



**HAL**  
open science

**Influence d'un phosphate de calcium substitué en strontium sur la physiologie de l'ostéoblaste humain en culture et évaluation de son potentiel de réparation osseuse chez la souris**

Julien Braux

► **To cite this version:**

Julien Braux. Influence d'un phosphate de calcium substitué en strontium sur la physiologie de l'ostéoblaste humain en culture et évaluation de son potentiel de réparation osseuse chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université de Reims - Champagne Ardenne, 2011. Français. NNT : 2011REIM0201 . tel-00591069

**HAL Id: tel-00591069**

**<https://theses.hal.science/tel-00591069v1>**

Submitted on 6 May 2011

**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.

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
U.F.R. D'ODONTOLOGIE

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS  
CHAMPAGNE ARDENNE**

Discipline : **Sciences Biologiques**

Présenté par

**Julien Braux**

Influence d'un phosphate de calcium substitué en strontium sur la  
physiologie de l'ostéoblaste humain en culture et évaluation de son  
potentiel de réparation osseuse chez la souris

Soutenue publiquement le 2 février 2010

**JURY**

Président	Pr. Pierre MARIE (Paris)
Rapporteurs	Pr. Jean-Christophe FRICAIN (Bordeaux) Pr. Henri TENENBAUM (Strasbourg)
Directeurs de thèse	Pr. Patrice LAQUERRIERE (Strasbourg) Pr Dominique LAURENT-MAQUIN (Reims)

# REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur **Jean-Christophe FRICAIN**, Professeur à l'INSERM U577 de Bordeaux, et Monsieur le Professeur **Henri TENENBAUM**, Professeur à l'INSERM U977 de Strasbourg, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur **Pierre MARIE** de l'INSERM U606 de Paris d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur **Dominique LAURENT-MAQUIN** pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche au sein de l'UMR-S 926 Interfaces Biomatériaux/Tissus-Hôtes. Merci de m'avoir accordé votre confiance et merci pour votre disponibilité. Merci enfin d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir initié à l'enseignement et la recherche.

Un immense merci au Professeur **Patrice LAQUERRIERE**, mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce projet de recherche et m'avoir fait confiance afin de le mener à son terme. Merci Patrice d'être resté disponible malgré la distance.

Je remercie le docteur **Olivier CHASSANDE** pour son accueil, sa disponibilité et le temps qu'il m'a consacré lors de mes passages à Bordeaux.

Merci également à *l'ensemble de l'équipe* de l'unité INSERM U577 pour leur chaleureux accueil.

Je tiens à remercier le Professeur **Edouard JALLOT** ainsi que le Docteur **Jean-Marie NEDELEC** de Clermont-Ferrand d'avoir fourni les poudres d'hydroxyapatite sans lesquelles ce travail n'aurait pas été réalisable.

Merci au Docteur **Jean-Marc SVOBODA** pour son accueil au sein de la sous section de Parodontologie ainsi qu'à *tous les membres de cette sous section* pour leur soutien.

Je remercie également le Docteur *Jacky JACQUOT* et le Professeur *Sandrine LORIMIER* pour leurs conseils et pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eues ensemble.

Merci au Docteurs *Marie-Paule GELEE* et *Jean-Christophe MAURIN* pour leur sympathie et leur bonne humeur. Jean-Christophe... ne lâche pas les macarons !!!

Merci à *Sylvie BOUTHORS* et *Sylvie GUILLAUME* pour leurs encouragements, leur aide et leurs petits plats.

Merci à *Christine GUILLAUME* pour son aide à la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité et son soutien.

Merci au docteur *Frédéric Velard* pour tous les moments passés ensemble au laboratoire comme à l'extérieur, lors des congrès et des diverses formations. Merci pour sa collaboration et son aide dans la rédaction des papiers.

Merci à *tous mes amis* pour tous ces moments passés ensemble qui font que l'on se souvient qu'il y a une vie en dehors du labo et qu'elle est géniale. Pour tout ça et le reste, merci à vous tous.

Merci à l'ensemble de ma famille pour son soutien. Merci particulièrement à mes grands-parents sans qui mes études n'auraient pas pu se dérouler dans ces conditions et également à ma maman surtout d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu.

Merci à Coralie, ma femme, de m'avoir soutenu (et supporté...) toutes ces années et pour celles à venir...

# Sommaire

<b>Sommaire</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>5</b>
<b>Liste des illustrations</b>	<b>7</b>
<b>CONTEXT</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>1. Le tissu osseux</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Le squelette</i>	15
1.2. <i>Développement squelettique</i>	15
1.3. <i>Structure « multi-échelle »</i>	16
1.4. <i>Histologie du tissu osseux</i>	18
1.4.1. La matrice organique	18
1.4.2. La phase minérale	32
1.4.3. L'eau	33
1.4.4. Les cellules du tissu osseux	33
1.5. <i>La physiologie osseuse : le remodelage osseux.</i>	44
1.5.1. Le couplage	45
1.5.2. La séquence de remodelage	45
<b>2. Les biomatériaux</b>	<b>50</b>
2.1. <i>Introduction</i>	50
2.2. <i>Classifications</i>	50
2.3. <i>Les biocéramiques phosphocalciques</i>	51
2.3.1. Les modes d'obtention	52
2.3.2. Paramètres physiques de développement des biomatériaux	54
2.4. <i>Applications des phosphates de calcium</i>	55
2.4.1. Les revêtements prothétiques	55
2.4.2. Le comblement osseux	57
2.4.3. Une nouvelle approche thérapeutique : l'Individual Based Implant Therapy	59
2.5. <i>Réactions biomatériaux-tissus hôtes</i>	59
2.5.1. Réponse tissulaire	60
2.5.2. L'Inflammation	62
2.5.3. Les cytokines.	66
<b>3. Le strontium</b>	<b>68</b>
3.1. <i>Généralités</i>	68
3.2. <i>Sources naturelles du strontium</i>	69
3.3. <i>Utilisations</i>	69
3.4. <i>Propriétés pharmacologiques du ranélate de strontium</i>	70
3.4.2. Propriétés pharmacodynamiques (AFSSAPS, 2010)	70
3.4.3. Propriétés pharmacocinétiques	71
3.4.4. Déficience en strontium	72
3.4.5. Toxicité du strontium	73
3.4.6. Effets biologiques <i>in vivo</i> :	73
3.4.7. Effet biologique <i>in-vitro</i>	75

<b>OBJECTIFS</b>	<b>79</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>82</b>
<b>1. Matériels</b>	<b>83</b>
1.1. Produits chimiques et réactifs	83
1.2. Kits.	84
1.3. Matériels.	84
1.4. Poudres d'HA et d'HA5%.	85
<b>2. Méthodes</b>	<b>86</b>
2.1. Evaluation de la concentration en strontium efficace	86
2.1.1. Cultures cellulaires	86
2.1.2. Cultures cellulaires - Prolifération induite et toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en Sr <sup>2+</sup>	87
2.1.3. Cultures cellulaires : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en Sr <sup>2+</sup> sur les cellules primaires – Tests d'exclusion au bleu trypan	88
2.1.4. Cultures cellulaires : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en Sr <sup>2+</sup> sur les cellules primaires – MTS	88
2.1.5. Cultures cellulaires : Réalisation des banques d'ARNm	88
2.2. Tests d'exclusion au bleu trypan - Prolifération induite et Toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en Sr <sup>2+</sup>	88
2.3. Spectrométrie d'émission atomique à source plasma (Inductively-Coupled-plasma/ Atomic-Emission – Spectrometry - ICP-AES) : Validation de l'indice de substitution des poudres	89
2.4. Tests d'exclusion au bleu trypan et MTS : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en Sr <sup>2+</sup> sur les cellules primaires	89
2.5. Microscopie électronique à balayage - Etude de la morphologie cellulaire	90
2.6. Etude de l'expression génique	90
2.6.1. Extraction, purification quantification et qualification des ARN totaux	90
2.6.2. Transcription inverse	91
2.6.3. Réalisation d'un calibrateur	92
2.6.4. PCR Arrays	92
2.6.5. Design des primers et étude <i>in silico</i>	92
2.6.6. Mise au point des primers	95
2.6.7. Real Time PCR	95
2.7. Etude de la synthèse protéique	96
2.7.1. Dosage quantitatif de protéines par ELISA	96
2.7.2. Zymographie	96
2.7.3. Cytokines arrays	97
2.8. Etude <i>in vivo</i>	97
2.8.1. Implantation des souris	97
2.8.2. Microscanner	98
2.8.3. Histologie descriptive	101
2.9. Statistiques	101
<b>RESULTATS</b>	<b>102</b>
<b>1. Prolifération induite et Toxicité du chlorure de strontium: Détermination de la concentration efficace en Sr<sup>2+</sup></b>	<b>103</b>
1.1. Etude préliminaire sur la lignée MG-63	103
1.1.1. 7 jours.	103
1.1.2. 14 jours	104
1.1.3. 21 jours	104
1.1.4. Conclusion	105
1.2. Etude sur cellules primaires	105

1.2.1.	Résultats à 7 jours	106
1.2.2.	Résultats à 14 jours	106
1.2.3.	Résultats à 21 jours.	107
1.2.4.	Conclusions.	107
1.3.	<i>Spectrométrie d'émission atomique à source plasma (Inductively-Coupled-plasma/ Atomic-Emission Spectrometry - ICP-AES) : Validation de l'indice de substitution du substitut osseux</i>	108
1.3.1.	Etude du strontium	108
1.3.2.	Etude du calcium	109
1.3.3.	Conclusions	109
<b>2.</b>	<b>Prolifération induite par le strontium: Effets des poudres HA et HA<sub>5%</sub> sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec la concentration d'effet maximal.</b>	<b>110</b>
<b>3.</b>	<b>Microscopie électronique à balayage - Etude de la morphologie cellulaire et des rapports cellules/biomatériaux.</b>	<b>111</b>
<b>4.</b>	<b>Ostéogénèse : étude de l'expression génique par PCR Arrays</b>	<b>113</b>
4.1.	<i>Ostéogénèse – phénotype des témoins</i>	113
4.1.1.	Gènes non exploitables	113
4.1.2.	Gènes exploitables	114
4.2.	<i>Effet de la poudre d'HA sur les cellules primaires issues d'explants</i>	116
4.2.1.	Ossification	116
4.2.2.	Facteurs de croissance	116
4.2.3.	Molécules de la matrice extracellulaire	117
4.2.4.	Molécules d'adhésion cellulaire	117
4.2.5.	Facteurs de transcription et régulateurs	118
4.2.6.	Protéases matricielles	118
4.3.	<i>Effet du chlorure de strontium sur les cellules primaires issues d'explants</i>	119
4.3.1.	Ossification	119
4.3.2.	Facteurs de croissance	119
4.3.3.	Molécules de la matrice extracellulaire	120
4.3.4.	Molécules d'adhésion cellulaire	121
4.3.5.	Facteurs de transcription et régulateurs	121
4.3.6.	Protéases matricielles	121
		122
4.4.	<i>Effet de la poudre HA5% sur les cellules primaires issues d'explants</i>	122
4.4.1.	Ossification	122
4.4.2.	Facteurs de croissance.	122
4.4.3.	Molécules de la matrice extracellulaire	123
4.4.4.	Molécules d'adhésion cellulaire	124
4.4.5.	Facteurs de transcription et leurs régulateurs	124
4.4.6.	Protéases matricielles.	124
4.5.	<i>Conclusions.</i>	125
4.5.1.	Ossification.	125
4.5.2.	Facteurs de croissance.	125
4.5.3.	Molécules de la matrice extracellulaire.	125
4.5.4.	Molécules d'adhésion cellulaire.	126
4.5.5.	Facteurs de transcription et régulateurs	126
4.5.6.	Protéases matricielles	126
<b>5.</b>	<b>Ostéogénèse : étude de l'expression génique par RT-PCR semi-quantitative en temps réel et ELISA</b>	<b>127</b>
5.1.	<i>Etude de l'expression de COL1A1.</i>	127
5.2.	<i>Etude de l'expression de SERPINH1.</i>	128
5.3.	<i>Etude de l'expression des gènes codant les MMP-1 et MMP-2 et étude de leurs synthèses protéiques</i>	129
5.4.	<i>Etude des concentrations protéiques en proMMP-2 et en MMP-2 totale par zymographie</i>	131

5.5.	<i>Etude de l'expression des gènes codant les TIMP1 et TIMP2 et étude de leurs synthèses protéiques</i>	132
5.5.1.	Expression de TIMP-1 et dosage de la protéine codée	132
5.5.2.	Expression de TIMP-2 et dosage de la protéine codée	133
<b>6.</b>	<b>Ostéoimmunologie.</b>	<b>135</b>
6.1.	<i>Phénotype des témoins – PCR Arrays</i>	135
6.2.	<i>Phénotype des témoins – Cytokines Arrays</i>	139
6.3.	<i>Effet des traitements – Cytokines Arrays</i>	140
6.3.1.	7 jours	140
6.3.2.	14 jours	140
6.3.3.	21 jours	141
6.4.	<i>Effet des traitements sur GRO-<math>\alpha</math>.</i>	142
6.5.	<i>Effet des traitements sur MCP-1</i>	143
<b>7.</b>	<b>Etude <i>in vivo</i></b>	<b>145</b>
7.1.	<i>Constats généraux</i>	145
7.2.	<i>Microtomographie X : étude descriptive</i>	145
7.2.1.	Etude des échantillons traités par les poudres HA et HA5	149
7.2.2.	Conclusions	154
7.3.	<i>Microtomographie X : étude quantitative</i>	156
7.3.1.	Etude des paramètres de la ROI-1	156
7.3.2.	Etude des paramètres de la ROI-2	159
7.3.3.	Etude des paramètres de la ROI-3	160
7.4.	<i>Etude histologique</i>	162
7.4.1.	Exploitabilité des résultats	162
7.4.2.	Histologie descriptive au 14 <sup>ème</sup> jour	163
7.4.3.	Histologie descriptive au 28 <sup>ème</sup> jour	175
	<b>DISCUSSION</b>	<b>187</b>
<b>1.</b>	<b>Prolifération induite et toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en Sr<sup>2+</sup></b>	<b>188</b>
<b>2.</b>	<b>Dissolution de la poudre HA5.</b>	<b>189</b>
<b>3.</b>	<b>Effet des poudres HA et HA5 sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec la concentration d'effet maximal</b>	<b>189</b>
<b>4.</b>	<b>Microscopie électronique à balayage – Etude de la morphologie cellulaire</b>	<b>190</b>
<b>5.</b>	<b>Ostéogénèse : Etude de l'expression génique par PCR Arrays</b>	<b>190</b>
<b>6.</b>	<b>Ostéoimmunologie : Etude des témoins</b>	<b>197</b>
<b>7.</b>	<b>Etude <i>in-vivo</i></b>	<b>200</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>204</b>
	<b>REFERENCES</b>	<b>209</b>

