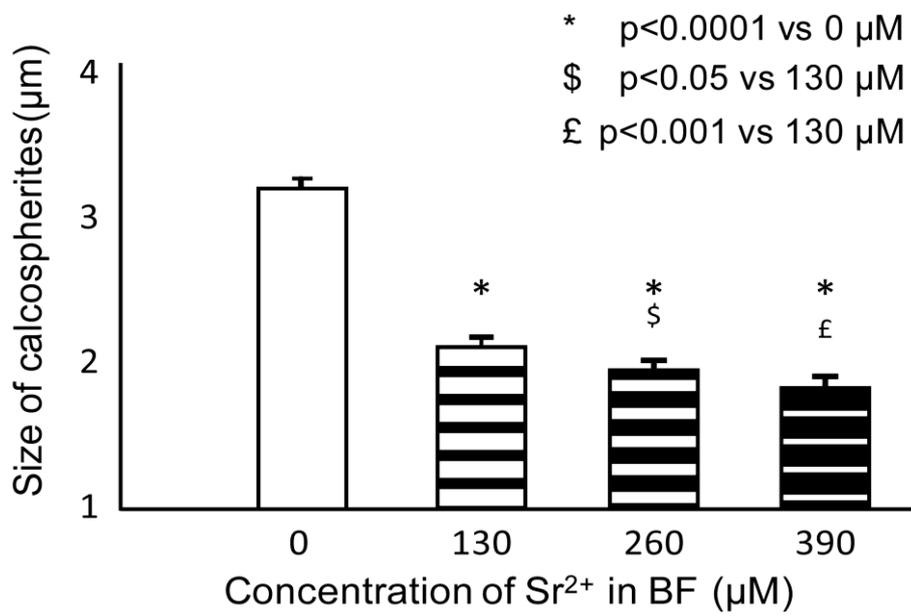


Figure 4

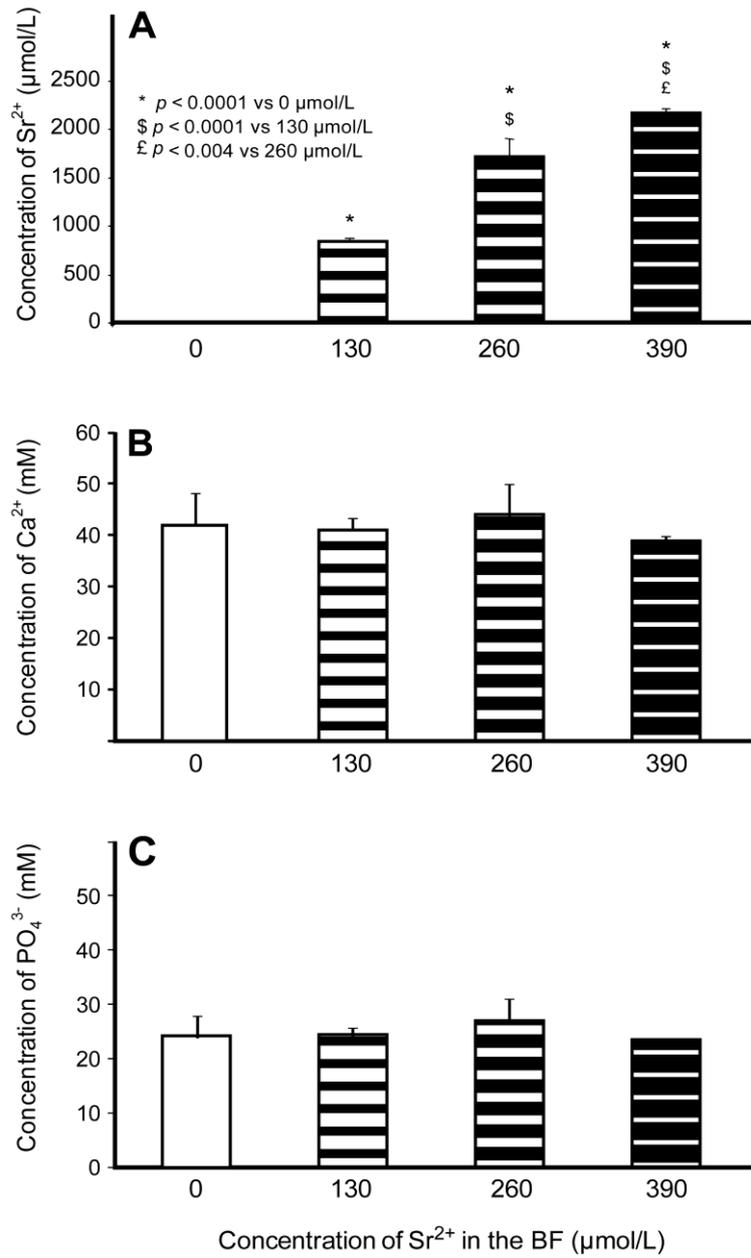


Figure 5

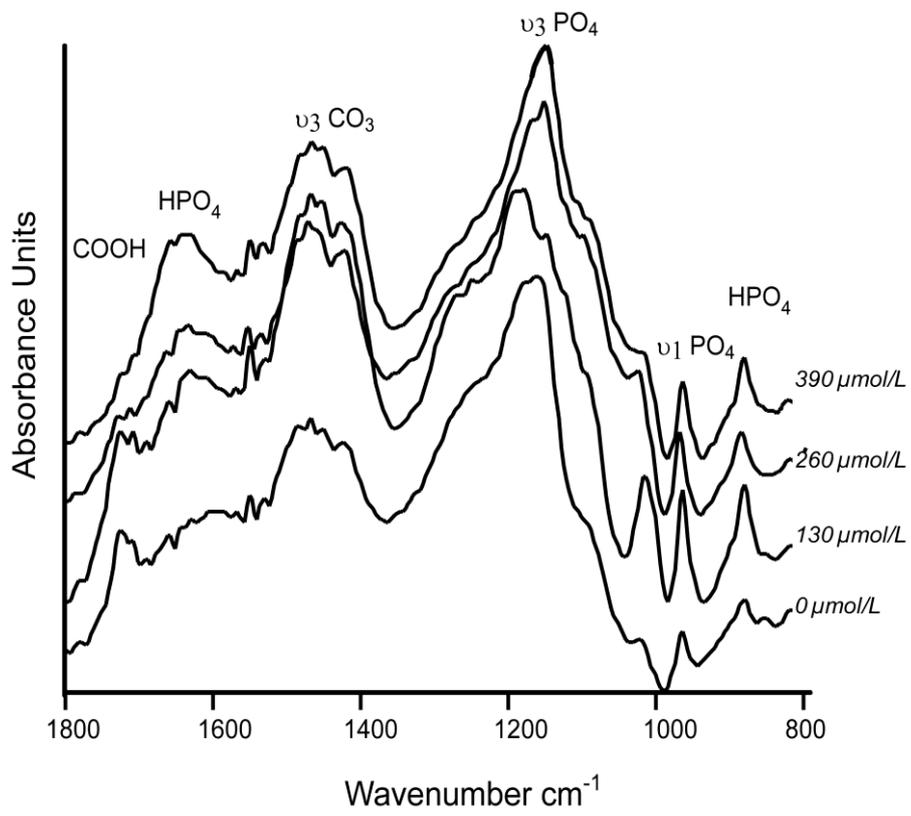


Figure 6

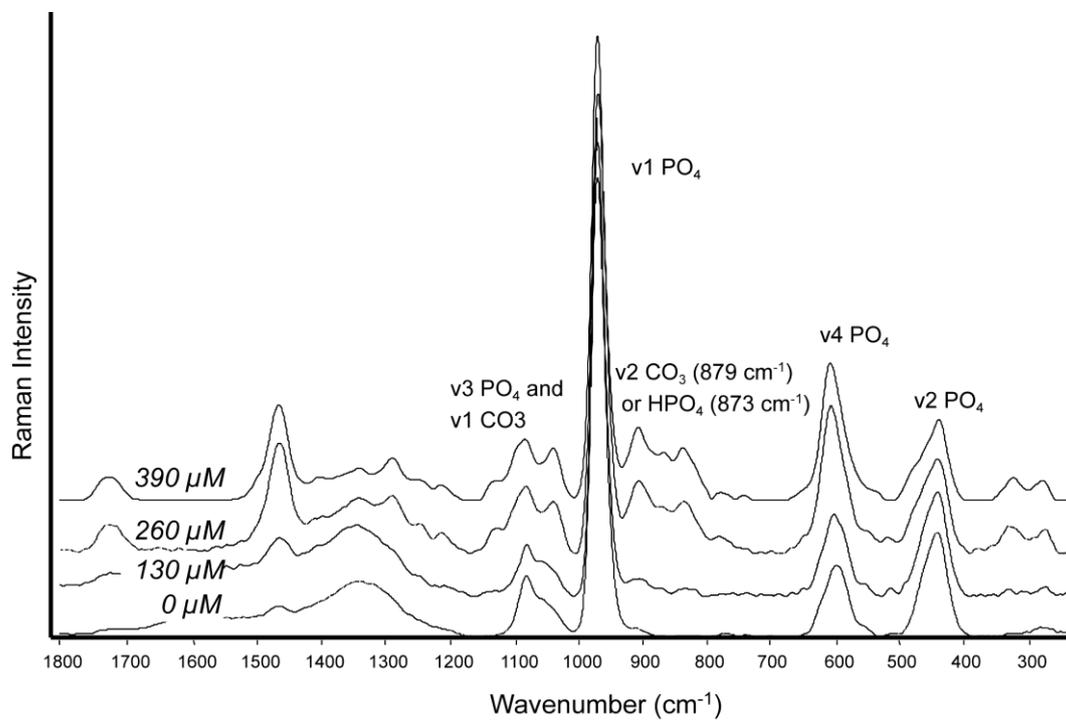


Figure 7

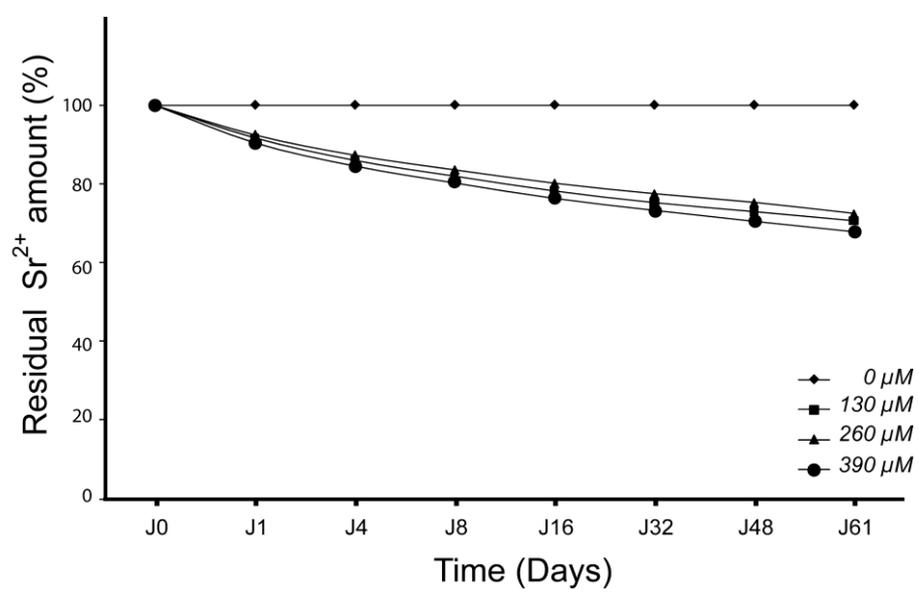


Figure 8

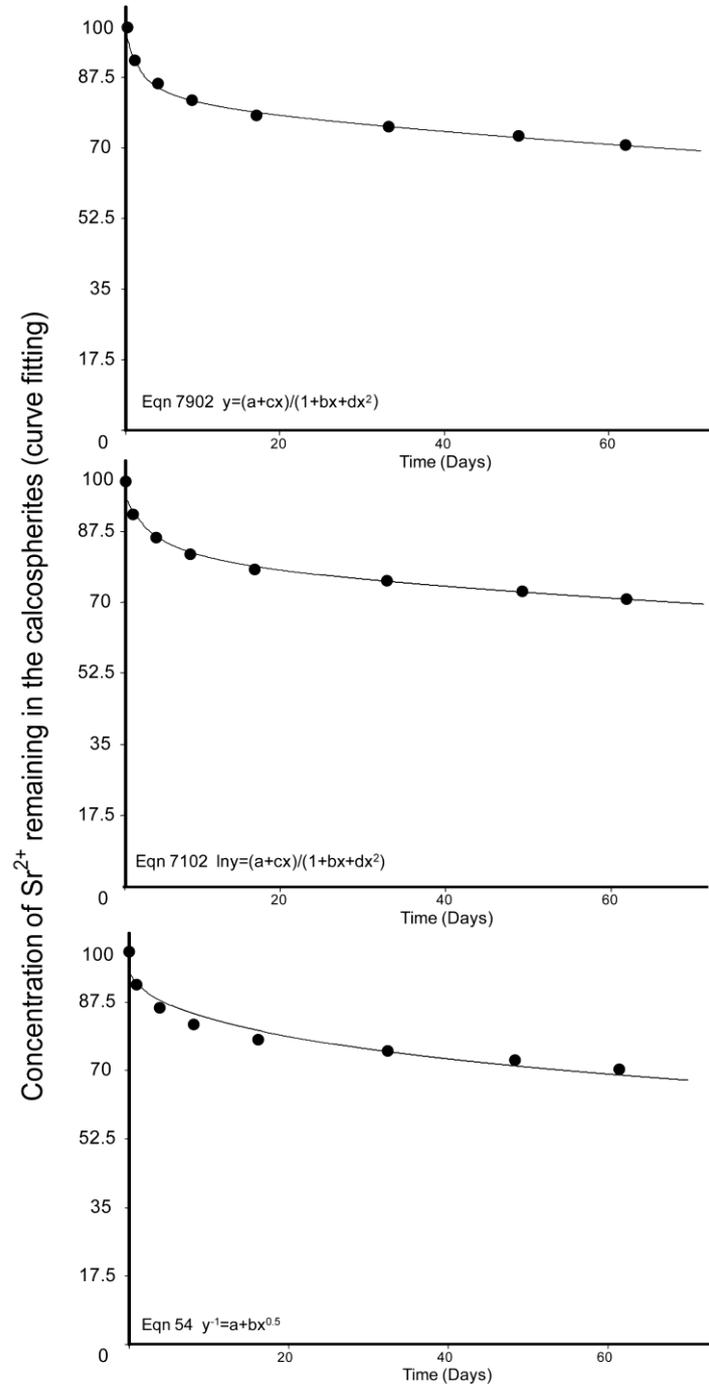


Table 1

Sr²⁺ concentration in BF (μM)	Sr²⁺/Ca²⁺ (% integrated in mineral)	Cristal Parameter c (nm)	Cristal Parameter a (nm)
0	0.0032 ± 0.0001	0.6848 ± 0.003	0.9654 ± 0.0053
130	2.1 ± 0.3	0.6833 ± 0.0006	0.9610 ± 0.0009
260	4.0 ± 0.1	0.6846 ± 0.0066	0.9616 ± 0.0092
390	5.61 ± 0.09	0.6862 ± 0.0019	0.9652 ± 0.0033

Table 2

N° equation in Tablecurve	Equation	R ²	a	b	c	d	x with y=50%
7902	$y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,997457919	99,817	0,5643	44,7616	0,0012	740 days
1384	$\ln y = a+bx^{0,5}+c\exp(-x)$	0,994072254	4,5067	-0,032	0,0118		350 days
1174	$y = a+bx^{0,5}+c\exp(-x)$	0,992983237	89,6197	-2,4905	10,6426		250 days
7102	$\ln y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,984207155	4,5737	0,242	1,0511	9,73E-05	147 days
7112	$y^{0,5} = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,980686618	9,8239	0,2402	2,1041	0,0002	293 days
7002	$y = (a+cx)/(1+bx+dx^2)$	0,972295144	95,7779	0,214	16,2904	0,0003	380 days
54	$y^{-1} = a+bx^{0,5}$	0,958702852	0,01	0,0005			400 days

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La demande en biomatériaux de comblement osseux ou de chirurgie réparatrice est de plus en plus importante mais les matériaux utilisés couramment en site osseux ne remplissent pas toutes les conditions. Le matériau doit être parfaitement biocompatible, ne présenter aucun risque infectieux, être disponible en quantité suffisante, être ostéoconducteur et idéalement ostéoinducteur. Pour améliorer les propriétés d'un biomatériau ou le rendre bioactif, le biomimétisme permet de se rapprocher toujours plus des propriétés physiologiques du tissu osseux.

Au cours de ce travail, nous avons axé nos recherches sur l'élaboration et la caractérisation de biomatériaux biomimétiques, en étudiant les comportements cellulaires au contact d'un biomatériau, ainsi que l'adhésion, la colonisation et la minéralisation. Les propriétés de biomimétisme ont aussi permis d'étudier l'incorporation et l'élution des ions Sr^{2+} dans un modèle de minéralisation *in vitro*.

Comportements cellulaires au contact d'un biomatériau biomimétique

Une première étude nous a permis d'étudier l'adhésion et la minéralisation de cellules osteoblast-like sur une surface de Ti recouverte de fonctions RGD en utilisant un acide bisphosphonique comme système d'ancrage. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la société Surfactis qui a développé le revêtement RGD-bisphosphonate. Nous avons montré que ce revêtement tendait à améliorer l'adhésion cellulaire à très court terme. D'autre part, ce revêtement a permis d'induire de façon précoce la minéralisation sur les échantillons recouverts de RGD comparé à une surface de Ti sans revêtement. La cinétique de minéralisation réalisée sur 18 jours a mis en évidence une augmentation significative de la surface recouverte par la minéralisation sur les échantillons possédant un revêtement RGD de concentration 10^{-10} M comparé à une concentration de 10^{-4} M ou au Ti seul.

Dans une deuxième étude nous avons mis au point une méthode d'observation des comportements cellulaires en culture autonome sur du long terme par vidéomicroscopie. Des cellules osteoblast-like, des macrophages (J774.2) et des macrophages péritonéaux de souris ont été mis en culture avec des particules de β -TCP dans une chambre de culture où le milieu était changé toutes les 5 heures, sous un microscope à épi-illumination dans une enceinte

thermostatée. Sur les vidéos réalisées pendant les périodes de culture de 8 jours, les ostéoblastes ont beaucoup proliféré en direction des particules de β -TCP. Ils ont colonisé les particules et se sont étalés à leur surface. Les macrophages n'ont pas ou très peu proliféré, ni fusionné. En revanche, les cellules sont venues au contact des particules de β -TCP, ce qui a entraîné le déplacement des particules. Les cellules ont ensuite colonisé les particules en se fixant à leur surface et en s'y étalant. Enfin, les macrophages péritonéaux de souris se sont montrés capables de dégrader le β -TCP en érodant la surface du biomatériau.

Elaboration et caractérisation d'un biomatériau biomimétique

En collaboration avec le laboratoire CIMA (Faculté des Sciences, Angers), nous avons développé un matériau biomimétique basé sur la calcification de nanotubes de carbone fonctionnalisés. Les dimensions des nanotubes de carbone sont très proches des dimensions des fibrilles de collagène. Une fois les nanotubes dispersés en milieu aqueux, ils imitent la structure microfibrillaire du collagène et représentent un arrangement 3D comparable aux fibres de collagène déposées dans le woven bone. Dans notre étude, les nanotubes ont été purifiés et/ou très fortement oxydés créant ainsi des fonctions $-\text{COOH}$ à la surface des nanotubes. Ils ont ensuite été plongés pendant deux semaines dans un milieu synthétique mimant les fluides extracellulaires. Les analyses XPS et Raman ont montré la présence des fonctions $-\text{COOH}$ sur les nanotubes. Les fonctions carboxylées ont permis d'induire la précipitation de phosphates de calcium sous la forme de nodules ronds (calcosphérites). Les observations en MEB et les analyses en spectroscopie FTIR et EDX ont permis de constater que les calcosphérites étaient composés d'un assemblage d'aiguilles d'HAP. Les nanotubes qui n'ont pas subi le processus d'oxydation n'ont pas permis la nucléation de cristaux d'HAP à leur surface.