## Liste des abréviations

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire
AP	Activator Protein 1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATCC	American Type culture collection
ATP	Adénosine Triphosphate
BAG	Bone Acidic Glycoprotein
BCP	Bone Calcium Phosphate
BMP	Bone morphogenic protein
BMU	basic multicellular unit
BSP	Bone SialoProtein
C/EBP	(CCCAAT/Enhancer Binding Protein
CaR	Calcium Receptor
Cbfa	Core Binding Factor Alpha
CD	Cluster de differentiation
CFU	Colony Forming Unit
COL	Collagène
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	Cyclo-oxygénases
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP	Dentine Matrix Protein
DPP	Dentine PhosphoProtein
DRESS	Drug Rash with Eosinophila and Systemic Symptoms syndrom
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EMEM	Eagle Minimum Essential Medium
Eph	Ephédrine
ERK	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GAG	GlycoAminoGlycanes
HA	HydroxyApatite
HES	hématoxyline-éosine-safran
HMDS	hexaméthylidisilazane
HSC	Hematopoietic Stem Cells
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
IGF	Insulin Growth Factor
IL	InterLeukine
IMP	Inhibitor of MMP
IOD	Integrated Optical Density
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Matrix MetalloProteinases
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MyoD	Myogenic differentiation D
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molécule
OCN	OstéoCalcine
OPG	Osteoprotegerine
OPN	Ostéopontine

OPN	Osteopontine
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PAL	Phosphatase Alcaline
PBS	Phosphate Buffer Salin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE	ProstaGlandine E
pH	potentien Hydrogène
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PS	Penicillin Streptomycine
PSA	Penicillin Streptomycin Actinomycin
PTH	ParaThyroid Hormone
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
RGD	Arginine - Glycine - Acide aspartique
ROI	Region of interest
ROS	Rat Osteosarcome
RUNX	Runt-related transcription factor
SAR	Surface Area Ratio
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation
Sox	Sex determining région Y - Box 9
SVF	Serum de Veau Fœtal
TBE	Tris, Borate, EDTA
TCP	TriCalcium Phosphate
TGF	Transforming Growth Factor
Thy	Thymopoïétine
TIMP	Tissular Inhibitor of MMP
TMB	3,3' 5,5' tétraméthylbenzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
TSP	Thrombospondine
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## Liste des illustrations

FIGURE 1: STRUCTURE OSSEUSE MULTI-ECHELLE .....	16
FIGURE 2 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTES ORGANISATIONS OSSEUSES .....	17
FIGURE 3 : OS TRABECULAIRE (A) ET OS CORTICAL (B) .....	18
FIGURE 4 : ORGANISATION MOLECULAIRE DES FIBRILLES DE COLLAGENE I .....	19
FIGURE 5 : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX COLLAGENES RETROUVES AU SEIN DE LA MATRICE .....	19
FIGURE 6 : CARACTERISTIQUES DES PROTEOGLYCANES .....	20
FIGURE 7 : CARACTERISTIQUES DES GLYCOPROTEINES OSSEUSES .....	22
FIGURE 8 : CARACTERISTIQUES DES GLYCOPROTEINES DE LA MATRICE OSSEUSE CONTENANT UN MOTIF RGD.....	24
FIGURE 9 : CARACTERISTIQUES DES PROTEINES DE LA MATRICE OSSEUSE CONTENANT DE L'ACIDE $\Gamma$ -CARBOXY- GLUTAMIQUE.....	27
FIGURE 10 : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES PROTEINES SERIQUES DE LA MATRICE OSSEUSE .....	28
FIGURE 11 : EXEMPLE DE CASCADES D'ACTIVATION DES MMPs : EXEMPLE DE LA MMP2 (GELATINASE A) .....	30
FIGURE 12 : LES MEMBRES DE LA FAMILLE DES MMPs .....	31
FIGURE 18 : EVOLUTION DE LA CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE. ....	38
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES PRESUMEEES DE DIFFERENCIATION DES OSTEOPROGENITEURS ET DE L'EXPRESSION DES GENES MARQUEURS DES CELLULES OSTEOBLASTIQUES .....	40
FIGURE 20 : OSTEOCLASTE EN COURS DE RESORPTION OSSEUSE VU EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE .....	43
FIGURE 21: BMU ET REMODELAGE OSSEUX .....	44
FIGURE 22 : : INTERACTION OSTEOBLASTE/OSTEOCLASTE ET REGULATION OSSEUSE.....	46
FIGURE 23 : CLASSIFICATION DES PHOSPHATES DE CALCIUM .....	52
FIGURE 24 : DIAGRAMME DE PHASE DES PHOSPHATES DE CALCIUM .....	53
FIGURE 25 : MICROPHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB) D'UNE POUDRE D'HA OBTENUE PAR SOL-GEL .....	54
FIGURE 26 : TORCHE A PLASMA EN COURS D'UTILISATION POUR LE RECOUVREMENT D'IMPLANTS .....	56
FIGURE 27 : DISPOSITIF D'ELECTRODEPOSITION D'HYDROXYAPATITE .....	57
FIGURE 28 : SPECTRE DE BIOREACTIVITE DES BIO-CERAMIQUES (A) ET TEMPORALITE DE LA CREATION .....	61
FIGURE 29 : REACTIONS HEMOSTATIQUES MIS EN JEU LORS DE L'IMPLANTATION D'UN BIOMATERIAU .....	63
FIGURE 30 : VARIATIONS TEMPORELLES DES REPONSES INFLAMMATOIRES AIGUË ET CHRONIQUE ET LEURS IMPLICATIONS CELLULAIRES .....	65
FIGURE 31 : TRANSITION DU MONOCYTE EN CELLULE GEANTE.....	66

FIGURE 32 : CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES CYTOKINES TENANT COMPTE DE LEUR ROLE DANS LA REPONSE INFLAMMATOIRE ET LA REPARATION TISSULAIRE. ....	67
FIGURE 33 : ILLUSTRATION DES CLASSES DE CHEMOKINES .....	68
FIGURE 34 : LE STRONTIUM METALLIQUE.....	69
FIGURE 35 : LA VOIE MPAK .....	76
FIGURE 36 : LA VOIE WNT ABOUTISSANT A NFAT.....	77
FIGURE 37 : LA VOIE DU VEGF. ....	78
FIGURE 38 : RECAPITULATIF DE L'EFFET DU STRONTIUM SUR LES OSTEOLASTES HUMAINS .....	78
FIGURE 39 : ANALYSE QUANTITATIVE DES PHASES PRESENTES AU SEIN .....	85
FIGURE 40 : MICROPHOTOGRAPHIE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE POUFRE D'HA .....	86
FIGURE 41 : TABLEAU REPRESENTANT LES EFFICACITES, PLAGES ET CONDITIONS D'UTILISATION DES PRIMERS ET TM DES AMPLICONS.....	95
FIGURE 42 : ILLUSTRATION DE LA ROI-1.....	99
FIGURE 43 : ILLUSTRATION DE LA ROI-2.....	99
FIGURE 44 : ILLUSTRATION DE LA ROI-3.....	100
FIGURE 45 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 7 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES MG-63. ....	103
FIGURE 46 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 14 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES MG-63. ....	104
FIGURE 47 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 21 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES MG-63. ....	104
FIGURE 48 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 7, 14 ET 21 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES MG-63.....	105
FIGURE 49 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 14 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES OSTEOLASTIQUES PRIMAIRES .....	106
FIGURE 50 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 14 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES OSTEOLASTIQUES PRIMAIRES .....	106
FIGURE 51 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 21 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES OSTEOLASTIQUES PRIMAIRES.....	107
FIGURE 52 : ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 7, 14 ET 21 JOURS PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE STRONTIUM INCLUSES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES OSTEOLASTIQUES PRIMAIRES.....	107
FIGURE 53 : ETUDE PAR ICP-AES DU RELARGAGE DE STRONTIUM PAR LES POUFRES.....	108
FIGURE 54 : ETUDE PAR ICP-AES DU RELARGAGE DE CALCIUM PAR LES POUFRES.....	109

FIGURE 55 : ETUDE DES COURBES DE PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITES A 7, 14 ET 21 JOURS PAR LES DIFFERENTS EFFECTEURS INCLUS DANS LES MILIEUX DE CULTURES DE CELLULES OSTEOBLASTIQUES PRIMAIRES. ....	110
FIGURE 56 : REPRESENTATION COMPARATIVE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE INDUITE A 7, 14 ET 21 JOURS PAR LES DIFFERENTS EFFECTEURS INCLUS DANS LES MILIEUX DE CULTURES DE CELLULES OSTEOBLASTIQUES PRIMAIRES. ....	111
FIGURE 57 : MORPHOLOGIE DES CELLULES TRAITÉES PAR LES 3 CONDITIONS D'ÉTUDES (HA, HA5% ET SrCl2) COMPAREES A LA CONDITION TEMOIN AUX 3 TEMPS DE L'ÉTUDE. ....	112
FIGURE 58 : CONTACTS CELLULES BIOMATERIAUX AUX 3 TEMPS DE L'ÉTUDE.....	113
FIGURE 59 : TABLEAU PRESENTANT LES GENES INEXPLOITABLES PAR PCR ARRAYS EN RAISON DE COURBES DE DISSOCIATION ANORMALES OU DE Ct EN DEHORS DU SEUIL DE DETECTION. ....	113
FIGURE 60 : GENES EXPRIMÉS ET EXPLOITABLES PAR PCR ARRAYS. ....	114
FIGURE 61 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ÉTAPES PRESUMÉES DE DIFFÉRENCIATION DES OSTEOPROGENITEURS ET DE L'EXPRESSION DES GENES MARQUEURS DES CELLULES OSTEOBLASTIQUES ...	115
FIGURE 62 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES MARQUANT L'OSSIFICATION.....	116
FIGURE 63 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES FACTEURS DE CROISSANCE. ...	117
FIGURE 64 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	117
FIGURE 65 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE. ....	118
FIGURE 66 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE. ....	118
FIGURE 67 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE. ....	119
FIGURE 68 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES MARQUANT L'OSSIFICATION.....	119
FIGURE 69 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES FACTEURS DE CROISSANCE... ..	120
FIGURE 70 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	120
FIGURE 71 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES D'ADHESION CELLULAIRE.. ....	121
FIGURE 72 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LEURS REGULATEURS.. ....	121
FIGURE 73 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES PROTEASES MATRICIELLES.. ..	122
FIGURE 74 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES INTERVENANT DANS L'OSSIFICATION. ....	122
FIGURE 75 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES FACTEURS DE CROISSANCE. ...	123
FIGURE 76 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	123
FIGURE 77 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES MOLECULES INTERVENANT DANS L'ADHESION CELLULAIRE. ....	124

FIGURE 78 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION OU LEURS REGULATEURS. ....	124
FIGURE 79 : RESULTATS DE PCR ARRAYS CONCERNANT LES GENES CODANT DES PROTEASES MATRICIELLES. ...	125
FIGURE 80 : RESULTATS DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE COL1A1 PAR RT-PCR EN TEMPS REEL.....	127
FIGURE 81 : RESULTATS DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE SERPINH1 PAR RT-PCR EN TEMPS REEL. ....	128
FIGURE 82 : RESULTATS DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT LES MMP-1 ET -2 PAR RT-PCR EN TEMPS REEL ET DOSAGES ELISA.....	129
FIGURE 83 : A – EXEMPLE DE ZYMOGRAMME. B - RESULTATS DE L'ETUDE DE MESURE DES CONCENTRATIONS DE PROMMP-2 ET DE MMP-2 TOTALE AU SEIN DES SURNAGEANTS DE CULTURE PAR ZYMOGRAPHIE.. ....	131
FIGURE 84 : RESULTATS DE L'ETUDE DE MESURE DE L'EXPRESSION DE TIMP-1 PAR PCR EN TEMPS REEL. ....	132
FIGURE 85 : RESULTATS DE L'ETUDE DE MESURE DES CONCENTRATIONS DE TIMP-1 AU SEIN DES SURNAGEANTS DE CULTURE PAR ELISA. ....	133
FIGURE 86 : RESULTATS DE L'ETUDE DE MESURE DE L'EXPRESSION DE TIMP2 PAR PCR EN TEMPS REEL.....	133
FIGURE 87 : RESULTATS DE L'ETUDE DE MESURE DES CONCENTRATIONS DE TIMP1 AU SEIN DES SURNAGEANTS DE CULTURE PAR ELISA.. ....	134
FIGURE 88 : RESULTATS DE L'ETUDE DES CHIMIOKINES CXCL PAR PCR ARRAY : PHENOTYPE DES TEMOINS. ...	135
FIGURE 89 : RESULTATS DE L'ETUDE DES CHIMIOKINES CCL PAR PCR ARRAY : PHENOTYPE DES TEMOINS. ....	136
FIGURE 90 : RESULTATS DE L'ETUDE DES RECEPTEURS AUX CHIMIOKINES CCL PAR PCR ARRAY.....	137
FIGURE 91 : RESULTATS DE L'ETUDE DES INTERLEUKINES ET DE LEURS RECEPTEURS PAR PCR ARRAY : PHENOTYPE DES TEMOINS.....	137
FIGURE 92 : RESULTATS DE L'ETUDE DES INTERLEUKINES ET DE LEURS RECEPTEURS PAR PCR ARRAY : PHENOTYPE DES TEMOINS.....	138
FIGURE 93 : RESULTATS DES CYTOKINES ARRAYS : PHENOTYPE DE NOTRE MODELE DE CULTURE.....	139
FIGURE 94 : EFFET DES TRAITEMENTS A 7 JOURS. ....	140
FIGURE 95 : EFFET DES TRAITEMENTS A 14 JOURS. ....	141
FIGURE 96 : EFFET DES TRAITEMENTS A 21 JOURS.....	141
FIGURE 97 : RESULTAT DE RT-PCR EN TEMPS REEL CONCERNANT L'EXPRESSION DU GENE CODANT GRO-A. ..	142
FIGURE 98 : RESULTAT DES DOSAGES ELISA DE LA CONCENTRATION EN GRO-A.. ....	143
FIGURE 99 : RESULTAT DE RT-PCR EN TEMPS REEL CONCERNANT L'EXPRESSION DU GENE CODANT LE MCP-1. ....	143
FIGURE 100 : RESULTAT DES DOSAGES ELISA DE LA CONCENTRATION EN GRO-A .....	144
FIGURE 101. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X OBTENUES DE L'ECHANTILLON TEMOIN AU 7EME JOUR..	145
FIGURE 102. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X OBTENUES DE L'ECHANTILLON TEMOIN AU 14 <sup>EME</sup> JOUR..	146
FIGURE 103. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X OBTENUES DE L'ECHANTILLON TEMOIN AU 28 <sup>EME</sup> JOUR..	146
FIGURE 104. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DE LA POUDRE HA HYDRATEE. ....	147
FIGURE 105. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DE LA POUDRE HA5 HYDRATEE. ....	148

FIGURE 106. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA HYDRATÉE 7 JOURS APRES IMPLANTATION..	149
FIGURE 107. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA5 HYDRATÉE 7 JOURS APRES IMPLANTATION..	150
FIGURE 108. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA HYDRATÉE 14 JOURS APRES IMPLANTATION..	151
FIGURE 109. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA5 HYDRATÉE 14 JOURS APRES IMPLANTATION..	152
FIGURE 110. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA HYDRATÉE 28 JOURS APRES IMPLANTATION..	153
FIGURE 111. A : GALERIE DE MICROTOMOGRAPHIES X DES FEMURS DE SOURIS TRAITÉES PAR LA POUDRE HA5 28 JOURS APRES IMPLANTATION ..	154
FIGURE 112 : RESULTATS DES ANALYSES QUANTITATIVES DE LA ZONE CORTICALE DE LA ROI-1..	156
FIGURE 113 : RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-1 : PARAMETRES DE DENSITOMETRIE OSSEUSE..	157
FIGURE 114 : RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-1 : PARAMETRES COMPOSANT LE « STRUCTURE MODEL INDEX » (SMI).....	157
FIGURE 115 : RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-1 : PARAMETRES D'ANISOTROPIE..	158
FIGURE 116: RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-1 : PARAMETRES DE STEREOLOGIE..	158
FIGURE 117 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LES DIAMETRES DE LESIONS MESURES AU NIVEAU DE LA ROI-2 EN FONCTION DES TEMPS POST-OPERATOIRES ET DES TRAITEMENTS..	159
FIGURE 118 : RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-3 : PARAMETRES DE DENSITOMETRIE OSSEUSE. ....	160
FIGURE 119 : RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-3 : PARAMETRES COMPOSANT L'ANISOTROPIE.....	161
FIGURE 120: RESULTATS DE L'ÉTUDE DES ZONES MEDULLAIRES DE LA ROI-3 : PARAMETRES DE STEREOLOGIE..	161
FIGURE 121 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON TEMOIN OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VERT LUMIERE AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	163
FIGURE 122 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON TEMOIN OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION AU HES AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	164
FIGURE 123 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VERT LUMIERE AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	165
FIGURE 124 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU TRICHROME DE GOLDNER MODIFIE AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	166
FIGURE 125 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VON KOSSA AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	167
FIGURE 126 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	168
FIGURE 127 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VERT LUMIERE MODIFIE AU 14 <sup>ÈME</sup> JOUR.....	169

FIGURE 128 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU TRICHROME DE GOLDNER MODIFIE AU 14 <sup>EME</sup> JOUR.....	170
FIGURE 129 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION DE VON KOSSA AU 14 <sup>EME</sup> JOUR.....	171
FIGURE 130 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 14 <sup>EME</sup> JOUR (1/2).....	172
FIGURE 131 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 14 <sup>EME</sup> JOUR (2/2).....	173
FIGURE 132 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VERT LUMIERE MODIFIEE AU 28 <sup>EME</sup> JOUR.....	176
FIGURE 133 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU TRICHROME DE GOLDNER MODIFIE AU 28 <sup>EME</sup> JOUR.....	177
FIGURE 134 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VON KOSSA AU 28 <sup>EME</sup> JOUR.....	178
FIGURE 135 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 28 <sup>EME</sup> JOUR (1/2).....	179
FIGURE 136 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 28 <sup>EME</sup> JOUR (2/2).....	180
FIGURE 137 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU VERT LUMIERE MODIFIEE AU 28 <sup>EME</sup> JOUR.....	181
FIGURE 138 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES COLORATION AU TRICHROME DE GOLDNER MODIFIE AU 28 <sup>EME</sup> JOUR.....	182
FIGURE 139 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE .....	183
FIGURE 140 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 28 <sup>EME</sup> JOUR (1/2).....	184
FIGURE 141 : HISTOLOGIE DESCRIPTIVE : ECHANTILLON HA5 OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRES DEMINERALISATION ET COLORATION A L'HES AU 28 <sup>EME</sup> JOUR (2/2).....	185
FIGURE 142 : CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS EXPRIMEES ET FACTEURS DE CROISSANCE DETECTES SUR LES ECHANTILLONS TEMOINS.....	197
FIGURE 143 : IMPLICATION DES CYTOKINES DANS LES PATHOLOGIES ORALES : ROLES PREPONDERANTS DE L'IL-8, LA MCP-1, RANTES, MIP1A, MDC ET BCA-1 .....	198
FIGURE 144 : REPRESENTATION DE L'IMPLICATION DES CYTOKINES AU SEIN DES PHENOMENES DE REMANIEMENTS OSSEUX MODIFIE D'APRES SILVA (2007).....	199
FIGURE 145 : ETUDE DE LA BIBLIOGRAPHIE DU STRONTIUM DEPUIS 1950 (DATE DE PREMIERE PUBLICATION CONJOINTE DES TERMES « STRONTIUM » ET « BONE » DANS LA BASE DE DONNEE MEDLINE®) JUSQU'A NOS JOURS.....	205

## CONTEXTE

L'amélioration du mode de vie augmente non seulement l'espérance de vie mais aussi la prévalence de certaines maladies. De nos jours, les populations supportent de moins en moins facilement les restrictions des possibilités physiques liées aux pathologies ou au vieillissement et la survenue d'un handicap. Dans le but de traiter ou remplacer un organe ou une fonction d'organe, les biomatériaux prennent une importance croissante dans le traitement de maladies relevant pratiquement de toutes les disciplines médicales.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux biomatériaux phospho-calciques à visée osseuse. Dans ce domaine, la recherche essaie d'améliorer les caractéristiques des biomatériaux dans le but de leur donner une activité sur le tissu hôte. Ainsi, un nouveau domaine de recherche a été défini : l'ingénierie tissulaire. Définie par Langer et Vacanti en 1993, cette science a pour but de comprendre les principes du développement tissulaire afin de les appliquer dans la production de tissus de remplacement à visée clinique. Ce concept a été étendu par Mac Arthur et Oreffo (2005) au développement de technologies capables d'utiliser les données acquises de la science sur les mécanismes physiologiques régissant la vie des tissus dans le but d'améliorer les stratégies thérapeutiques. L'ingénierie tissulaire tente donc d'associer au sein d'un organisme un biomatériau organisé tridimensionnellement, une fraction cellulaire et des modificateurs biologiques permettant de modifier la physiologie tissulaire afin de fonctionnaliser l'ensemble. Cette science nécessite donc de développer des biomatériaux capables de modifier la physiologie cellulaire. Une des possibilités permettant cette modification est incarnée par la substitution ionique. Cette technique permet d'intégrer au sein de matériaux des éléments chimiques capables d'influencer la physiologie cellulaire et ainsi de modifier les caractéristiques biologiques du biomatériau. Ce travail de thèse a consisté en l'évaluation d'un biomatériau substitué.

Ce manuscrit de thèse est organisé en trois parties : La première partie est une introduction qui présente le squelette et la physiologie de l'os, puis les biomatériaux et enfin, l'ion qui a été sélectionné pour la substitution ionique du biomatériau : le strontium. La seconde partie présente l'effet de ce biomatériau in vivo et in vitro après avoir décrit les matériels et les méthodes employées. Enfin, la troisième partie s'organise en une discussion/conclusion sur cet effet. Des perspectives sont proposées en dernier lieu pour approfondir ces travaux de thèse.

# **INTRODUCTION**

# 1. Le tissu osseux

## 1.1. Le squelette

Le squelette est un organe multifonctionnel : il apporte un cadre rigide permettant le soutien ainsi que le maintien de la forme de l'organisme et constitue une protection des organes internes bien souvent très fragiles. De par ses possibilités d'articulation, il permet un ensemble de mouvements complexes. Il représente un important système de stockage du calcium et participe ainsi à l'homéostasie de l'organisme. Enfin, il abrite la moelle osseuse hématopoïétique et donc le système de production hématopoïétique de l'organisme. Chez les vertébrés, le système squelettique a été divisé en deux grandes subdivisions : le *squelette axial* comprenant dans un sens céphalo-caudal l'ensemble des os constituant le crâne, le rachis, le sternum et les côtes, et le *squelette appendiculaire* regroupant les os des extrémités. Le crâne connaît un développement particulier et peut être subdivisé en trois catégories : le *chondrocrâne* qui se développe par ossification secondaire d'une trame cartilagineuse et qui inclut la base du crâne, les os entourant l'oreille interne et les organes olfactifs ainsi que la mandibule, la *voûte crânienne* et la plupart des os du *massif facial* qui se développent par ossification membranaire directe. (Karaplis *et al.* 2002).

## 1.2. Développement squelettique

Le système squelettique se développe au départ du mésoderme para-axial et du mésoderme de la plaque latérale ainsi que des cellules des crêtes neurales. En effet, le mésoderme para-axial se développe et évolue pour former le squelette axial et certaines structures crânio-faciales telles que l'occipital ou le pariétal. Le mésoderme latéral formera les structures appendiculaires. Enfin, les cellules des crêtes neurales se chargeront de la mise en place d'une grande partie du squelette crânio-facial telle que les os maxillaire ou mandibulaire.

L'organisation squelettique comporte quatre phases bien différentes :

Une première phase comprend la *migration* des cellules sur les sites d'ostéogenèse. Elle est suivie de la création d'*interactions épithélio-mésenchymateuses* qui aboutissent à la *condensation du mésenchyme* et à la *différenciation de ses cellules* en cellules ostéo ou chondroprogénitrices permettant respectivement une ossification primaire ou secondaire (Hall and Miyake, 2000).

### 1.3. Structure « multi-échelle »

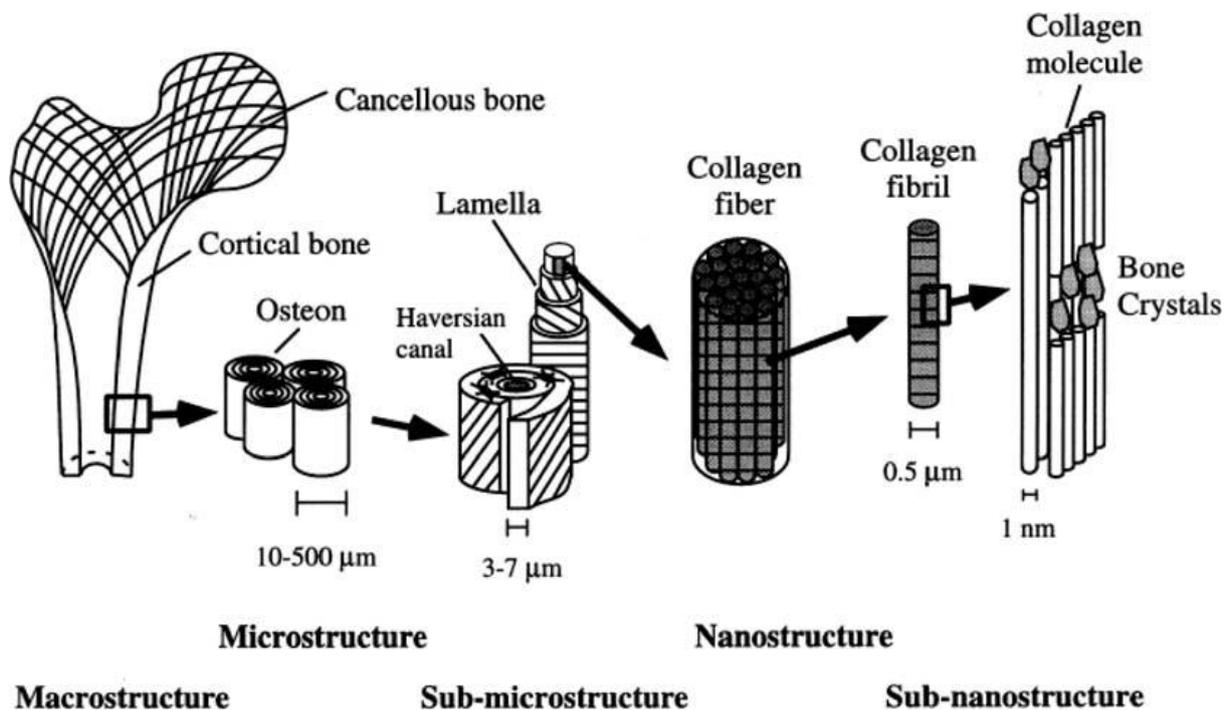


Figure 1: Structure osseuse multi-échelle (adaptée de Nyman *et al.*, 2005)