Un modèle de minéralisation *in vitro* sur le pHEMA développé dans notre laboratoire et basé sur le même principe de fonctionnalisation que les nanotubes, nous a permis d'étudier l'influence de l'intégration du Sr^{2+} sur la formation du minéral osseux et son élution durant 2 mois. Les analyses chimiques (réalisées en collaboration avec les laboratoires de Biochimie et de Pharmacologie du CHU d'Angers) ont montré que le Sr^{2+} s'incorporait de façon dose dépendante dans le minéral formé sans induire de modification dans les concentrations en calcium et phosphate contenus dans les calcosphérites. Les analyses effectuées en spectroscopie Raman et FTIR ont permis de montrer que le minéral formé à la surface du

pHEMA était de l'HAP comparable à celui qui se forme dans le woven bone. Enfin, les mesures réalisées en diffraction à rayon X ont montré que l'incorporation du Sr^{2+} dans le minéral n'induisait pas de modification des paramètres cristallographiques du cristal d'HAP. L'éluion du Sr^{2+} durant 2 mois a été étudiée en plaçant les échantillons dans une solution saline, prélevée et analysée à intervalles réguliers. Avec ce modèle de minéralisation *in vitro* et acellulaire, nous avons montré que la quantité de Sr^{2+} contenue dans le minéral déposé diminuait rapidement (environ de 20 %) durant les 2 premières semaines pour atteindre un palier. 30 % du Sr^{2+} intégré dans les calcosphérites a été libéré par éluion passive après 8 semaines, suggérant que le Sr^{2+} est principalement incorporé par échange d'ions à la surface du cristal.

Perspectives envisagées

La technique de vidéomicroscopie développée lors de cette thèse va permettre l'étude des comportements cellulaires au contact de biomatériaux ou l'influence de molécules thérapeutiques sur les comportements cellulaires. Cette technique peut notamment permettre de visualiser la colonisation d'un biomatériau opaque, grâce à l'épi-fluorescence et à l'utilisation d'une lignée ostéoblastique dans laquelle le gène codant pour la green fluorescent protein (GFP) a été introduite. Cette protéine fluoresçant dans le vert est issue de la méduse *Aequorea victoria* et est diffusible dans tout le cytoplasme. Une prochaine étude en vidéomicroscopie va être réalisée sur des plaques de Ti recouverte à moitié de BP-RGD (en collaboration avec la société Surfactis) pour analyser les déplacements cellulaires à partir des séquences vidéo réalisées sur une longue période de culture.

Le nouveau biomatériau biomimétique développé ici, à partir de la calcification des nanotubes du carbone, pourra être testé *in vitro* au contact de cellules ostéoblastiques pour voir si le système biomimétique peut favoriser la minéralisation. D'autre part, le laboratoire dispose de différents modèles animaux de defect osseux sur lesquels il serait possible de tester l'efficacité de ce biomatériau en tant que matériau de comblement osseux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.S. Posner, A. P., A.F. Diorio (1958). "Refinement of the hydroxyapatite structure." Acta Cryst **11**: p. 308.
- Abraham, L. C., E. Zuena, et al. (2008). "Guide to collagen characterization for biomaterial studies." J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. **87**(1): 264-285.
- Adler, S. et H. R. Brady (1999). "Cell adhesion molecules and the glomerulopathies." Am J Med **107**(4): 371-386.
- Ahdjoudj, S., F. Lasmoles, et al. (2002). "Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma." J Bone Miner Res **17**(4): 668-677.
- Ajayan, P. M. (1999). "Nanotubes from Carbon." Chem Rev **99**(7): 1787-1800.
- Ajayan, P. M., J. Charlier, et al. (1999). "Carbon nanotubes: from macromolecules to nanotechnology." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96**(25): 14199-14200.
- Akasaka, T., A. Yokoyama, et al. (2010). "Thin films of single-walled carbon nanotubes promote human osteoblastic cells (Saos-2) proliferation in low serum concentrations." Materials Science and Engineering C.
- Akkus, O., F. Adar, et al. (2004). "Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone." Bone **34**(3): 443-453.
- Albee, F. H. (1920). "Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis." Ann Surg **71**(1): 32-39.
- Albelda, S. M., C. W. Smith, et al. (1994). "Adhesion molecules and inflammatory injury." FASEB J **8**(8): 504-512.
- Albrektsson, T., P. I. Branemark, et al. (1981). "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man." Acta Orthop Scand **52**(2): 155-170.
- Albrektsson, T. et C. Johansson (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration." Eur Spine J **10 Suppl 2**: S96-101.
- Ammann, P., I. Badoud, et al. (2007). "Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength." J Bone Miner Res **22**(9): 1419-1425.
- Ammann, P., V. Shen, et al. (2004). "Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats." J Bone Miner Res **19**(12): 2012-2020.
- Anderson, G. L., M. Limacher, et al. (2004). "Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial." JAMA **291**(14): 1701-1712.
- Anderson, H. C. (1969). "Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage." J Cell Biol **41**(1): 59-72.
- Anderson, H. C. (1989). "Mechanism of mineral formation in bone." Lab. Invest. **60**(3): 320-330.
- Anderson, H. C. (1995). "Molecular biology of matrix vesicles." Clin Orthop Relat Res(314): 266-280.
- Anderson, H. C. (2003). "Matrix vesicles and calcification." Curr Rheumatol Rep **5**(3): 222-226.
- Anderson, H. C., D. Harnay, et al. (2005). "Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice." Am J Pathol **166**(6): 1711-1720.

- Anderson, H. C., J. B. Sipe, et al. (2004). "Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice." *Am J Pathol* **164**(3): 841-847.
- Anselme, K. (2000). "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials* **21**(7): 667-681.
- Anselme, K. et M. Bigerelle (2005). "Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion." *Acta Biomater* **1**(2): 211-222.
- Anselme, K., P. Linez, et al. (2000). "The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour." *Biomaterials* **21**(15): 1567-1577.
- Antonakos, A., E. Liarokapis, et al. (2007). "Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites." *Biomaterials* **28**(19): 3043-3054.
- Aryal, S., S. R. Bhattarai, et al. (2006). "Carbon nanotubes assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite from simulated body fluid." *Mater. Sci. . Eng. A.* **426**(1-2): 202-207.
- Atkins, G. J., K. J. Welldon, et al. (2009). "Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response." *Osteoporos Int* **20**(4): 653-664.
- Auernheimer, J., D. Zukowski, et al. (2005). "Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides." *ChemBiochem* **6**(11): 2034-2040.
- Aybar, B., A. Bilir, et al. (2004). "Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro." *Clin Oral Implants Res* **15**(1): 119-125.
- Babister, J. C., L. A. Hails, et al. (2009). "The effect of pre-coating human bone marrow stromal cells with hydroxyapatite/amino acid nanoconjugates on osteogenesis." *Biomaterials* **30**(18): 3174-3182.
- Bagno, A., A. Piovano, et al. (2007). "Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides." *Bone* **40**(3): 693-699.
- Bain, S. D., C. Jerome, et al. (2009). "Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants." *Osteoporos Int* **20**(8): 1417-1428.
- Balani, K., R. Anderson, et al. (2007). "Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro." *Biomaterials* **28**(4): 618-624.
- Balavoine, F., P. Schultz, et al. (1999). "Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: A first step towards the development of new biosensors." *Angewandte Chemie - International Edition* **38**(13-14): 1912-1915.
- Balcerzak, M., A. Malinowska, et al. (2008). "Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo." *Proteomics* **8**(1): 192-205.
- Baleani, M., M. Viceconti, et al. (2000). "The effect of sandblasting treatment on endurance properties of titanium alloy hip prostheses." *Artif Organs* **24**(4): 296-299.
- Barbara, A., P. Delannoy, et al. (2004). "Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells." *Metabolism* **53**(4): 532-537.
- Barenholdt, O., N. Kolthoff, et al. (2009). "Effect of long-term treatment with strontium ranelate on bone strontium content." *Bone* **45**(2): 200-206.
- Baron, R. et Y. Tsouderos (2002). "In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation." *Eur J Pharmacol* **450**(1): 11-17.
- Barrère, F., P. Layrolle, et al. (1999). "Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg²⁺ and HCO₃⁻." *Bone* **25**(2 Suppl): 107S-111S.
- Beer, J. H., K. T. Springer, et al. (1992). "Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor." *Blood* **79**(1): 117-128.

- Bell, G. I., M. Dembo, et al. (1984). "Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding." Biophys J **45**(6): 1051-1064.
- Bergeret, C., J. Cousseau, et al. (2008). "Spectroscopic evidence of carbon nanotubes' metallic character loss induced by covalent functionalization via nitric acid purification." J. Phys. Chem. C **112**(42): 16411-16416.
- Beuvelot, J., D. Portet, et al. (2009). "In vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD functionalized bisphosphonate." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **90**(2): 873-881.
- Bevilacqua, M. P. et R. M. Nelson (1993). "Selectins." J Clin Invest **91**(2): 379-387.
- Bianco, A., K. Kostarelos, et al. (2005). "Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes." Chem Commun (Camb)(5): 571-577.
- Binkert, C., M. Demetriou, et al. (1999). "Regulation of osteogenesis by fetuin." J Biol Chem **274**(40): 28514-28520.
- Bischoff-Ferrari, H. A., B. Dawson-Hughes, et al. (2004). "Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis." JAMA **291**(16): 1999-2006.
- Blaschuk, O. W. et E. Devemy (2009). "Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy." Eur J Pharmacol **625**(1-3): 195-198.
- Boivin, G., P. Deloffre, et al. (1996). "Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration." J Bone Miner Res **11**(9): 1302-1311.
- Boivin, G. et P. J. Meunier (2003). "The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research." Osteoporos Int **14 Suppl 3**: S19-24.
- Bonnelye, E., A. Chabadel, et al. (2008). "Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro." Bone **42**(1): 129-138.
- Boskey, A. L. (1990). "Bone mineral and matrix. Are they altered in osteoporosis?" Orthop Clin North Am **21**(1): 19-29.
- Boskey, A. L. (2003). "Bone mineral crystal size." Osteoporos Int **14 Suppl 5**: S16-20; discussion S20-11.
- Boskey, A. L., B. D. Boyan, et al. (1997). "Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel." Calcif. Tissue. Int. **60**(3): 309-315.
- Boskey, A. L., S. Gadaleta, et al. (1998). "Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin." Bone **23**(3): 187-196.
- Bowers, K. T., J. C. Keller, et al. (1992). "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro." Int J Oral Maxillofac Implants **7**(3): 302-310.
- Boxus, T., R. Touillaux, et al. (1998). "Synthesis and evaluation of RGD peptidomimetics aimed at surface bioderivatization of polymer substrates." Bioorg Med Chem **6**(9): 1577-1595.
- Boyan, B. D., T. W. Hummert, et al. (1996). "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response." Biomaterials **17**(2): 137-146.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-342.
- Brennan, T. C., M. S. Rybchyn, et al. (2009). "Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate." Br J Pharmacol **157**(7): 1291-1300.
- Brown, E. M. (2003). "Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone?" Osteoporos Int **14 Suppl 3**: S25-34.
- Brown, J. P., R. L. Prince, et al. (2009). "Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal

- women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial." J Bone Miner Res **24**(1): 153-161.
- Buehler, J., P. Chappuis, et al. (2001). "Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*)." Bone **29**(2): 176-179.
- Buser, D., B. Hoffmann, et al. (1998). "Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs." Clin Oral Implants Res **9**(3): 137-150.
- Canalis, E., M. Hott, et al. (1996). "The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro." Bone **18**(6): 517-523.
- Cavallaro, U., S. Liebner, et al. (2006). "Endothelial cadherins and tumor angiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 659-667.
- Caverzasio, J. (2008). "Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms." Bone **42**(6): 1131-1136.
- Chappard, D., M. F. Basle, et al. (2008). "Trabecular bone microarchitecture: a review." Morphologie **92**(299): 162-170.
- Chappard, D., B. Guillaume, et al. (2010). "Sinus lift augmentation and beta-TCP: A microCT and histologic analysis on human bone biopsies." Micron.
- Chaudhuri, P., S. Soni, et al. (2010). "Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma." Nanotechnology **21**(2): 025102.
- Chazono, M., T. Tanaka, et al. (2008). "Electron microscopic study on bone formation and bioresorption after implantation of beta-tricalcium phosphate in rabbit models." J Orthop Sci **13**(6): 550-555.
- Chazono, M., T. Tanaka, et al. (2004). "Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects." J Biomed Mater Res A **70**(4): 542-549.
- Chen, J., M. D. McKee, et al. (1994). "Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin." Histochem. J. **26**(1): 67-78.
- Chen, K., J. Xie, et al. (2009). "Triblock copolymer coated iron oxide nanoparticle conjugate for tumor integrin targeting." Biomaterials **30**(36): 6912-6919.
- Chen, R. J., Y. Zhang, et al. (2001). "Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization." J Am Chem Soc **123**(16): 3838-3839.
- Chen, X., G. S. Lee, et al. (2004). "Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics." Angew Chem Int Ed Engl **43**(45): 6111-6116.
- Cheng, C., K. H. Muller, et al. (2009). "Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells." Biomaterials **30**(25): 4152-4160.
- Chłopek, J., B. Czajkowska, et al. (2006). "In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility." Carbon **44**(6): 1106-1111.
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld, et al. (1997). "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages." Cell **88**(1): 39-48.
- Choudhary, S., P. Halbout, et al. (2007). "Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins." J Bone Miner Res **22**(7): 1002-1010.
- Choudhary, S., S. Wadhwa, et al. (2003). "Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway." J Bone Miner Res **18**(10): 1813-1824.
- Christoffersen, J., M. R. Christoffersen, et al. (1997). "Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection." Bone **20**(1): 47-54.

- Christoffersen, J. et W. J. Landis (1991). "A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo." Anat Rec **230**(4): 435-450.
- Chua, P. H., K. G. Neoh, et al. (2008). "Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion." Biomaterials **29**(10): 1412-1421.
- Coelho, P. G., M. E. Coimbra, et al. (2009). "Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a β -TCP particulate material for bone augmentation." Materials Science and Engineering C **29**(7): 2085-2091.
- Colvin, V. L. (2003). "The potential environmental impact of engineered nanomaterials." Nat Biotechnol **21**(10): 1166-1170.
- Coulombe, J., H. Faure, et al. (2004). "In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor." Biochem Biophys Res Commun **323**(4): 1184-1190.
- Cowles, E. A., M. E. DeRome, et al. (1998). "Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development." Calcif Tissue Int **62**(1): 74-82.
- Craig, W. S., S. Cheng, et al. (1995). "Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals." Biopolymers **37**(2): 157-175.
- Crubezy, E., P. Murail, et al. (1998). "False teeth of the Roman world." Nature **391**(6662): 29.
- Cui, D. (2007). "Advances and prospects on biomolecules functionalized carbon nanotubes." J Nanosci Nanotechnol **7**(4-5): 1298-1314.
- Cui, D., F. Tian, et al. (2005). "Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells." Toxicol Lett **155**(1): 73-85.
- Cummings, S. R., J. San Martin, et al. (2009). "Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis." N Engl J Med **361**(8): 756-765.
- Daculsi, G., N. Passuti, et al. (1990). "Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study." J Biomed Mater Res **24**(3): 379-396.
- Dahl, S. G., P. Allain, et al. (2001). "Incorporation and distribution of strontium in bone." Bone **28**(4): 446-453.
- Dallas, S. L., P. A. Veno, et al. (2009). "Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization dynamics in primary murine osteoblasts and the late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5." Cells Tissues Organs **189**(1-4): 6-11.
- Danen, E. H. et A. Sonnenberg (2003). "Integrins in regulation of tissue development and function." J Pathol **201**(4): 632-641.
- Davoren, M., E. Herzog, et al. (2007). "In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells." Toxicol In Vitro **21**(3): 438-448.
- Degasne, I., M. F. Basle, et al. (1999). "Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces." Calcif Tissue Int **64**(6): 499-507.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, et al. (2009). "The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications." Dev Cell **16**(2): 209-221.
- Delannoy, P., D. Bazot, et al. (2002). "Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice." Metabolism **51**(7): 906-911.
- Deligianni, D. D., N. Katsala, et al. (2001). "Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption." Biomaterials **22**(11): 1241-1251.
- Detsch, R., I. Dieser, et al. (2010). "Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: quantification and cellular response." J Biomed Mater Res A **92**(2): 493-503.

- Dillon, A. C., P. A. Parilla, et al. (2005). "Systematic inclusion of defects in pure carbon single-wall nanotubes and their effect on the Raman D-band." Chemical Physics Letters **401**(4-6): 522-528.
- Dong, J., T. Uemura, et al. (2002). "Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells." Biomaterials **23**(23): 4493-4502.
- Donoghue, A. M. (2005). "Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw." Med J Aust **183**(3): 163-164.
- Dorozhkin, S. V. et M. Epple (2002). "Biological and medical significance of calcium phosphates." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **41**(17): 3130-3146.
- Dorozhkin, S. V. et M. Epple (2002). "Biological and medical significance of calcium phosphates." Angew Chem Int Ed Engl **41**(17): 3130-3146.
- dos Santos, E. A., M. S. Moldovan, et al. (2009). "Oriented hydroxyapatite single crystals produced by the electrodeposition method." Materials Science and Engineering B.
- Dumortier, H., S. Lacotte, et al. (2006). "Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells." Nano. Lett. **6**(7): 1522-1528.
- Durrieu, M. C. (2005). "RGD modified materials: biomaterials for improved cell adhesion." ITBM RBM **26**: 229-237.
- Durrieu, M. C., S. Pallu, et al. (2004). "Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion." J Mater Sci Mater Med **15**(7): 779-786.
- Edwards, S. L., J. S. Church, et al. (2009). "Tubular micro-scale multiwalled carbon nanotube-based scaffolds for tissue engineering." Biomaterials **30**(9): 1725-1731.
- Ellis, G. K., H. G. Bone, et al. (2008). "Randomized trial of denosumab in patients receiving adjuvant aromatase inhibitors for nonmetastatic breast cancer." J Clin Oncol **26**(30): 4875-4882.
- Elmengaard, B., J. E. Bechtold, et al. (2005). "In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants." Biomaterials **26**(17): 3521-3526.
- Espinosa, L., L. Paret, et al. (2002). "Osteoclast spreading kinetics are correlated with an oscillatory activation of a calcium-dependent potassium current." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3837-3848.
- Farlay, D., G. Boivin, et al. (2005). "Long-term strontium ranelate administration in monkeys preserves characteristics of bone mineral crystals and degree of mineralization of bone." J Bone Miner Res **20**(9): 1569-1578.
- Farlay, D., G. Panczer, et al. (2010). "Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral." J Bone Miner Metab.
- Fellah, B. H., N. Josselin, et al. (2007). "Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles." J Mater Sci Mater Med **18**(2): 287-294.
- Ferris, D. M., G. D. Moodie, et al. (1999). "RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo." Biomaterials **20**(23-24): 2323-2331.
- Figueiredo, J. L., M. F. R. Pereira, et al. (1999). "Modification of the surface chemistry of activated carbons." Carbon **37**(9): 1379-1389.
- Filmon, R., M. F. Basle, et al. (2002). "Adherence of osteoblast-like cells on calcospherites developed on a biomaterial combining poly(2-hydroxyethyl) methacrylate and alkaline phosphatase." Bone **30**(1): 152-158.
- Filmon, R., M. F. Baslé, et al. (2000). "Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: a composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process." J. Biomater. Sci. Polym. Ed. **11**(8): 849-868.