La plupart des os ont une construction élaborée, composée d'une partie externe dense formée d'os compact entourant un noyau d'os spongieux. Cette configuration minimise le poids de l'os tout en assurant une résistance optimale. La structure des os est « multi-échelle » : la structure cristalline de la phase inorganique de l'os composée essentiellement d'hydroxyapatite est directement précipitée au sein d'une matrice organique essentiellement composée de collagène de type I et relativement dense si on la compare à la matrice des autres organes minéralisés (dents par exemple). En effet, les os sont composés à 65% en volume d'hydroxyapatite et de 35% de collagène, de cellules et d'eau (Hansen *et al.*, 2006) Cette phase minérale est directement liée aux molécules de collagène qui sont assemblées sous forme de fibrilles organisées en fibres, elles-même organisées en lamelles. L'orientation des fibres dans les lamelles est anisotrope, ce qui leur confère une résistance supérieure dans le sens des fibres. Il est ainsi possible de distinguer plusieurs niveaux hiérarchiques d'organisation (Rho *et al.*, 1998; Weiner et Wagner, 1998). L'échelle macroscopique permet de distinguer l'os cortical de l'os spongieux; l'échelle millimétrique laisse apercevoir le système Haversien composé d'une organisation lamellaire à l'échelle microscopique. L'échelle submicroscopique révèle l'organisation cristalline de la phase minérale et l'organisation fibrillaire de la phase organique et, enfin, l'échelle nanométrique permet de comprendre les organisations moléculaire et ionique de ces phases.

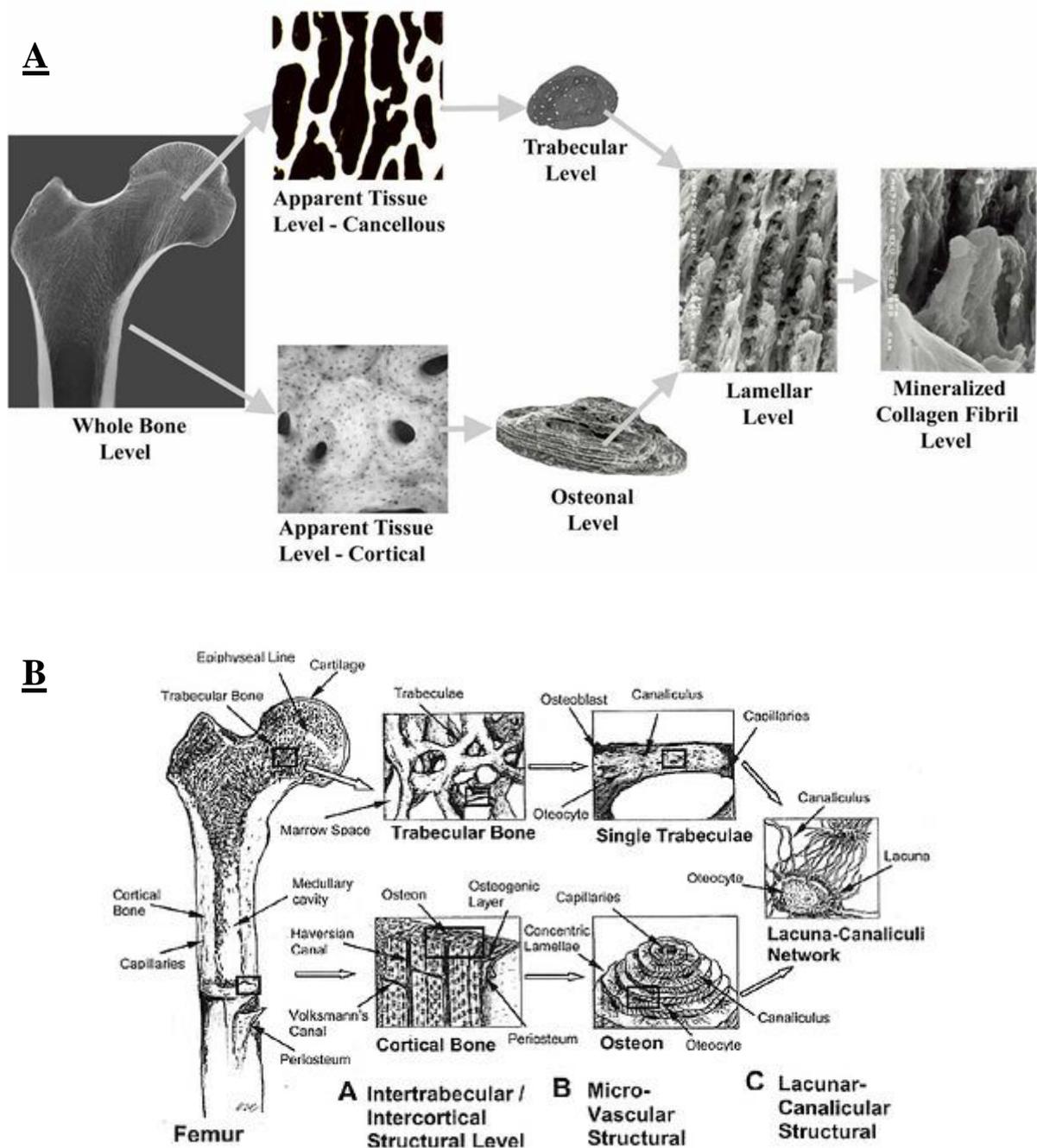


Figure 2 : Illustration des différentes organisations osseuses d'après Vashishth *et al.* (2007) (A) et Liebschner *et al.* (2003) (B).

Afin de former l'os compact, les lamelles sont organisées autour de structures tubulaires à paroi épaisse dans lesquelles les murs sont constitués de plusieurs couches de lamelles. La partie caverneuse de cette structure nommée canal de Havers contient un vaisseau sanguin qui apporte des nutriments à tout l'ostéon à travers de petits canicules émanant du canal. Les os matures sont principalement constitués d'un grand nombre de ces sous-systèmes qui, collectivement, sont nommés os haversiens.

L'os spongieux, quant à lui, dérive de l'arrangement des lamelles en trabécules. Dans ce cas, les lamelles sont plates et forment une structure tubulaire. L'os spongieux est alors constitué d'un réseau interconnecté de tiges ou de plaquettes. Un réseau de tiges engendre des cellules ouvertes de faible densité alors qu'un réseau de plaquettes donne lieu à une structure plus dense de cellules virtuellement fermées. La densité de l'os spongieux varie ainsi de 0,05 à 0,7. (Vashishth *et al.*, 2007).

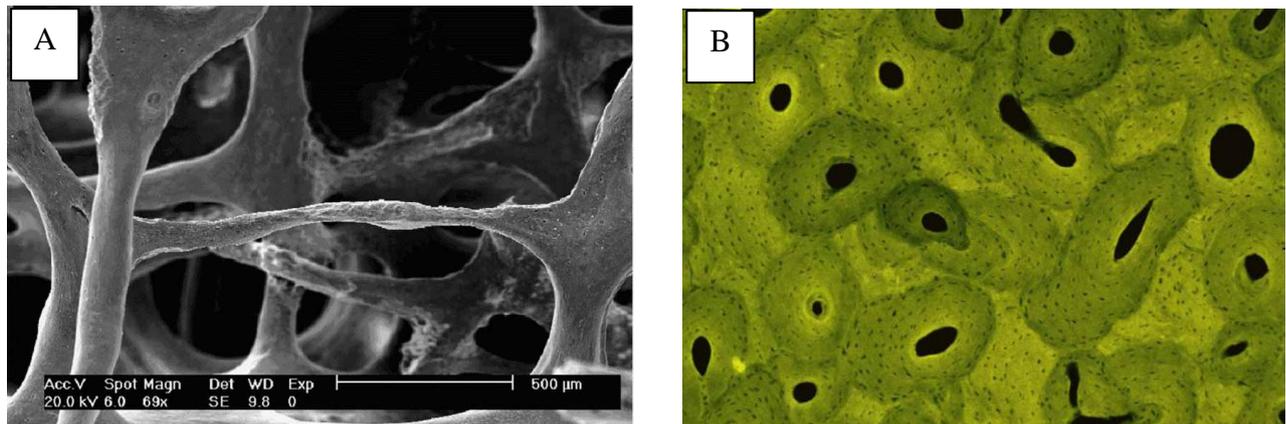


Figure 3 : os trabéculaire (A) et os cortical (B) d'après Liebschner *et al.* (2003)

## 1.4. Histologie du tissu osseux

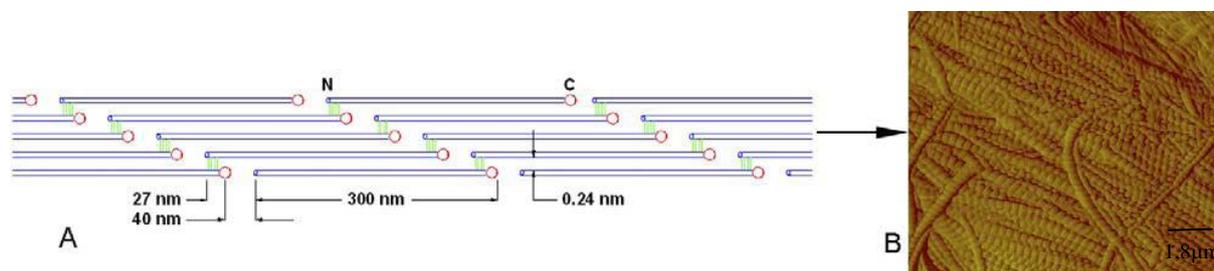
### 1.4.1. La matrice organique

La matrice organique osseuse occupe environ 32% du volume osseux. Elle est composée principalement de collagène de type I (90%) ainsi que d'une fraction de faible importance volumique mais de fort intérêt physiologique de protéines non collagéniques.

#### 1.4.1.1. Le collagène de type I

Le collagène de type I est sécrété par les ostéoblastes sous forme de pro-collagène I ayant la forme d'un cylindre formé par une triple hélice de chaînes polypeptidiques de 1000 acides aminés. La succession des acides aminés laisse apercevoir un motif répétitif constitué de glycine qui est présente tous les 3 acides aminés et qui est retrouvée au centre de la super-hélice (Traub et Piez, 1971). Elle est bien souvent suivie de proline en seconde position puis d'hydroxyproline en troisième position. Une fois débarrassé de ses domaines non hélicoïdaux N et C terminaux, le pro-collagène a la capacité de s'auto-assembler en fibrilles de collagène : les molécules de collagène de 300 nm de long sur 1,2 nm de diamètre s'arrangent selon un motif bien précis : 35 à 40 nm séparent la tête de la queue de la molécule suivante. Les

molécules parallèles entre elles se recouvrent mutuellement de 27 nm. Ce recouvrement donne naissance, lors des observations microscopiques, à une striation caractéristique (Nyman *et al*, 2005).



**Figure 4 : Organisation moléculaire des fibrilles de collagène I (A) et striations observées au microscope à force atomique (B) d’après Nyman *et al*, 2005.**

Le collagène de type I représente environ 95% des collagènes de la matrice osseuse. Les collagènes de type III, V, VII et XII sont également présents mais en quantité moindre.

Collagens	Gene	Protein	Function
Type I	COL1A1 17q21.3-22 18 kb, 51 exons 7.2 and 5.9 kb mRNA COL1A2 7q21.3-22 35 kb, 52 exons 6.5 and 5.5 kb mRNA	$[\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)]$ $[\alpha 1(I)_3]$	Most abundant protein in bone matrix (90% of organic matrix), serves as scaffolding, binds and orients other proteins that nucleate hydroxyapatite deposition
Type X	COL10A1	$[\alpha 1(x)_3]$	Present in hypertrophic cartilage but does not appear to regulate matrix mineralization
Others: Type III Type V	COL3A1 2q24.3-q31 COL5A1 COL5A2 2q24.3-q31 COL5A3	$[\alpha 1(III)]_3$ $[\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)]$ $[\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)]$	Present in bone in trace amounts, may regulate collagen fibril diameter, their paucity in bone may explain the large diameter size of bone collagen fibrils
FACITS ?			

**Figure 5 : Caractéristiques des principaux collagènes retrouvés au sein de la matrice osseuse d’après Robey *et al*, 2002.**

#### 1.4.1.2. Les protéines non collagéniques

Les collagènes représentent la majeure partie des protéines osseuses. Néanmoins, de nombreuses autres protéines sont présentes et interviennent dans la physiologie de l’os.

### **Les protéoglycanes :**

Cette classe de molécules est caractérisée par la liaison covalente d'une protéine avec de longues chaînes polysaccharidiques (glycosaminoglycannes - GAG) elles-mêmes composées de chaînes linéaires sulfatées à des degrés variables composées de la répétition d'un diholoside de base et d'un autre ose. Les différentes sous-classes de protéoglycannes sont généralement caractérisées par la structure de la protéine ou la nature du GAG.

	Gene	Protein	Function
Versican (PG-100)	5q12-14 90 kb, 15 exons one splice variant 10, 9, 8 kb mRNAs	1 × 10 <sup>6</sup> intact protein, ~360 kDa core, ~12 CS chains of 45 kDa, G1 and G3 globular domains with hyaluronan-binding sites, EGF and CRP-like sequences	May "capture" space that is destined to become bone
Decorin	12q21-23 >45 kb, 9 exons alternative promoters, 1.6 and 1.9 kb mRNA	~130 kDa intact protein, ~38-45 kDa core with 10 leucine-rich repeat sequences, 1 CS chain of 40 kDa	Binds to collagen and may regulate fibril diameter, binds to TGF-β and may modulate activity, inhibits cell attachment to fibronectin
Biglycan	Xq27 7 kb, 8 exons 2.1 and 2.6 kb mRNA	~270 kDa intact protein, ~38-45 kDa core protein with 12 leucine-rich repeat sequences, exons, 2 CS chains of 40 kDa	May bind to collagen, may bind to TGF-β, pericellular environment, a genetic determinant of peak bone mass
Fibromodulin	1q32 8.5 kb, 3 exons	59 kDa intact protein, 42 kDa core protein with leucine-rich repeat sequences, one N-linked KS chain	Binds to collagen, may regulate fibril formation, binds to TGF-β
Osteoglycin (Mimecan)	9q21,3-22 33kb, 8 exons 3.7 kb mRNA	299 aa precursor, 105 aa mature protein leucine-rich repeat sequences	Binds to TGF-β, no GAG in bone, keratan sulfate in other tissues
Osteoadherin	9q21.3-22 4.5 kb mRNA	85 kDa intact protein, 47 kDa core protein, 11 leucine-rich repeat sequences, RGD sequence	May mediate cell attachment
Hyaluronan	Multigene complex	Multiple proteins associated outside of the cell, structure unknown	May work with versican-like molecule to capture space destined to become bone

**Figure 6 : Caractéristiques des protéoglycanes, des protéines à domaines répétés riches en leucine d'après Robey *et al.*, 2002.**

### *Aggrécane et Versicane :*

Ce sont deux protéoglycannes à chondroïtine sulfate.

L'aggrécane a été longtemps considéré comme spécifique du cartilage mais des ARNm codant ce protéoglycanne ont été retrouvés lors du développement osseux (Wong *et al.*, 1992). Il aurait le même rôle que le versican qui est impliqué dans la capture des espaces qui doivent évoluer en tissu osseux lors du développement (Fischer *et al.*, 1985). Le versicane est connu pour être lysé lors de la progression de l'ostéogenèse et il est intéressant de constater qu'il possède des séquences EGF-like (Zimmerman *et al.*, 1989) qui, une fois libérées, ont la capacité d'influencer le métabolisme des cellules de la lignée ostéoblastique. Lors de la progression de l'ostéogenèse, ces protéoglycannes sont remplacés par deux autres protéoglycannes : la décorine et le biglycane.

### *Décorine et Biglycane :*

Ces deux protéoglycannes sont présents en forte quantité au sein de l'os. Ils sont caractérisés par un domaine protéique contenant une séquence riche en leucine, caractéristique des protéines impliquées dans la morphogénèse (Fisher *et al.*, 1989). Ces deux protéoglycannes peuvent se lier au TGF- $\beta$  et réguler son activité et sa disponibilité (Schonherr *et al.*, 2000). Ils peuvent également se lier au collagène et possèdent des capacités inhibitrices de l'attachement cellulaire en se liant à la fibronectine (Grzesik *et al.*, 1994).

La décorine est synthétisée par les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes sécréteurs mais sa synthèse est très fortement diminuée lors du passage au stade ostéocytaire. La décorine n'apparaît pas être un agent de nucléation direct : aucun effet direct n'a été remarqué sur la précipitation de l'hydroxyapatite ou sur la croissance cristalline (Gokhale *et al.*, 2001).

Le biglycane est synthétisé par toutes les cellules de la lignée ostéoblastique : du pré-ostéoblaste à l'ostéocyte. Les animaux déficients en biglycannes développent une ostéopénie en perdant leurs capacités à achever leur minéralisation osseuse (Xu *et al.*, 1998). Le biglycane apparaît être un agent de nucléation direct : à faible concentration, il facilite la précipitation de l'hydroxyapatite alors qu'à haute concentration, il l'inhibe (Gokhale *et al.*, 2001).

### *Les protéines possédant une séquence répétée riche en leucine :*

Un grand nombre de ces protéines sont des protéoglycannes qu'il est possible de retrouver au niveau osseux. La fibromoduline a montré des capacités de liaison au TGF- $\beta$ , tout comme l'ostéoglycine (Ujita, 1985) mais aussi aux collagènes. La fibromoduline aurait des capacités

de régulation de la formation des fibrilles collagéniques (Hedbom *et al.*, 1993). L'ostéoadhérine interviendrait dans la médiation de l'attachement cellulaire à la matrice grâce à ses séquences RGD (Sommarin *et al.*, 1998). L'acide hyaluronique (hyaluronan) est un glycosaminoglycane non sulfaté largement distribué au sein des tissus conjonctifs. Cette molécule pourrait avoir une implication lors des phases de remaniement tissulaire dans la conservation des espaces conjonctifs en cours d'ossification (Fraser *et al.*, 1997).

### ***Les glycoprotéines :***

Les glycoprotéines sont des protéines portant un groupement osidique.

### **Les glycoprotéines non RGD.**

	Gene	Protein	Function
Alkaline phosphatase	1 50 kb, 12 exons alternative promoters, one RFLP 2.5, 4.1 4.7 kb mRNA	Two identical subunits of ~80 kDa, disulfide bonded, tissue specific post- translational modifications	Potential Ca <sup>2+</sup> carrier, hydrolyzes inhibitors of mineral deposition such as pyrophosphates
Osteonectin	5q31-33 20 kb, 10 exons, one RFLP, 2.2, 3.0 kb mRNA	~35–45 kDa, intra molecular disulfide bonds, $\alpha$ helical amino terminus with multiple low affinity Ca <sup>2+</sup> binding sites, two EF hand high affinity Ca <sup>2+</sup> sites, ovomucoid homology, glycosylated, phosphorylated, tissue- specific modifications	May mediate deposition of hydroxyapatite, binds to growth factors, may influence cell cycle, positive regulator of bone formation
Tetranectin	Two genes 12 kb, 3 exons 1 kb mRNA	21 kDa protein composed of four identical subunits of 5.8 kDa, sequence homologies with asialoprotein receptor and G3 domain of aggrecan	Binds to plasminogen, may regulate matrix mineralization

**Figure 7 : Caractéristiques des glycoprotéines osseuses selon Robey *et al.*, 2002**

### ***La phosphatase alcaline***

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme capable d'hydrolyser les esters monophosphates à pH physiologique [Wuthier et Register, 1984]. La PAL fait partie de la classe des protéines de membrane cellulaire (Thy-1 et N-CAM) qui sont liées de manière covalente au complexe phospholipidique du phosphatidyl inositol (PI) dans la membrane plasmique. Ainsi la PAL peut être libérée de la membrane cellulaire par une phospholipase C. Cette protéine liée à la membrane plasmique est un marqueur précoce de l'ostéogenèse et sa fonction est de fournir du calcium et du phosphate pour la croissance des cristaux d'hydroxyapatite [Owen *et al.*, 1990]. L'activité PAL est présente dans les pré-ostéoblastes et

ostéoblastes différenciés mais pas dans les ostéocytes (ostéoblastes enchâssés dans la matrice osseuse). Ainsi l'activité PAL augmente dès la phase de prolifération pour atteindre son maximum pendant la phase de synthèse de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) puis diminue au début de la minéralisation [Owen *et al.*, 1990].

*L'ostéonectine (ou Secreted Protein, Acidic, Rich in Cystein - SPARC) :*

L'ostéonectine a été nommée ainsi en raison de ses capacités à se lier au calcium, à l'hydroxyapatite et au collagène donc aux principaux composants de la matrice osseuse. Elle est également un agent de nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (Termine *et al.*, 1981). Elle est présente en grande quantité dans l'os mais intervient également dans le développement, la réparation ou la maturation de nombreux autres tissus conjonctifs (Purcell *et al.*, 1993). Les souris déficientes en ostéonectine développent une ostéoporose (Delany *et al.*, 2000). Au sein des tissus adultes, cette protéine est synthétisée par les cellules matures (chondrocytes hypertrophiques et ostéoblastes). Ses fonctions sont multiples : elle possède des capacités de régulation de la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, de maintien et de la modification de la morphologie cellulaire, de modification des interactions cellules-matrice. Elle a également des capacités de fixation aux ions métalliques et aux facteurs de croissance et une activité de modulation des activités enzymatiques (Yan *et al.*, 1999).

*La tétranectine :*

La tétranectine est une protéine ayant des capacités de liaison au plasminogène. Elle possède des capacités conformationnelles lui permettant de se lier au calcium et ainsi de réguler la minéralisation de la matrice extracellulaire (Nielsen *et al.*, 1997).

*Les glycoprotéines contenant un motif RGD :*

Un grand nombre de glycoprotéines de la matrice contiennent un motif RGD leur permettant de se lier aux intégrines cellulaires (Ruoslahti *et al.*, 1996).

RGD-containing glycoproteins	Gene	Protein	Function
Thrombospondins	TSP-1 - 15q15 TSP-2 - 6q27 TSP-3 - 1q21-24 TSP-4 - 5q13 COMP - 19p13.1 4.5–16 kb, 22 exons 4.5–6.1 kb mRNA	~450 kDa molecule, three identical disulfide-linked subunits of ~150–180 kDa, homologies to fibrinogen, properdin, EGF, collagen, von Willebrand, <i>P. falciparum</i> and calmodulin, RGD at the C terminal globular domain	Cell attachment (but usually not spreading), binds to heparin, platelets, type I and V collagens, thrombin, fibrinogen, laminin, bin, plasminogen and plasminogen activator inhibitor, histidine-rich glycoprotein, TSP-2 is a negative regulator of bone formation
Fibronectin	2p14-16, 1q34-36 50 kb in chicken, 50 exons, multiple splice forms, 6 RFLPs, 7.5 kb mRNA	~400 kDa with two non-identical subunits of ~200 kDa, composed of type I, II, and III repeats, RGD in the 11th type III repeat 2/3 from N terminus	Binds to cells, fibrin heparin, gelatin, collagen
Vitronectin	17q ~70 kDa, RGD close to N 4.5 kb, 8 exons, 1.7 kb mRNA	Cell attachment protein, terminus, homology to somatomedin B, rich in cysteines, sulfated, phosphorylated	binds to collagen, plasminogen and plasminogen activator inhibitor, and to heparin
Fibrillin	15q15-23, 5 (two different genes), 110 kb, 65 exons, 10 kb mRNA	350 kDa, EGF-like domains, RGD, cysteine motifs	May regulate elastic fiber formation
Osteopontin	4q13-21 8.2 kb, 7 exons, multiple alleles, one RFLP, one splice variant, several alleles 1.6 kb mRNA	~44-75 kDa, polyaspartyl stretches, no disulfide bonds, glycosylated, phosphorylated, RGD located 2/3 from the N-terminal	Binds to cells, may regulate mineralization, may regulate proliferation, inhibits nitric oxide synthase, may regulate resistance to viral infection, a regulator of bone resorption
Bone sialoprotein	4q13-21 15 kb, 7 exons, 2.0 mRNA	~46-75 kDa, polyglutamyl stretches, no disulfide bonds, 50% carbohydrate, tyrosine-sulfated, RGD near the C terminus	Binds to cells, may initiate mineralization
BAG-75	Gene not yet isolated, mRNA not yet cloned	~75 kDa, sequence homologies to phosphophoryn, osteopontin and bone sialoprotein, 7% sialic acid, 8% phosphate	Binds to Ca <sup>2+</sup> , may act as a cell attachment protein (RGD sequence not yet confirmed), may regulate bone resorption

**Figure 8 : Caractéristiques des glycoprotéines de la matrice osseuse contenant un motif RGD selon Robey *et al.*, 2002,**

### *Les thrombospondines :*

Les thrombospondines (TSP) sont une famille de protéines multifonctionnelles. Les TSP ont été décrites dans de nombreux de tissus en cours de développement dont l'os (Robey *et al.*, 1989). Au sein de l'os mature, il a été décrit 5 formes ont été décrites et numérotées de 1 à 5 (TSP-5 étant également appelée Cartilage Oligomeric Matrix Protein - COMP) (Adolph *et al.*, 1999 ; Newton *et al.*, 1999). Toutes les formes ont été décrites et sont synthétisées par différentes lignées cellulaires à différents stages de maturation et du développement. Ainsi, TSP-1, TSP-2, TSP-3 et COMP ont été retrouvées au sein de culture de cellules osseuses humaines alors que TSP-3, TSP4 et COMP n'ont pas été retrouvées au sein de cultures de

chondrocytes (Carron *et al.*, 1999). Leurs fonctions sont multiples : elles ont la capacité de moduler l'adhésion cellulaire, de se lier à l'héparine, aux plaquettes, aux collagènes de types I et V, au fibrinogène, à la laminine, au plasminogène et au *plasminogen activator inhibitor* (PAI)... (Hankenson *et al.*, 2000). La TSP-2 apparaît être un stimulateur de la résorption osseuse (Carron *et al.*, 1995).

#### *La fibronectine :*

La fibronectine est synthétisée lors des phases précoces de la formation osseuse. Sa synthèse est fortement augmentée au sein de la population ostéoblastique (Grzesik *et al.*, 1994). In-vitro, l'attachement des cellules osseuses à la fibronectine se produit par l'intermédiaire de récepteurs dédiés (récepteurs à la fibronectine  $\alpha_4\beta_1$ ) laissant accessible la séquence RGD (Grzesik *et al.*, 1994). L'interaction des cellules avec la fibronectine pourrait jouer un rôle important dans la séquence de maturation de la lignée ostéoblastique (Gehron et Robey, 2002).

#### *La vitronectine :*

La vitronectine est une protéine sérique retrouvée en faible quantité au sein des matrices minéralisées et plus particulièrement au sein du tissu osseux (Grzesik *et al.*, 1994). Elle possède un site d'attachement cellulaire et des capacités de liaison au *plasminogen activator inhibitor* (PAI).