- Filmon, R., D. Chappard, et al. (1996). "A composite biomaterial: Poly 2(hydroxyethyl) methacrylate / alkaline phosphatase initiates mineralization in vitro." Cell. Mater. **6**(1-3): 11-20.
- Filmon, R., F. Grizon, et al. (2002). "Effects of negatively charged groups (carboxymethyl) on the calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)." Biomaterials **23**(14): 3053-3059.
- Filmon, R., F. Grizon, et al. (2002). "Effects of negatively charged groups (carboxymethyl) on the calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)." Biomaterials **23**(14): 3053-3059.
- Filmon, R., N. Retailleau-Gaborit, et al. (2009). "Preparation of β -TCP granular material by polyurethane foam technology." Image Anal. Stereol. **28**: 1-10.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, et al. (2001). "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 460-465.
- Flemming, R. G., C. J. Murphy, et al. (1999). "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior." Biomaterials **20**(6): 573-588.
- Fonseca, J. E. (2008). "Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength." Rheumatology (Oxford) **47 Suppl 4**: iv17-19.
- Fromigué, O., E. Hay, et al. (2009). "Calcium sensing receptor-dependent and -independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate." J Cell Mol Med **13**: 2189-2199.
- Fromigué, O., E. Hay, et al. (2009). "Calcium sensing receptor-dependent and -independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate." J Cell Mol Med.
- Frost, H. M. (1989). "Some ABCs of skeletal pathophysiology. III: Bone balance and the delta B.BMU." Calcif Tissue Int **45**(3): 131-133.
- Fujisawa, R. et Y. Kuboki (1991). "Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals." Biochim Biophys Acta **1075**(1): 56-60.
- Fujisawa, R., Y. Wada, et al. (1996). "Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals." Biochim Biophys Acta **1292**(1): 53-60.
- Gaillard, C., G. Celiot, et al. (2009). "Carbon nanotubes carrying cell-adhesion peptides do not interfere with neuronal functionality." Advanced Materials **21**(28): 2903-2908.
- Garimella, R., X. Bi, et al. (2004). "Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization." Bone **34**(6): 961-970.
- Gawalt, E. S., M. J. Avaltroni, et al. (2003). "Bonding organics to titanium alloys: facilitating human osteoblasts attachment and spreading on surgical implant materials." Langmuir **19**: 200-2004.
- Geetha, M., A. K. Singh, et al. (2009). "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review." Progress in Materials Science **54**(3): 397-425.
- Gelse, K., E. Poschl, et al. (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." Adv Drug Deliv Rev **55**(12): 1531-1546.
- Gerhardt, H. et C. Betsholtz (2003). "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis." Cell Tissue Res **314**(1): 15-23.
- Ghoneima, A. A., E. S. Allam, et al. (2010). "Bisphosphonates treatment and orthodontic considerations." Orthod Craniofac Res **13**(1): 1-10.
- Ghosh, K., M. Kumar, et al. (2010). "Tailoring the field emission property of nitrogen-doped carbon nanotubes by controlling the graphitic/pyridinic substitution." Carbon **48**(1): 191-200.

- Ghosh, S. K., S. K. Nandi, et al. (2008). "In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **86**(1): 217-227.
- Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-1032.
- Gordon, J. A., C. E. Tye, et al. (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." Bone **41**(3): 462-473.
- Gorski, J. P. (1998). "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms." Crit Rev Oral Biol Med **9**(2): 201-223.
- Graupner, R. (2007). "Raman spectroscopy of covalently functionalized single-wall carbon nanotubes." Journal of Raman Spectroscopy **38**(6): 673-683.
- Graziano, F., B. Humar, et al. (2003). "The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice." Ann Oncol **14**(12): 1705-1713.
- Grizon, F., E. Aguado, et al. (2002). "Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep." J Dent **30**(5-6): 195-203.
- Grynopas, M. D., E. Hamilton, et al. (1996). "Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect." Bone **18**(3): 253-259.
- Grynopas, M. D. et P. J. Marie (1990). "Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats." Bone **11**(5): 313-319.
- Guggenbuhl, P., R. Filmon, et al. (2008). "Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro." Metabolism **57**(7): 903-910.
- Guggenbuhl, P., R. Filmon, et al. (2008). "Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro." Metabolism **57**(7): 903-910.
- Gumbiner, B. M. (1996). "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." Cell **84**(3): 345-357.
- Gumbiner, B. M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 622-634.
- Gunzburg, R. et M. Szpalski (2002). "Use of a novel beta-tricalcium phosphate-based bone void filler as a graft extender in spinal fusion surgeries." Orthopedics **25**(5 Suppl): s591-595.
- Hamon, M. A., H. Hui, et al. (2002). "Ester-functionalized soluble single-walled carbon nanotubes." App. Phys. A: Mater. Sci. Process. **74**(3): 333-338.
- Handschin, R. G. et W. B. Stern (1992). "Crystallographic lattice refinement of human bone." Calcif Tissue Int **51**(2): 111-120.
- Hatano, K., H. Inoue, et al. (1999). "Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene." Bone **25**(4): 439-445.
- Hauschka, P. V. et F. H. Wians, Jr. (1989). "Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone." Anat Rec **224**(2): 180-188.
- Hellstein, J. W. et C. L. Marek (2005). "Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21st century?" J Oral Maxillofac Surg **63**(5): 682-689.
- Hennessy, K. M., W. C. Clem, et al. (2008). "The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials." Biomaterials **29**(21): 3075-3083.
- Hersel, U., C. Dahmen, et al. (2003). "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond." Biomaterials **24**(24): 4385-4415.

- Hessle, L., K. A. Johnson, et al. (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9445-9449.
- Hing, K. A. (2005). "Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry." International Journal of Applied Ceramic Technology **2**(3): 184-199.
- Hinz, P., E. Wolf, et al. (2002). "A new resorbable bone void filler in trauma: early clinical experience and histologic evaluation." Orthopedics **25**(5 Suppl): s597-600.
- Hirsch, A. (2002). "Functionalization of single-walled carbon nanotubes." Angew Chem Int Ed Engl **41**(11): 1853-1859.
- Hiura, H., T. W. Ebbesen, et al. (1995). "Opening and purification of carbon nanotubes in high yields." Adv. Mater. **7**(3): 275-276.
- Hoang, Q. Q., F. Sicheri, et al. (2003). "Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure." Nature **425**(6961): 977-980.
- Holick, M. F. (2007). "Vitamin D deficiency." N Engl J Med **357**(3): 266-281.
- Hortigüela, M. J., M. C. Gutiérrez, et al. (2008). "Urea assisted hydroxyapatite mineralization on MWCNT/CHI scaffolds." J. Mater. Chem. **18**(48): 5933-5940.
- Hoshi, K. et H. Ozawa (2000). "Matrix vesicle calcification in bones of adult rats." Calcif. Tissue. Int. **66**(6): 430-434.
- Hott, M., P. Deloffre, et al. (2003). "S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats." Bone **33**(1): 115-123.
- Hou, X. J., K. Y. Mao, et al. (2008). "Bone formation performance of beta-tricalcium phosphate sintered bone." Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research **12**(49): 9627-9630.
- Hozumi, K., D. Otagiri, et al. (2010). "Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide-chitosan membranes." Biomaterials.
- Hsu, S. H., B. S. Liu, et al. (2007). "Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface." Biomed Mater Eng **17**(1): 53-68.
- Humphries, M. J., S. K. Akiyama, et al. (1986). "Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2637-2647.
- Hunter, G. K., P. V. Hauschka, et al. (1996). "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins." Biochemical Journal **317** (Pt 1): 59-64.
- Hurtel-Lemaire, A. S., R. Mentaverri, et al. (2009). "The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways." J Biol Chem **284**(1): 575-584.
- Hwang, S. H., C. N. Moorefield, et al. (2006). "Functional nanohybrids constructed via complexation of multiwalled carbon nanotubes with novel hexameric metallomacrocyles." Chem. Mater. **18**(17): 4019-4024.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
- Iijima, S. (1991). "Helical microtubules of graphitic carbon." Nature **354**(6348): 56-58.
- Inoue, M., R. Z. LeGeros, et al. (2004). "In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites." J Biomed Mater Res A **70**(4): 585-593.
- Iwaya, Y., M. Machigashira, et al. (2008). "Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium." Dent Mater J **27**(3): 415-421.
- Jarcho, M. (1981). "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics." Clin Orthop Relat Res(157): 259-278.

- John, A., H. K. Varma, et al. (2009). "In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic." Biomed Mater **4**(1): 15007.
- Jung, D. H., B. H. Kim, et al. (2010). "Fabrication of single-walled carbon nanotubes dotted with Au nanocrystals: Potential DNA delivery nanocarriers." Carbon.
- Juodzbaly, G., M. Sapragnoniene, et al. (2007). "Titanium dental implant surface micromorphology optimization." J Oral Implantol **33**(4): 177-185.
- Kalbacova, M., M. Kalbac, et al. (2007). "Influence of single-walled carbon nanotube films on metabolic activity and adherence of human osteoblasts." Carbon **45**(11): 2266-2272.
- Kantlehner, M., P. Schaffner, et al. (2000). "Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation." Chembiochem **1**(2): 107-114.
- Kasemo, B. (1983). "Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects." J Prosthet Dent **49**(6): 832-837.
- Kasten, P., I. Beyen, et al. (2008). "Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study." Acta biomaterialia **4**(6): 1904-1915.
- Katz, B. Z., E. Zamir, et al. (2000). "Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions." Mol Biol Cell **11**(3): 1047-1060.
- Katz, E. et I. Willner (2004). "Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics." Chemphyschem **5**(8): 1084-1104.
- Kay, M. I., R. A. Young, et al. (1964). "Crystal Structure of Hydroxyapatite." Nature **204**: 1050-1052.
- Khosroshahi, M. E., M. Mahmoodi, et al. (2009). "In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium:yttrium-aluminium-garnet laser and silicon carbide paper." Lasers Med Sci **24**(6): 925-939.
- Kieswetter, K., Z. Schwartz, et al. (1996). "Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells." J Biomed Mater Res **32**(1): 55-63.
- Kim, H. M., C. Rey, et al. (1995). "Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature." J Bone Miner Res **10**(10): 1589-1601.
- Kirsch, T., G. Harrison, et al. (2000). "The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage." J Biol Chem **275**(45): 35577-35583.
- Klein, M. O., C. Reichert, et al. (2007). "In vitro assessment of motility and proliferation of human osteogenic cells on different isolated extracellular matrix components compared with enamel matrix derivative by continuous single-cell observation." Clin Oral Implants Res **18**(1): 40-45.
- Knabe, C., C. Koch, et al. (2008). "Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans." Biomaterials **29**(14): 2249-2258.
- Kobashi, K., Z. Chen, et al. (2007). "Copolymer of single-walled carbon nanotubes and poly(p-phenylene benzobisoxazole)." Chem. Mater. **19**(2): 291-300.
- Koutsopoulos, S. (2002). "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods." J Biomed Mater Res **62**(4): 600-612.
- Kralova, V., K. Brigulova, et al. (2009). "Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells." Toxicol In Vitro **23**(8): 1497-1503.