#### *Les Fibrillines :*

Ce sont des glycoprotéines possédant des séquences répétées *EGF-like* et sont les principaux composants des microfibrilles. La mutation de leur gène est responsable du syndrome de Marfan qui présente des anomalies de croissance osseuse. (Ramirez *et al.*, 1999)

#### *Les Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation (SIBLINGs):*

Cette famille comprend un ensemble de glycoprotéines dont trois contiennent une séquence RGD : l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse (*Bone SialoProtein* – BSP) et la protéine matricielle dentinaire-1 (*Dentin Matrix Protein 1* – DMP-1). D'autres existent également telles que la sialoprotéine dentinaire (*Dentin Sialo-Protein* – DSP), la phosphoprotéine dentinaire (*Dentin Phospho-Protein* – DPP) (Butler *et al.*, 1995) ou la glycoprotéine osseuse acide (*Bone Acidic glycoprotein 75*- BAG-75) (Gorski *et al.*, 1997).

### *L'ostéopontine (Spp, BSP-I).*

Cette sialoprotéine est produite aux stades tardifs de la maturation ostéoblastique et plus particulièrement au moment de la formation matricielle précédant la minéralisation. *In vitro*, elle possède la capacité de médier l'attachement de nombreux types cellulaires grâce à des séquences RGD ainsi que la possibilité de lier les ions calcium avec une très forte affinité. Néanmoins, elle ne possède pas d'activité de nucléation de l'hydroxyapatite (Sodek *et al.*, 2000).

### *La sialoprotéine osseuse II (BSP-II) :*

Cette protéine comporte également un motif RGD et a été retrouvée essentiellement au niveau des zones en cours de minéralisation (en très faible quantité au sein des chondrocytes et des cartilages hypertrophiques, en quantité plus importante au sein de la fraction des ostéoblastes guidant la minéralisation matricielle et au sein de la population ostéoclastique (Bianco *et al.*, 1991). La BSP-II est donc essentiellement exprimée par les ostéoblastes fortement différenciés dans les stades précoces de minéralisation. Elle possède une forte affinité pour le calcium, un site RGD et également un pouvoir de nucléation (Stubbs *et al.*, 1997).

### *La protéine matricielle dentinaire (Dentin Matrix Protein -1 – DMP-1)*

Originellement suggérée comme spécifique de la dentine, cette protéine est également synthétisée par les ostéoblastes (De Souza *et al.*, 1997). Elle compose la matrice extracellulaire osseuse et dentinaire où elle joue un rôle critique lors des phases de minéralisation. Sa localisation est essentiellement nucléaire au sein des ostéoblastes non différenciés où elle joue un rôle important dans la régulation des gènes contrôlant la différenciation de ces cellules puis est phosphorylée et exportée dans la matrice lorsque les ostéoblastes se différencient (Ravindran *et al.*, 2008).

### *La sialoprotéine osseuse (Bone sialoprotéine – BSP) :*

La sialoprotéine osseuse est une glycoprotéine phosphorylée et sulfatée riche en acide sialique. Elle présente des analogies de structure avec l'OPN et possède notamment une séquence RGD lui permettant de se lier à des récepteurs tels que les intégrines notamment les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  [Sung *et al.*, 1998]. Elle n'est pas exclusivement produite par les ostéoblastes, des ARNm codant la BSP ayant été détectés également dans les ostéoclastes, les chondrocytes et les chondrocytes hypertrophiques [Bianco *et al.*, 1991 ; Masi *et al.*, 1995] et les plaquettes [Chenu et Delmas, 1992]. Elle fonctionne comme un nucléateur de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse *in vitro* et *in vivo* [Hunter et Goldberg

1993]. Elle représente un des marqueurs de la phase terminale de la différenciation ostéoblastique et apparaît être un marqueur précoce de la minéralisation (Robey *et al.*, 2002).

*Bone acidic glycoprotein 75 (BAG-75).*

BAG-75 est synthétisée par les ostéoblastes, elle est détectée en association avec l'ostéopontine et à la sialoprotéine osseuse et qui présente des capacités à se lier au calcium supérieures à celle des protéines précédentes. (Sato *et al.* 1992).

**Les protéines contenant de l'acide  $\gamma$ -carboxy glutamique.**

Les protéines contenant de l'acide  $\gamma$ -carboxy-glutamique sont également des composants importants de la matrice osseuse.

Gla-containing proteins	Gene	Protein	Function
Matrix Gla protein	12p 3.9 kb, 4 exons	~15 kDa, five Gla residues, one disulfide bridge, phosphoserine residues	May function in cartilage metabolism, a negative regulator of mineralization
Osteocalcin	1 1.2 kb, 4 exons	~5 kDa, one disulfide bridge, Gla residues located in $\alpha$ helical region	May regulate activity of osteoclasts and their precursors, may mark the turning point between bone formation and resorption
Protein S			May be made primarily in the liver, protein S deficiency may result in osteopenia

**Figure 9 : Caractéristiques des protéines de la matrice osseuse contenant de l'acide  $\gamma$ -carboxy-glutamique selon Robey *et al.*, 2002.**

*La protéine GLA matricielle ou matrix Gla protéine.*

La matrix Gla protein est une protéine détectée au sein des tissus nécessitant de la vitamine K pour leur physiologie. Sa production est augmentée par la vitamine D. Elle est, avec l'ostéocalcine, une des protéines majeures intervenant dans l'organisation du tissu osseux et la régulation de la minéralisation matricielle (Luo *et al.*, 1997).

*L'ostéocalcine :*

L'ostéocalcine (OC) est une protéine carboxylée au niveau de ses trois résidus d'acide glutamique par un processus vitamine K-dépendant. Elle n'a pas été détectée dans d'autres types cellulaires

que ceux produisant de l'os ou de la dentine [Hauschka *et al.*, 1989]. Elle est exprimée par les ostéoblastes matures et est souvent considérée comme le marqueur terminal de la différenciation ostéoblastique. L'expression de l'OC coïncide avec le début de la formation des nodules osseux et atteint un taux maximal durant la phase de minéralisation *in vivo* et *in vitro* [Owen *et al.*, 1990]. La fonction de l'OC semble être la régulation de la partie minérale de l'os, elle a en effet une grande affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite. *In vitro*, elle est un inhibiteur puissant de la croissance du cristal d'hydroxyapatite, ainsi que de sa nucléation [Boskey *et al.*, 1985 ; Hunter *et al.*, 1996].

### *La protéine S.*

La protéine S est une protéine vitamine K-dépendante synthétisée essentiellement par les hépatocytes, les mégacaryocytes, les cellules endothéliales et les ostéoblastes. Elle joue un rôle dans l'homéostasie de l'organisme. Son absence de synthèse entraîne des ostéopénies. (Maillard *et al.*, 1992).

### *Les protéines sériques.*

Serum proteins	Gene	Protein	Function
Albumin	4q11-22 17kb, 15 exons	69 kDa, nonglycosylated, one sulfhydryl, 17 disulfide bonds, high-affinity hydrophobic-binding pocket	Inhibits hydroxyapatite crystal growth
$\alpha_2$ HS glycoprotein	3 two RFLP 1.5 kb mRNA	Precursor protein of fetuin, cleaved to form A and B chains that are disulfide linked, Ala-Ala and Pro-Pro repeat sequences, N-linked oligosaccharides, cystatin-like domains	Promotes endocytosis, has opsonic properties, chemoattractant for monocytic cells, bovine analog (fetuin) is a growth factor

**Figure 10 : Caractéristiques des principales protéines sériques de la matrice osseuse selon Robey *et al.*, 2002.**

L'hydroxyapatite présente une capacité à adsorber les protéines sériques apportées par la circulation sanguine. Ainsi, un grand nombre d'entre elles peuvent être retrouvées au sein du tissu osseux : les immunoglobulines, les protéines de transport, les cytokines, les chemokines et les facteurs de croissance. Parmi ces dernières, il est important de noter que certaines sont synthétisées par les ostéoblastes (Delmas *et al.*, 1984).

Par ailleurs, l'albumine qui est synthétisée par le foie, se retrouve concentrée au niveau du tissu osseux. Des études *in-vitro* ont montré qu'à la concentration mesurée dans l'os,

l'albumine inhibe la croissance de l'hydroxyapatite par liaison directe sur les faces du cristal en formation ainsi que l'agrégation des cristaux (Garnett *et al.*, 1990).

Enfin, l' $\alpha$ 2-HS-glycoprotéine est présente dans le tissu osseux à des concentrations 100 fois plus importante que l'albumine et possède des fonctions chémo-attractantes pour les monocytes et aurait donc la capacité d'induire un influx de cellules aux capacités ostéoclastiques. (Nakamura *et al.*, 1999).

### **1.4.1.3. Les protéinases osseuses**

Les ostéoblastes n'ont pas seulement la capacité de synthétiser leur matrice extracellulaire mais ils ont également la capacité de la remodeler par la sécrétion de protéinases matricielles (Fuller et Chambers, 1995) Ces protéinases peuvent être classées en quatre groupes basés sur la structure et sur le mécanisme catalytique du site actif : les métalloprotéases, les protéases à sérine, les protéases à cystéine et les protéases aspartiques (D'Alonzo *et al.*, 2002).

#### *Les MétalloProtéases Matricielles (Matrix MetalloProteinases - MMPs).*

Les MMPs représentent un important groupe de protéases neutres impliquées, entre autres, dans la croissance et le remodelage osseux. Elles sont sécrétées sous forme inactive (pro-forme ou forme latente) dont le pro-domaine « pro » est constitué d'un pro-segment contenant un résidu cystéine lié au zinc de la partie active. Le clivage de ce pro-domaine entraîne une modification conformationnelle de l'enzyme menant à son activation. Les métalloprotéases sont un groupe majeur d'enzymes à même de dégrader la matrice. Il existe 26 MMPs humaines différentes identifiées et/ou clonées (Murray *et al.*, 2001). Il s'agit d'endopeptidases zinc-dépendantes. Elles partagent des éléments structuraux et fonctionnels et sont les produits de différents gènes (Massova *et al.*, 1998). Ce sont des enzymes relativement homogènes mais qui diffèrent tout de même par la nature des domaines qu'elles comportent (Twining *et al.*, 1994).

Plusieurs critères sont nécessaires à une enzyme présentant une action protéolytique pour appartenir à la famille des MMPs :

- l'existence d'un profil caractéristique en domaines conservés
- une capacité à dégrader un ou plusieurs substrats matriciels à pH voisin de la neutralité
- la présence d'un atome de zinc dans leur site actif et le besoin de calcium pour que l'enzyme soit active
- une sécrétion sous forme latente avec activation par d'autres protéases ou des agents organomercuriques
- une régulation de leur activité par des inhibiteurs tissulaires spécifiques.



Sous Groupe	MMP	Noms	Substrats
1. Collagénases	MMP-1	Collagénase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gélatine
	MMP-8	Collagénase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrécane, gélatine.
	MMP-13	Collagénase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatine
2. Gélatinases	MMP-2	Gélatinase A	Gélatine, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gélatinase B	Gélatine, Col IV, V
3. Stromélysines	MMP-3	Stromélysine-1	Col II, IV, IX, X, XI, gélatine
	MMP-10	Stromélysine-2	Col IV, laminine, fibronectine, élastine
	MMP-11	Stromélysine-3	Col IV, fibronectine, laminine, aggrécane
4. Matrilysines	MMP-7	Matrilysine-1	Fibronectine, laminine, Col IV, gélatine
	MMP-26	Matrilysine-2	Fibrinogène, fibronectine, gélatine
5. MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-15	MT2-MMP	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-16	MT3-MMP	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogène, fibrine
	MMP-24	MT5-MMP	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-25	MT6-MMP	Gélatine
6. Others	MMP-12	Macrophage	Elastine, fibronectine, Col IV
	MMP-19	Métalloélastase	Aggrecanne, élastine, fibrilline, Col IV, gélatine
	MMP-20	Enamelysine	Aggrecanne
	MMP-21	XMMP	Aggrecanne
	MMP-23	CMMP	Gélatine, caséine, fibronectine
	MMP-27	Epilysine	Inconnu
	MMP-28		Inconnu

Figure 12 : Les membres de la famille des MMPs d'après Patricia *et al*, 2005.

Les activateur du plasminogène (plasminogen activator - PA).

La voie du *plasminogen activator* est impliquée dans un grand nombre de processus physiologique tels que l'inflammation tissulaire, la fibrinolyse, l'ovulation, l'invasion tumorale, le remodelage tissulaire et la migration cellulaire. Par ailleurs, ces enzymes ont la capacité d'activer les MMPs. Leur régulation a lieu par le biais de membres de la famille des serpins tels que les PAI-1 et -2 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1* et -2), la protéase nexin-1 ou l' $\alpha$ 2-antiplasmine (Potempa *et al.*, 1994). Les PA sont de deux types : l'*urokinase-type plasminogen activator* (uPA) et le *tissue-type plasminogen activator* (tPA). La synthèse de ces activateurs par les ostéoblastes est augmentée par de nombreux agents (PTH,

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PGE<sub>2</sub>, IL-1α...) (De Bart *et al.*, 1995). Au contraire, d'autres sont connus pour les inhiber (Glucocorticoïdes, TGF-β, IGF-1...) (Lalou *et al.*, 1994).

#### Les protéases à cystéine :

Les protéases à cystéine et plus particulièrement certaines cathepsines permettent une lyse matricielle à faible pH et sont synthétisées essentiellement par les ostéoclastes (Blair *et al.*, 1993 ; Bossard *et al.*, 1996) mais également par les ostéoblastes (Mandelin *et al.*, 2006). Elles sont extrêmement importantes dans la physiologie osseuse : les animaux mutés pour la cathepsine K développent une ostéopétrose (Safting *et al.*, 2000).