- Kubo, K., N. Tsukimura, et al. (2009). "Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model." *Biomaterials* **30**(29): 5319-5329.
- Kuhn, L. T., M. D. Grynblas, et al. (2008). "A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages." *Calcif Tissue Int* **83**(2): 146-154.
- Landi, E., A. Tampieri, et al. (2007). "Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement." *Acta Biomater* **3**(6): 961-969.
- Landis, W. J. (1995). "The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix." *Bone* **16**(5): 533-544.
- Landis, W. J., M. J. Song, et al. (1993). "Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction." *J Struct Biol* **110**(1): 39-54.
- Larsson, C., P. Thomsen, et al. (1996). "Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses." *Biomaterials* **17**(6): 605-616.
- Larsson, C., P. Thomsen, et al. (1994). "Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology." *Biomaterials* **15**(13): 1062-1074.
- Lasky, L. A. (1992). "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation." *Science* **258**(5084): 964-969.
- Lay, C. L., H. Q. Liu, et al. (2010). "Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics." *Nanotechnology* **21**(6): 065101.
- Le Guehennec, L., A. Soueidan, et al. (2007). "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration." *Dent Mater* **23**(7): 844-854.
- Leeuwenburgh, S. C., J. G. Wolke, et al. (2006). "In vitro and in vivo reactivity of porous, electrospayed calcium phosphate coatings." *Biomaterials* **27**(18): 3368-3378.
- Levenberg, S., A. Yarden, et al. (1999). "p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry." *Oncogene* **18**(4): 869-876.
- Li, W. et C. Gao (2007). "Efficiently stabilized spherical vaterite CaCO₃ crystals by carbon nanotubes in biomimetic mineralization." *Langmuir* **23**(8): 4575-4582.
- Li, W. J., R. Tuli, et al. (2005). "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells." *Biomaterials* **26**(6): 599-609.
- Li, Y. P., W. Chen, et al. (1999). "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification." *Nat Genet* **23**(4): 447-451.
- Li, Z. Y., W. M. Lam, et al. (2007). "Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite." *Biomaterials* **28**(7): 1452-1460.
- Liao, S., G. Xu, et al. (2007). "Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes." *Acta. Biomater.* **3**(5): 669-675.
- Libouban, H., R. Filmon, et al. (2009). "Fetuin and osteocalcin interact with calcospherite formation during the calcification process of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in vitro: A Raman microspectroscopic monitoring." *J. Raman Spectrosc.* **40**(9): 1234-1239.
- Lin, Y., D. J. Hillegonds, et al. (2004). "Protocol for assessing bone health in humans by tracing long-lived ⁴¹Ca isotope in urine, serum, and saliva samples." *Anal Biochem* **332**(1): 193-195.
- Liu, J., A. G. Rinzler, et al. (1998). "Fullerene pipes." *Science* **280**(5367): 1253-1256.

- Liu, M., Y. Yang, et al. (2007). "A general approach to chemical modification of single-walled carbon nanotubes with peroxy organic acids and its application in polymer grafting." J. Phys. Chem. C **111**(6): 2379-2385.
- Liu, Q., L. Cen, et al. (2008). "A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics." Biomaterials **29**(36): 4792-4799.
- Mabilleau, G., R. Filmon, et al. (2009). "Cobalt, chromium and nickel affect hydroxyapatite crystal growth in vitro." Acta Biomater. DOI 10.1016/j.actbio.2009.10.035.
- Mabilleau, G., M. F. Moreau, et al. (2004). "Biodegradability of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) in the presence of the J774.2 macrophage cell line." Biomaterials **25**(21): 5155-5162.
- Makrigiannakis, A., G. Coukos, et al. (1999). "N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis?" Am J Pathol **154**(5): 1391-1406.
- Malard, O., J. M. Bouler, et al. (1999). "Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study." J Biomed Mater Res **46**(1): 103-111.
- Marie, P. J. (2005). "Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption." Osteoporos Int **16 Suppl 1**: S7-10.
- Marie, P. J. (2006). "Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation." Curr Opin Rheumatol **18 Suppl 1**: S11-15.
- Marie, P. J. (2007). "Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action." Bone **40**(5 SUPPL.): S5-S8.
- Marie, P. J. (2008). "Transcription factors controlling osteoblastogenesis." Arch Biochem Biophys **473**(2): 98-105.
- Marie, P. J. (2010). "The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis." Bone **46**: 571-576.
- Marie, P. J., P. Ammann, et al. (2001). "Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone." Calcif Tissue Int **69**(3): 121-129.
- Marie, P. J., M. T. Garba, et al. (1985). "Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats." Miner Electrolyte Metab **11**(1): 5-13.
- Marie, P. J. et M. Hott (1986). "Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse." Metabolism **35**(6): 547-551.
- Marie, P. J., M. Hott, et al. (1993). "An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats." J Bone Miner Res **8**(5): 607-615.
- Marshall, J. H. (1969). The power function model. Mineral Metabolism, and Advance Treatise. C. L. Comar, Bronner, F. New York and London, Academic Press. **Vol III**.
- Marshall, J. H. (1969). The power function model. Mineral Metabolism, and Advance Treatise. C. L. Comar, Bronner, F. New York and London, Academic Press. **Vol III**.
- Martin, J. Y., Z. Schwartz, et al. (1995). "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)." J Biomed Mater Res **29**(3): 389-401.
- Martino, L. J., V. L. Yeager, et al. (1979). "An ultrastructural study of the role of calcification nodules in the mineralization of woven bone." Calcif. Tissue. Int. **27**(1): 59-64.
- Massia, S. P. et J. A. Hubbell (1991). "An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation." J Cell Biol **114**(5): 1089-1100.
- Matsuoka, M., T. Akasaka, et al. (2010). "Strong adhesion of Saos-2 cells to multi-walled carbon nanotubes." Materials Science and Engineering B.

- Mawhinney, D. B., V. Naumenko, et al. (2000). "Infrared spectral evidence for the etching of carbon nanotubes: Ozone oxidation at 298 K [7]." J. Am. Chem. Soc. **122**(10): 2383-2384.
- McClung, M. R., E. M. Lewiecki, et al. (2006). "Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density." N Engl J Med **354**(8): 821-831.
- McKee, M. D. et A. Nanci (1995). "Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues." Microsc Res Tech **31**(1): 44-62.
- Meeder, P. J. et C. Eggers (1994). "The history of autogenous bone grafting." Injury **25 Suppl 1**: A2-3.
- Mentaverri, R., S. Yano, et al. (2006). "The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis." FASEB J **20**(14): 2562-2564.
- Mergenhagen, S. E., G. R. Martin, et al. (1960). "Calcification in vivo of implanted collagen." Biochim Biophys Acta **43**: 563-565.
- Meunier, P. J., C. Roux, et al. (2009). "Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis." Osteoporos Int **20**(10): 1663-1673.
- Meunier, P. J., C. Roux, et al. (2004). "The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis." N Engl J Med **350**(5): 459-468.
- Meunier, P. J., D. O. Slosman, et al. (2002). "Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial." J Clin Endocrinol Metab **87**(5): 2060-2066.
- Meyer, U., A. Buchter, et al. (2005). "Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces." Eur Cell Mater **9**: 39-49.
- Midura, R. J., A. Vasanji, et al. (2007). "Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen." Bone **41**(6): 1005-1016.
- Millan, J. L. (2006). "Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes." Purinergic Signal **2**(2): 335-341.
- Miller, L. M., V. Vairavamurthy, et al. (2001). "In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the $\nu(4)$ $\text{PO}_4(3-)$ vibration." Biochim Biophys Acta **1527**(1-2): 11-19.
- Monthéard, J.-P., M. Chatzopoulos, et al. (1992). "2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA). Chemical properties and applications in biomedical fields." Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics **C32**(1): 1-34.
- Moore, W. R., S. E. Graves, et al. (2001). "Synthetic bone graft substitutes." ANZ J Surg **71**(6): 354-361.
- Neff, J. A., K. D. Caldwell, et al. (1998). "A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates." J Biomed Mater Res **40**(4): 511-519.
- Nesbitt, S. A. et M. A. Horton (1997). "Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts." Science **276**(5310): 266-269.
- Niinomi, M. (2008). "Metallic biomaterials." J Artif Organs **11**(3): 105-110.
- Niyogi, S., M. A. Hamon, et al. (2002). "Chemistry of single-walled carbon nanotubes." Acc Chem Res **35**(12): 1105-1113.
- Nyangoga, H., E. Aguado, et al. (2010). " A non steroidal anti inflammatory drug (ketoprofen) does not delay β -TCP bone graft healing." Acta biomaterialia **accepted for publication**.