#### Les protéases aspartiques :

Ce sont des enzymes lysosomiales contenant des résidus d'acide aspartique au niveau de leur site actif dont un de leur membre (cathepsine D) a été détecté par immunohistocalisation au sein des ostéoblastes et des ostéocytes (Ohsawa *et al.*, 1993).

#### Les protéases à sérine :

Les protéases à sérine peuvent être subdivisées en 4 sous groupes : les *chymotrypsin-like*, les *subtilisin-like*, les *alpha/beta hydrolases* et les *signal peptidases*. Leurs inhibiteurs peuvent être synthétisés et être localisés au sein de la matrice extracellulaire osseuse et jouer des rôles importants dans le contrôle de la dégradation osseuse et cartilagineuse (D'Alonzo *et al.* 2002).

### **1.4.2. La phase minérale**

Environ 65% du volume osseux sont occupés par la phase minérale. Elle est essentiellement composée de calcium et de phosphate mais contient également une faible proportion de carbonate ainsi que des traces de sodium, de magnésium, de potassium, de citrate, de fluor, d'HPO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou de strontium (Glimcher *et al.*, 1987). Ces minéraux sont principalement organisés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite (Roseberry *et al.*, 1931) de 50 nm de longueur, 25 nm de largeur et de 1,5 à 4 nm d'épaisseur mais il existe une proportion non négligeable de minéraux sous forme amorphe (phosphate tricalcique ou phosphate octocalcique) (Glimcher *et al.*, 1987). La minéralisation osseuse s'effectue après la mise en place de la trame organique : les cristaux prennent préférentiellement naissance au sein des lacunes existant au sein des molécules de collagène, le grand axe du cristal (l'axe c cristallographique) étant aligné avec le grand axe des fibrilles ((Landis *et al.*, 1996a et 1996b ; Robinson et Watson, 1952 ; Traub *et al.*, 1989). Malgré tout, la simple présence de ces

lacunes n'est pas suffisante à la bonne minéralisation de l'os : de nombreuses protéines interviennent dans la minéralisation osseuse.

### **1.4.3. L'eau**

L'eau occupe environ 25% du volume osseux. Elle est uniformément distribuée au sein du tissu osseux et est présente sous de nombreuses formes : libre dans les espaces lacunaires et vasculaires ou liée aux phases organiques ou minérales. En effet, l'eau est par nature une molécule polarisée qui a la capacité intrinsèque de se lier aussi bien aux corps minéraux ( $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ...) qu'aux corps organiques et plus particulièrement au niveau des groupements polaires (hydroxyproline, hydroxylysine du collagène par exemple). Au sein de la dentine, 30% de l'eau sont fermement liées à l'hydroxyapatite, 52% sont à la surface de macromolécules ou de cristaux et seuls les 18% restants sont libres dans les lacunes ou des tubules (Schreiner *et al.*, 1991). De par sa vascularisation plus importante, cette part libre devrait être plus importante au sein du tissu osseux.

### **1.4.4. Les cellules du tissu osseux**

#### **1.4.4.1. Présentation de la lignée ostéoblastique**

Selon Aubin (1998), il existe 6 grandes étapes morphologiques dans le développement des ostéoblastes : les cellules souches, les stades d'ostéoprogéniteur, de préostéoblaste, d'ostéoblaste, d'ostéocyte et de cellule bordante.

En amont des préostéoblastes, il existerait un pool de *cellules ostéoprogénitrices* de morphologie fusiforme. Leur localisation au niveau des tissus osseux serait plus disparate. Ces cellules seraient très proches des cellules indifférenciées retrouvées dans la moelle osseuse également nommées ostéoprogéniteurs.

Le *préostéoblaste* peut alors être considéré comme la cellule immédiatement précurseur de l'ostéoblaste. Il peut être distingué de l'ostéoblaste par sa localisation à distance des zones de formation osseuse (1 à 2 couches cellulaires) mais il possède une ultra-structure très proche de celle des ostéoblastes. Il synthétise également de la phosphatase alcaline. Cette cellule n'aurait qu'une capacité restreinte de prolifération.

Ainsi, les *ostéoblastes* se définissent comme des cellules post-mitotiques, cuboïdales, exprimant fortement la phosphatase alcaline, qui ont la capacité de synthétiser un grand

nombre de macromolécules associées à leur phénotype et de la matrice ostéoïde au niveau des zones de remaniements osseux.

Lors de l'ossification, un petit nombre de cellules (estimées à 20% des ostéoblastes actifs présents sur les fronts de synthèse osseuse) s'incorpore dans la trame osseuse au sein de petites lacunes liées les unes aux autres nommées ostéoplastes : elles prennent alors le nom d'*ostéocytes*. Lors de leur incorporation, ces cellules deviennent plus petites que les ostéoblastes desquels elles dérivent et perdent leur capacité de prolifération et de synthèse de phosphatase alcaline ainsi que la majorité de leurs organelles cytoplasmiques. Il est admis que ces cellules, au métabolisme extrêmement ralenti, seraient chargées de la réception et de la transduction des stress mécaniques de l'os. Enfin, si une faible proportion des surfaces osseuses connaissent un remaniement, la majorité de ces surfaces sont quiescentes et présentent à leur surface une couche d'ostéoblastes post-prolifératifs non actifs, de morphologie plate nommées *cellules bordantes*.

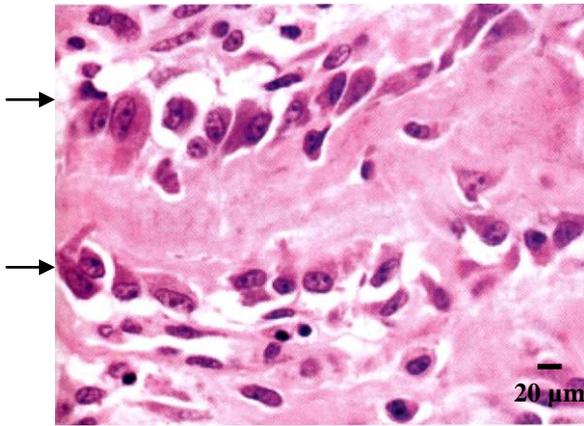
#### **1.4.4.2. Morphologie des cellules de la lignée ostéoblastique**

*Les ostéoprogéniteurs :*

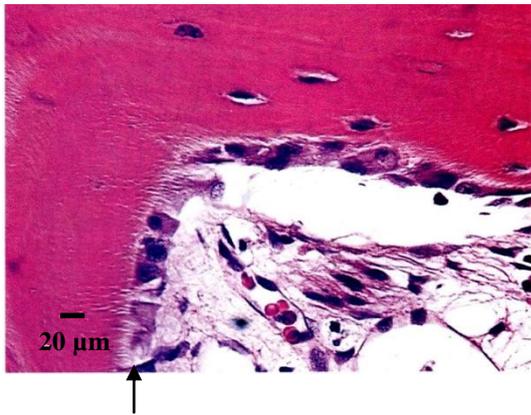
Les cellules ostéoprogénitrices présentent un aspect fusiforme sans avoir de caractéristique morphologique particulière (Manolagas *et al.*, 1995).

*Les ostéoblastes et cellules bordantes :*

Les ostéoblastes recouvrent l'intégralité des surfaces osseuses. Leur morphologie est directement liée à leur état métabolique. Les ostéoblastes non actifs présentent une morphologie fusiforme. Les ostéoblastes sécréteurs sont de forme polyédrique à cuboïdale. Les ostéoblastes métaboliquement actifs ont une taille variant de 10 à 80  $\mu\text{m}$  avec une moyenne de 20 à 30  $\mu\text{m}$  et présentent un cytoplasme amphiphile ou basophile abondant. Ils présentent un grand nombre d'extensions cytoplasmiques en direction des ostéoblastes adjacents et des ostéocytes avec lesquels ils communiquent grâce à des *gap junctions*. Leur noyau est déporté à l'opposé de la surface osseuse qu'ils synthétisent et présente un nucléole bien visible et un halo péri-nucléaire proéminent constitué d'un appareil de Golgi large et bien développé. L'ostéoblaste est donc une cellule polarisée. Son cytoplasme comporte également un important réticulum endoplasmique granuleux, de nombreuses mitochondries ainsi que de nombreux lysosomes (Rosenberg *et al.*, 2007).

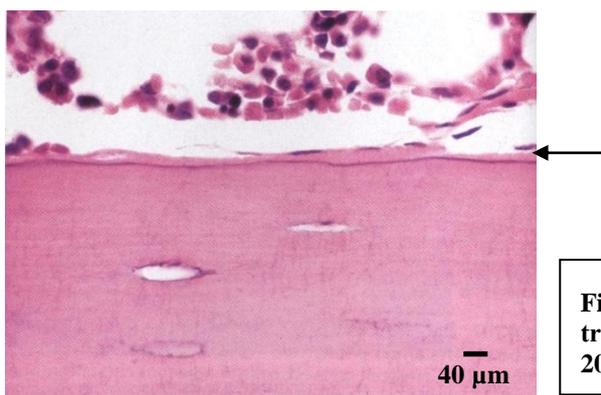


**Figure 13 : Ostéoblastes actifs recouvrant un trabécule osseux d'après Rosenberg *et al.*, 2007.**



**Figure 14 : Ostéoblastes actifs formant de l'os lamellaire. A noter, à droite de la microphotographie, des ostéoblastes qui s'aplatissent et prenant une morphologie d'ostéoblastes inactifs d'après Rosenberg *et al.* 2007.**

Lors des phases d'activité de synthèse réduites, les cellules s'aplatissent et s'allongent sur la surface osseuse. Elles prennent alors le nom de cellules bordantes. Leur cytoplasme ressemble alors à celui des fibroblastes quiescents.

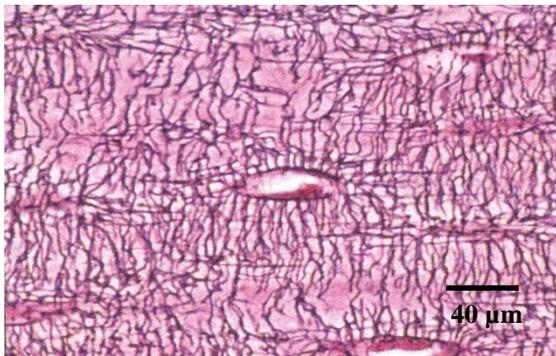


**Figure 15 : Cellules bordantes recouvrant un trabécule osseux d'après Rosenberg *et al.*, 2007.**

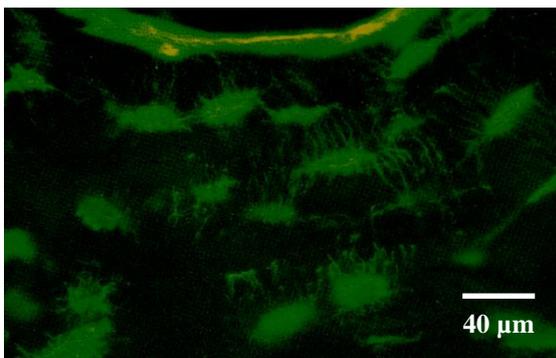
Leur fonction principale réside dans la synthèse de la matrice osseuse (ostéoïde) mais elles sont également responsables de l'initiation et de la régulation de la minéralisation matricielle et de puissants régulateurs de la physiologie des cellules présentes à leur voisinage par actions paracrines voire autocrines.

### *Les ostéocytes :*

Lors de la synthèse osseuse, des ostéoblastes peuvent être emmurés au sein de l'ostéoïde puis de la matrice osseuse minéralisée au sein de logettes nommées ostéoplastes. Ils prennent alors le nom d'ostéocytes. Ces cellules ont une demi-vie estimée à 25 ans (Knothe et Tate, 2004) et présentent un grand nombre d'extensions cytoplasmiques leur permettant de communiquer entre elles ainsi qu'avec les ostéoblastes les côtoyant. Leur nombre, leur taille, et leur forme sont variables en fonction du type d'os où elles sont présentes. Ainsi, ils sont larges, cuboïdaux et nombreux au sein de l'os tissé (*woven bone*) mais de taille plus petite et de forme plus fibroblastique au sein de l'os lamellaire (Rosenberg *et al.*, 2007) Ainsi, les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses composant le tissu osseux : Marotti *et al.* (1990) dénombrent environ 10000 ostéocytes par  $\text{mm}^3$  et 50 extensions cellulaires en direction d'autres ostéocytes ou en directions des cellules bordantes par cellule.



**Figure 16 : Ostéocyte dans son ostéoplaste d'après Rosenberg *et al.*, 2007.**



**Figure 17 : Réseau ostéocytaire marqué par la tétracycline et révélé par fluorescence d'après Rosenberg *et al.*, 2007**

Leur fonction est essentiellement dévolue à la mécanotransduction. Ces cellules ont la capacité de transformer un stimulus mécanique en signaux biologiques qu'elles transmettent aux cellules de leur environnement proche grâce à leurs extensions cytoplasmiques et leur *gap junctions*. Elles ont également un grand rôle dans le maintien de l'homéostasie minérale de l'organisme (Cullinane *et al.*, 2002).

### **1.4.4.3. Développement ostéoblastique**

Selon Aubin et Triffitt (2002), la nomenclature précise des cellules souches qui ont la capacité de donner naissance aux cellules osseuses n'a pas fait l'objet d'un consensus précis. De nombreux termes ont été utilisés par le passé pour les décrire. Historiquement, divers termes ont été employés : « cellules souches des tissus conjonctifs » (*conjointive tissue stem cells*), « cellules souches stromales » (*stromal stem cells*), « cellules souches stromales fibroblastiques » (*stromal fibroblastic stem cells*) et « cellules souches mésenchymateuses » (*mesenchymal stem cells - MSC*). Cette dernière terminologie introduite par Caplan *et al.*, 1991, demeure la plus utilisée actuellement même si elle reste relativement ambiguë. En effet, l'appellation donnée aux cellules souches comporte le plus souvent le nom des cellules auxquelles elles donnent naissance et non le nom de leur origine tissulaire embryonnaire. Le terme est ambigu car les tissus mésenchymateux embryonnaires donnent naissance non seulement aux tissus osseux mais également aux cellules du sang, ce que les MSCs ne font pas. L'étude de la différenciation cellulaire de ces MSC comporte un grand nombre de transitions cellulaires qui ont été décrites lors d'études morphologiques et moléculaires (Aubin et Liu, 1996).