- O'Donnell, M. D., Y. Fredholm, et al. (2008). "Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites." Acta. Biomater. **4**(5): 1455-1464.
- Oliveira, A. L., R. L. Reis, et al. (2007). "Strontium-substituted apatite coating grown on Ti6Al4V substrate through biomimetic synthesis." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **83**(1): 258-265.
- Olszta, M. J., X. Cheng, et al. (2007). "Bone structure and formation: A new perspective." Mat. Sci. Eng. R. **58**(3-5): 77-116.
- Oonishi, H., L. L. Hench, et al. (1999). "Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes." J Biomed Mater Res **44**(1): 31-43.
- Ou-Yang, H., E. P. Paschalis, et al. (2000). "Two-dimensional vibrational correlation spectroscopy of in vitro hydroxyapatite maturation." Biopolymers **57**(3): 129-139.
- Owen, M. (1988). "Marrow stromal stem cells." J Cell Sci Suppl **10**: 63-76.
- Ozawa, H., K. Hoshi, et al. (2008). "Current concepts of bone biomineralization." Journal of Oral Biosciences **50**(1): 1-14.
- Pallu, S., R. Bareille, et al. (2003). "A cyclo peptide activates signaling events and promotes growth and the production of the bone matrix." Peptides **24**(9): 1349-1357.
- Pallu, S., C. Bourget, et al. (2005). "The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells." Biomaterials **26**(34): 6932-6940.
- Pallu, S., J. C. Fricain, et al. (2009). "Cyclo-DfKRG peptide modulates in vitro and in vivo behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys." Acta Biomater **5**(9): 3581-3592.
- Papadopoulos, T., A. Tsetsekou, et al. (1999). "Effect of aluminium oxide sandblasting on cast commercially pure titanium surfaces." Eur J Prosthodont Restor Dent **7**(1): 15-21.
- Penel, G., G. Leroy, et al. (1998). "MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites." Calcif Tissue Int **63**(6): 475-481.
- Penicaud, A., P. Poulin, et al. (2005). "Spontaneous dissolution of a single-wall carbon nanotube salt." J Am Chem Soc **127**(1): 8-9.
- Pierschbacher, M. D. et E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." Nature **309**(5963): 30-33.
- Pors Nielsen, S. (2004). "The biological role of strontium." Bone **35**(3): 583-588.
- Portet, D., G. Lecollinet, et al. (2006). Procédé de recouvrement de surfaces métalliques et minérales par des monocouches autoassemblées de composés bisphosphoniques et leurs utilisations. Surfactis and U. Angers. France. **FR2904784**
- Prime, K. et G. Whitesides (1991). "Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces." Science **252**(5009): 1164-1167.
- Qin, Y., J. Shi, et al. (2003). "Concise Route to Functionalized Carbon Nanotubes." J Phy. Chem. B. **107**(47): 12899-12901.
- Qu, Z., X. Rausch-Fan, et al. (2007). "The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification." J Biomed Mater Res A **82**(3): 658-668.
- Rabinovitch, A. L. et H. C. Anderson (1976). "Biogenesis of matrix vesicles in cartilage growth plates." Fed Proc **35**(2): 112-116.
- Raisz, L. G. (1997). "The osteoporosis revolution." Ann Intern Med **126**(6): 458-462.
- Rammelt, S., T. Illert, et al. (2006). "Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate." Biomaterials **27**(32): 5561-5571.
- Ratner, B. D. et S. J. Bryant (2004). "Biomaterials: where we have been and where we are going." Annu Rev Biomed Eng **6**: 41-75.

- Ratzan, K. R., D. M. Musher, et al. (1972). "Correlation of increased metabolic activity, resistance to infection, enhanced phagocytosis, and inhibition of bacterial growth by macrophages from Listeria- and BCG-infected mice." Infect Immun **5**(4): 499-504.
- Reginster, J. Y., E. Seeman, et al. (2005). "Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study." J Clin Endocrinol Metab **90**(5): 2816-2822.
- Rey, C. (1990). "Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties." Biomaterials **11**: 13-15.
- Rey, C., B. Collins, et al. (1989). "The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study." Calcif Tissue Int **45**(3): 157-164.
- Rey, C., C. Combes, et al. (2009). "Bone mineral: update on chemical composition and structure." Osteoporos Int **20**(6): 1013-1021.
- Rezwan, K., Q. Z. Chen, et al. (2006). "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **27**(18): 3413-3431.
- Rinzler, A. G., J. Liu, et al. (1998). "Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: Process, product, and characterization." App. Phy. A **67**(1): 29-37.
- Robey, P., G et A. Boskey, L (2008). The Composition of Bone. American Society for Bone Mineral Research: 32-38.
- Robey, P. G., N. S. Fedarko, et al. (1993). "Structure and molecular regulation of bone matrix proteins." J Bone Miner Res **8 Suppl 2**: S483-487.
- Robinson, R. A. (1952). "An electron-microscopic study of the crystalline inorganic component of bone and its relationship to the organic matrix." J Bone Joint Surg Am **34-A**(2): 389-435; passim.
- Roelofs, A. J., K. Thompson, et al. (2006). "Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 2): 6222s-6230s.
- Rogers, M. J., S. Gordon, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates." Cancer **88**(12 Suppl): 2961-2978.
- Roodman, G. D. et J. J. Windle (2005). "Paget disease of bone." J Clin Invest **115**(2): 200-208.
- Rosca, I. D., F. Watari, et al. (2005). "Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid." Carbon **43**(15): 3124-3131.
- Ross, F. P. et S. L. Teitelbaum (2005). "alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology." Immunol Rev **208**: 88-105.
- Rosser, J. L. et B. de Crombrughe (2002). Type I collagen: Structure, synthesis and regulation. San Diego, CA, USA.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." JAMA **288**(3): 321-333.
- Rupp, F., L. Scheideler, et al. (2004). "Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications." Biomaterials **25**(7-8): 1429-1438.
- Ryan, G., A. Pandit, et al. (2006). "Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications." Biomaterials **27**(13): 2651-2670.
- Saito, M., H. Shimizu, et al. (2000). "The role of beta-tricalcium phosphate in vascularized periosteum." J Orthop Sci **5**(3): 275-282.
- Sambrook, P. et C. Cooper (2006). "Osteoporosis." Lancet **367**(9527): 2010-2018.
- San Antonio, J. D., J. J. Zoeller, et al. (2009). "A key role for the integrin alpha2beta1 in experimental and developmental angiogenesis." Am J Pathol **175**(3): 1338-1347.

- Sarin, J., S. S. DeRossi, et al. (2008). "Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis." Oral Dis **14**(3): 277-285.
- Sawyer, A. A., K. M. Hennessy, et al. (2005). "Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins." Biomaterials **26**(13): 1467-1475.
- Sawyer, A. A., K. M. Hennessy, et al. (2007). "The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite." Biomaterials **28**(3): 383-392.
- Schinke, T., C. Amendt, et al. (1996). "The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis." J Biol Chem **271**(34): 20789-20796.
- Seeman, E., B. Vellas, et al. (2006). "Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older." J Bone Miner Res **21**(7): 1113-1120.
- Shao, L., G. Tobias, et al. (2007). "Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalisation of single-walled carbon nanotubes." Chem. Commun.(47): 5090-5092.
- Shim, M., N. W. S. Kam, et al. (2002). "Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition." Nano Letters **2**(4): 285-288.
- Shin, H., K. Zygourakis, et al. (2004). "Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide." Biomaterials **25**(5): 895-906.
- Shu, R., R. McMullen, et al. (2003). "Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts." J Biomed Mater Res A **67**(4): 1196-1204.
- Shvedova, A. A., V. Castranova, et al. (2003). "Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells." J Toxicol Environ Health A **66**(20): 1909-1926.
- Siebers, M. C., P. J. ter Brugge, et al. (2005). "Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review." Biomaterials **26**(2): 137-146.
- Simmons, J. M., B. M. Nichols, et al. (2006). "Effect of ozone oxidation on single-walled carbon nanotubes." J Phys Chem B **110**(14): 7113-7118.
- Sinnott, S. B. (2002). "Chemical functionalization of carbon nanotubes." J. Nanosci. Nanotechnol. **2**(2): 113-123.
- Sitharaman, B., X. Shi, et al. (2008). "In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering." Bone **43**(2): 362-370.
- Sivakumar, P., A. Czirok, et al. (2006). "New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1350-1360.
- Slat, B., K. Kostial, et al. (1971). "Reduction in the absorption and retention of strontium in rats." Health Phys **21**(6): 811-814.
- Slosarczyk, A., Z. Paszkiewicz, et al. (2005). "FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods." J. Mol. Struct. **744-747**(SPEC. ISS.): 657-661.
- Soballe, K., E. S. Hansen, et al. (1993). "Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants." J Bone Joint Surg Br **75**(2): 270-278.
- Song, J., V. Malathong, et al. (2005). "Mineralization of synthetic polymer scaffolds: a bottom-up approach for the development of artificial bone." J Am Chem Soc **127**(10): 3366-3372.

- Song, J., E. Saiz, et al. (2003). "A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: an efficient process toward 3-dimensional bonelike composites." J Am Chem Soc **125**(5): 1236-1243.
- Starck, W. J. et B. N. Epker (1995). "Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report." Int J Oral Maxillofac Implants **10**(1): 74-78.
- Stein, G. S. et J. B. Lian (1993). "Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype." Endocr Rev **14**(4): 424-442.
- Stewart, A. J., S. J. Roberts, et al. (2006). "The presence of PHOSPHO1 in matrix vesicles and its developmental expression prior to skeletal mineralization." Bone **39**(5): 1000-1007.
- Strano, M. S., C. A. Dyke, et al. (2003). "Electronic structure control of single-walled carbon nanotube functionalization." Science **301**(5639): 1519-1522.
- Su, X., K. Sun, et al. (2003). "Organization of apatite crystals in human woven bone." Bone **32**(2): 150-162.
- Su, X. W., Q. L. Feng, et al. (1997). "Microstructure and micromechanical properties of the mid-diaphyses of human fetal femurs." Connect Tissue Res **36**(3): 271-286.
- Szmukler-Moncler, S., D. Perrin, et al. (2004). "Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **68**(2): 149-159.
- Takahashi, N., T. Sasaki, et al. (2003). "S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro." J Bone Miner Res **18**(6): 1082-1087.
- Takeuchi, H., M. Nagayama, et al. (2009). "Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of beta-tricalciumphosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats." Dent Mater J **28**(5): 595-601.
- Tanaka, T., Y. Kumagae, et al. (2008). "Bone formation and resorption in patients after implantation of beta-tricalcium phosphate blocks with 60% and 75% porosity in opening-wedge high tibial osteotomy." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **86B**(2): 453-459.
- Tao, J., Y. Sun, et al. (2009). "Induced endothelial cells enhance osteogenesis and vascularization of mesenchymal stem cells." Cells Tissues Organs **190**(4): 185-193.
- Tasis, D., D. Kastanis, et al. (2006). "Growth of calcium phosphate mineral on carbon nanotube buckypapers." Phys. Stat. Solidi. (B). **243**(13): 3230-3233.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.
- Termine, J. D., H. K. Kleinman, et al. (1981). "Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen." Cell **26**(1 Pt 1): 99-105.
- Termine, J. D. et A. S. Posner (1966). "Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions." Science **153**(743): 1523-1525.
- Terryn, C., A. Bonnomet, et al. (2009). "Video-microscopic imaging of cell spatio-temporal dispersion and migration." Crit Rev Oncol Hematol **69**(2): 144-152.
- Thompson, B. C., S. E. Moulton, et al. (2009). "Carbon nanotube biogels." Carbon **47**(5): 1282-1291.
- Thouverey, C., A. Strzelecka-Kiliszek, et al. (2009). "Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells." J Cell Biochem **106**(1): 127-138.
- Tian, F., D. Cui, et al. (2006). "Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts." Toxicol In Vitro **20**(7): 1202-1212.

- Tomonari, Y., H. Murakami, et al. (2006). "Solubilization of single-walled carbon nanotubes by using polycyclic aromatic ammonium amphiphiles in water--strategy for the design of high-performance solubilizers." Chemistry **12**(15): 4027-4034.
- Tran, P. A., L. Zhang, et al. (2009). "Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine." Adv Drug Deliv Rev **61**(12): 1097-1114.
- Tsang, S. C., J. J. Davis, et al. (1995). "Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: High-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(17): 1803-1804.
- Tugulu, S., P. Silacci, et al. (2007). "RGD-Functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells." Biomaterials **28**(16): 2536-2546.
- Verdejo, R., G. Jell, et al. (2009). "Reactive polyurethane carbon nanotube foams and their interactions with osteoblasts." J Biomed Mater Res A **88**(1): 65-73.
- Verrier, S., S. Pallu, et al. (2002). "Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process." Biomaterials **23**(2): 585-596.
- Vesely, P., A. Boyde, et al. (1992). "Behaviour of osteoclasts in vitro: contact behaviour of osteoclasts with osteoblast-like cells and networking of osteoclasts for 3D orientation." J Anat **181 (Pt 2)**: 277-291.
- Walsh, W. R., F. Vizesi, et al. (2008). "Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model." Biomaterials **29**(3): 266-271.
- Warheit, D. B., B. R. Laurence, et al. (2004). "Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats." Toxicol Sci **77**(1): 117-125.
- Wei, W., A. Sethuraman, et al. (2007). "Biological properties of carbon nanotubes." J Nanosci Nanotechnol **7**(4-5): 1284-1297.
- Weiner, S. et P. A. Price (1986). "Disaggregation of bone into crystals." Calcif Tissue Int **39**(6): 365-375.
- Weiner, S., W. Traub, et al. (1999). "Lamellar bone: structure-function relations." J Struct Biol **126**(3): 241-255.
- Weiss, P., L. Obadia, et al. (2003). "Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials." Biomaterials **24**(25): 4591-4601.
- Whitehouse, W. J., E. D. Dyson, et al. (1971). "The scanning electron microscope in studies of trabecular bone from a human vertebral body." J Anat **108**(Pt 3): 481-496.
- Williams, D. F. (1976). "Biomaterials and biocompatibility." Med Prog Technol **4**(1-2): 31-42.
- Williams, D. F. (2009). "On the nature of biomaterials." Biomaterials **30**(30): 5897-5909.
- Worle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, et al. (2006). "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." Nano Lett **6**(6): 1261-1268.
- Wu, L. N., G. R. Sauer, et al. (2003). "Effects of analogues of inorganic phosphate and sodium ion on mineralization of matrix vesicles isolated from growth plate cartilage of normal rapidly growing chickens." J Inorg Biochem **94**(3): 221-235.
- Wuthier, R. E., R. J. Majeska, et al. (1977). "Biosynthesis of matrix vesicles in epiphyseal cartilage. I. In vivo incorporation of ³²P orthophosphate into phospholipids of chondrocyte, membrane, and matrix vesicle fractions." Calcif Tissue Res **23**(2): 135-139.
- Wuthrich, R. P. (1992). "Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney." J Am Soc Nephrol **3**(6): 1201-1211.
- Xu, J. L., K. A. Khor, et al. (2009). "Preparation and characterization of a novel hydroxyapatite/carbon nanotubes composite and its interaction with osteoblast-like cells." Materials Science and Engineering C **29**(1): 44-49.

- Yamada, S., T. Nakamura, et al. (1994). "Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic by a simulated body fluid." J. Biomed. Mater. Res. - Part A **28**(11): 1357-1363.
- Yang, W., M. J. Moghaddam, et al. (2007). "Single-walled carbon nanotubes with DNA recognition." Chemical Physics Letters **443**(4-6): 169-172.
- Yang, W., P. Thordarson, et al. (2007). "Carbon nanotubes for biological and biomedical applications." Nanotechnology **18**(41).
- Yaszemski, M. J., R. G. Payne, et al. (1996). "Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone." Biomaterials **17**(2): 175-185.
- Young, M. F., Y. Bi, et al. (2006). "Small leucine-rich proteoglycans in the aging skeleton." J Musculoskelet Neuronal Interact **6**(4): 364-365.
- Yu, M. F., B. S. Files, et al. (2000). "Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties." Phys. Rev. Lett. **84**(24): 5552-5555.
- Yu, M. F., B. S. Files, et al. (2000). "Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties." Phys Rev Lett **84**(24): 5552-5555.
- Yu, X., B. Munge, et al. (2006). "Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers." J Am Chem Soc **128**(34): 11199-11205.
- Zainuddin, Z. Barnard, et al. (2008). "PHEMA hydrogels modified through the grafting of phosphate groups by ATRP support the attachment and growth of human corneal epithelial cells." J Biomater Appl **23**(2): 147-168.
- Zanello, L. P., B. Zhao, et al. (2006). "Bone cell proliferation on carbon nanotubes." Nano Lett **6**(3): 562-567.
- Zanello, L. P., B. Zhao, et al. (2006). "Bone cell proliferation on carbon nanotubes." Nano Lett. **6**(3): 562-567.
- Zavaleta, C., A. de la Zerda, et al. (2008). "Noninvasive Raman spectroscopy in living mice for evaluation of tumor targeting with carbon nanotubes." Nano Lett **8**(9): 2800-2805.
- Zhang, L., F. Rakotondradany, et al. (2009). "Arginine-glycine-aspartic acid modified rosette nanotube-hydrogel composites for bone tissue engineering." Biomaterials **30**(7): 1309-1320.
- Zhang, Y., Y. Wu, et al. (2001). "Versican modulates embryonic chondrocyte morphology via the epidermal growth factor-like motifs in G3." Exp Cell Res **263**(1): 33-42.
- Zhang, Z. Y., S. H. Teoh, et al. (2009). "A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering." Biomaterials **30**(14): 2694-2704.
- Zhao, B., H. Hu, et al. (2005). "A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes." Chem. Mater. **17**(12): 3235-3241.
- Zhao, X., S. Jain, et al. (2005). "Directed cell migration via chemoattractants released from degradable microspheres." Biomaterials **26**(24): 5048-5063.
- Zhu, L. L., S. Zaidi, et al. (2007). "Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate." Biochem Biophys Res Commun **355**(2): 307-311.
- Ziegler, K. J., Z. Gu, et al. (2005). "Controlled oxidative cutting of single-walled carbon nanotubes." J. Am. Chem. Soc. **127**(5): 1541-1547.
- Zijderveld, S. A., I. R. Zerbo, et al. (2005). "Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts." Int J Oral Maxillofac Implants **20**(3): 432-440.
- Zou, S., J. Huang, et al. (2005). "Crystal imperfection studies of pure and silicon substituted hydroxyapatite using Raman and XRD." J Mater Sci Mater Med **16**(12): 1143-1148.

L'influence d'un revêtement de type RGD sur du TiCP sur l'adhésion, l'étalement et la minéralisation des ostéoblastes a été étudié. Ce revêtement accélérât la vitesse de minéralisation et augmentait la surface des zones de minéralisation. Des CNTs fonctionnalisés ont été utilisés pour induire la calcification dans le but de mimer *in vitro* la minéralisation des fibres de collagène dans le tissu osseux. Après 14 jours d'incubation dans un liquide biosynthétique, les CNTs fonctionnalisés ont induit la formation de calcosphérites, similaires à ceux formés dans le woven bone. Ce modèle de calcification *in vitro* biomimétique, mis au point sur des polymères dans notre laboratoire, a permis d'étudier l'incorporation du Sr^{2+} dans le minéral osseux et sa désorption. Sr^{2+} a été incorporé dans le minéral lors de la calcification sans induire de changement des paramètres du cristal ou de la cristallinité quelque soit la concentration initiale en Sr^{2+} . La désorption du Sr^{2+} a été rapide initialement avec libération de 20 à 25 % en 16 jours, puis plus lente pour atteindre 30 % après 61 jours. Enfin, les observations en cytodynamique ont permis de voir les premières étapes d'adhésion cellulaire et de colonisation du β -TCP. Les séquences vidéo réalisées sur 8 jours de culture, ont permis d'observer la prolifération des ostéoblastes (SaOs-2) qui sembla se produire en direction des particules de β -TCP pour venir en contact direct avec les particules. Les macrophages (J774-2 et macrophages péritonéaux de souris) ne proliféraient pas mais venaient au contact direct des particules pour les dégrader. Les observations MEB ont permis de constater que les cellules émettaient des prolongements cytoplasmiques et s'étiraient pour venir se fixer et ensuite s'étaler à la surface du biomatériau. Les données obtenues grâce aux observations faites avec la vidéomicroscopie sur long terme nous ont permis de confirmer la cytocompatibilité et la biodégradabilité du β -TCP.

Mots Clés : Biomatériaux, biomimétisme, cytodynamique, calcification

The influence of RDG coating on Ti was tested on osteoblasts behaviors. This coating allowed an earlier mineralization and an increase of surface mineralized. Functionalized CNTs have been used to promote calcification to mimic the *in vivo* mineralization of collagen fibers. After 14 days of incubation, functionalized CNTs promoted the calcospherites formation, which were similar to those in woven bone. This *in vitro* calcification model developed in our laboratory was used to study the Sr^{2+} incorporation in mineral and its released. Sr^{2+} was incorporated in mineral during calcification without inducing any change in crystal parameters or crystallinity. Sr^{2+} released was rapid at the begging and then slower to reach 30% of Sr^{2+} released after 61 days. In a last study, cell behaviors in direct contact with β -TCP particles using long term culture under videomicroscopy were observed. Video sequences realized after 8 days of culture showed an active proliferation of SaOs-2 occurring in the direction of the particles. J774.2 did not proliferate but came in direct contact with the particles. Peritoneal macrophages did not proliferate but came in direct contact with the particles and actively eroded them. SEM showed that cells were stretched and fixed onto the surface and seemed to climb from the coverslip to the particles. The long term culture under videomicroscopy allowed a better understanding of the colonization process of β -TCP particles by osteoblast-like cells and macrophages. Data obtained from long term videomicroscopy are in agreement with *in vivo* observations confirming the interest of β -TCP to promote osteogenesis.

Key Words : Biomaterials, biomimetism, cytodynamic, calcification