### **1.4.4.4. Ontogénie des ostéoprogéniteurs**

Friedenstein (1990) a montré que les cellules de la moelle osseuse avaient des capacités prolifératives importantes et la capacité de former de l'os si elles étaient placées *in vivo* dans des chambres de diffusion. Les études de Friedenstein *et al.*, 1990, de Owen *et al.*, 1998, et de Prockop *et al.*, 1997, ont également démontré que ces cellules avaient la capacité d'évoluer en cellules de la lignée osseuse mais également en cellules des lignées chondroblastiques, adipocytaires, myoblastiques ou fibroblastiques. Ces cellules furent nommées CFU-F (*Colony Forming Units – Fibroblastics*). L'approfondissement de l'étude de ces cellules a révélé que leur différenciation se faisait par un passage par un éventail de stades de différenciation. Kuznetsov *et al.*, (1997b), ont montré que les CFU-F étaient extrêmement hétérogènes du point de vue de leur taille, de leur morphologie ou de leur potentiel de différenciation. Les CFU-F ont alors été divisées en sous groupes en fonction de leur expression de la phosphatase alcaline (CFU-ALP) et de leurs capacités à se différencier vers la voie ostéoblastique (CFU-O). Ces cellules peuvent être détectées parmi les cellules stromales mais également dans les populations dérivées de cultures d'explants de calvaria ou de tout autre os. Les études de Nuttall et Gimble (2000) ont montré l'existence de précurseurs communs aux ostéoblastes et aux adipocytes et Park *et al.*, 1999 ont proposé la possibilité de dédifférenciation de l'adipocyte vers l'ostéoblaste en passant par un phénotype fibroblastique possédant des

capacités de prolifération importantes. Nuttall *et al.*, (1998) ont également démontré que des ostéoblastes différenciés au point d'exprimer l'ostéocalcine pouvaient être rapidement transformés en adipocytes si une transfection avec PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2*) avait lieu. Un grand nombre d'études a démontré l'existence d'un progéniteur commun aux voies ostéogénique et chondrogéniques (revue de Aubin, 1998). Toutes ces études aboutissent à la conclusion que les modèles de cultures cellulaires issus d'explants impliquent la possibilité de présence de cellules peu ou pas différenciées ou de progéniteurs ayant une bi, voire une multi-potentialité ainsi qu'une relative plasticité dans leur phénotype. Cette hétérogénéité pose un réel problème dans nos capacités de détermination de l'état de différenciation précis des cultures. Il est important de noter que ce paramètre est également présent si l'on considère les tissus osseux dans leur globalité.

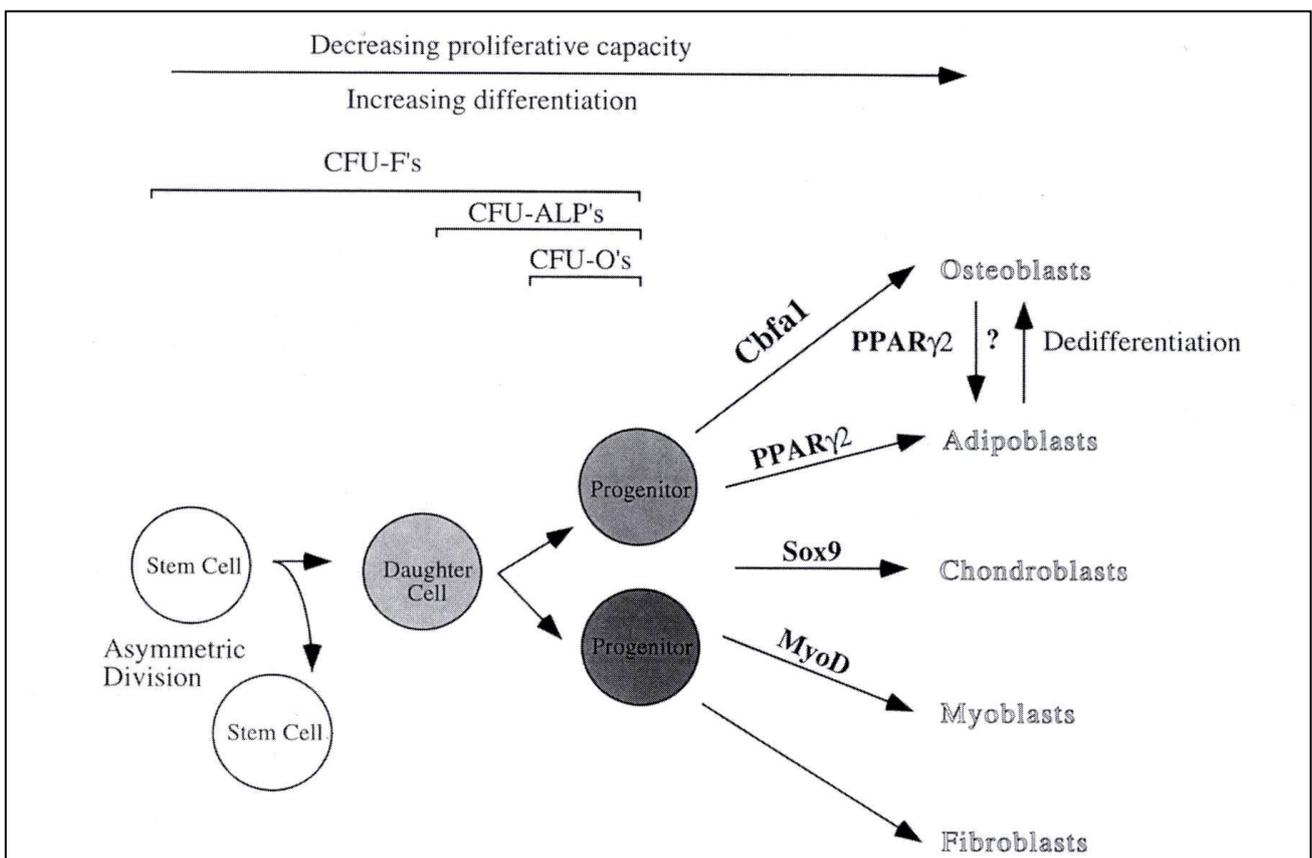


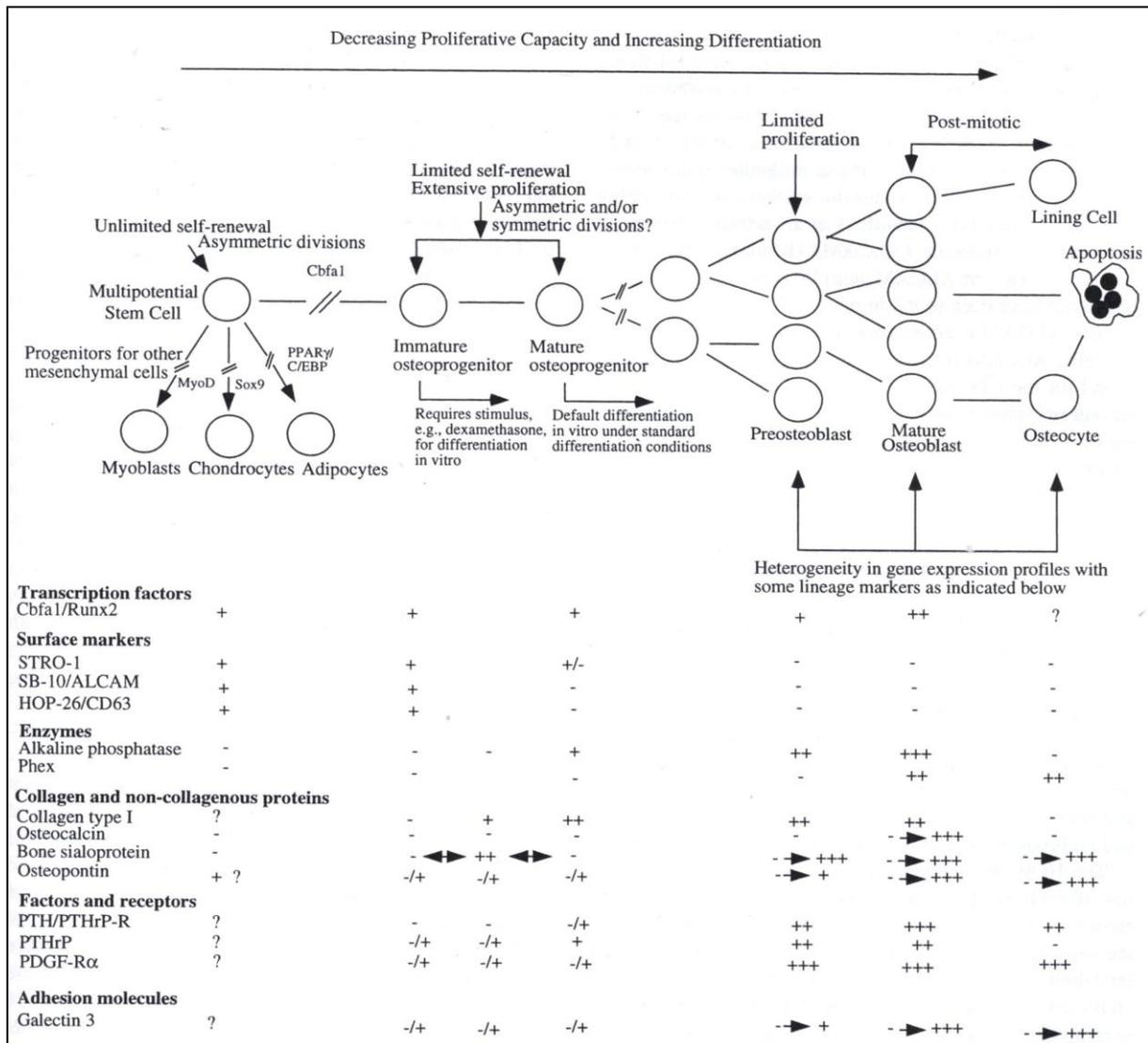
Figure 18 : Evolution de la cellule souche mésenchymateuse selon Aubin (1998).

#### 1.4.4.5. Contrôle du développement ostéoblastique

De nombreuses études ont tenté de percer le secret du développement et de la différenciation ostéoblastique. Selon Perry et Rudnick (2000), les études de différenciation ont été menées à partir du paradigme général selon lequel l'induction d'un facteur de transcription permettrait

d'initier l'expression séquentielle d'autres facteurs de transcription aboutissant à l'activation ou à la répression de gènes spécifiques codant le phénotype. Ainsi, Rose et Spiegelman (2000), ont montré le rôle clé de PPAR $\gamma$ 2 en partenariat avec la famille de C/EBP (CCCAAT/*Enhancer Binding Protein*) dans la différenciation adipocytaire et Crombrughe *et al.* (2000), l'importance de SOX9 dans la différenciation chondroblastique, l'expression de nombreux gènes chondrogéniques et la formation cartilagineuse. MyoD a également été montré comme ayant un rôle clé dans la différenciation myogénique.

La voie ostéoblastique semble déterminée par l'expression de RUNX2 (Runt related X2). En effet, Banerjee *et al.* (1997), et Ducy *et al.* (1997), ont identifié RUNX2 par sa capacité à réguler l'expression de gènes spécifiques et plus particulièrement de l'ostéocalcine. Par ailleurs, l'expression ectopique de RUNX2 dans des cellules non ostéoblastiques permet l'expression par ces cellules de gènes ostéoblastiques dont l'ostéocalcine. La délétion de Cbfa1, le gène équivalent de RUNX2 au sein des modèles murins, conduit à la formation d'animaux dont le squelette est essentiellement composé de chondrocytes et de cartilages sans formation d'os ou d'ostéoblastes (Komori *et al.*, 1997). Pour cela, Yamagushi *et al.* (1999), considèrent Cbfa1/RUNX2 comme le marqueur de différenciation connu le plus précocement exprimé par les ostéoblastes. Son expression est très importante au sein des cellules parcourant la voie ostéoblastique et son expression est connue pour être augmentée lors du traitement des cultures par les BMPs ou les autres facteurs qui stimulent la formation osseuse. Néanmoins, selon Lee *et al.*, (1999), et Wang *et al.* (1999), à la différence de MyoD ou PPAR $\gamma$ 2, Cbfa1/RUNX2 n'est pas un gène clé de la différenciation ostéoblastique : son expression est nécessaire mais pas suffisante à l'induction de la différenciation ostéoblastique et RUNX2 est exprimé au sein des chondrocytes hypertrophiques.



**Figure 19 : Représentation schématique des étapes présumées de différenciation des ostéoprogéniteurs et de l'expression des gènes marqueurs des cellules ostéoblastiques selon Aubin (1998). ( - signifie non détectable, +/- à +++ échelle allant de détectable à très fortement exprimé, => expression hétérogène)**

#### 1.4.4.6. Phénotype des cellules souches ostéoprogénitrices

De nombreux groupes se sont attelés à la mise au point d'anticorps reconnaissant des antigènes de surface marqueurs des MSCs. Six ont été décrits : STRO-1 (Simmons et Torok-Storb, 1991), SH-2, SH-3, SH-4 et SB10 (Bruder *et al.*, 1997, 1998) et HOP-26 (Joyner *et al.*, 1997). Il est important de noter qu'aucun d'entre eux n'est absolument spécifique de la lignée ou du stade de différenciation. L'un des premiers anticorps découvert fut STRO-1 et cible un antigène de surface dont l'expression est restreinte à une sous-population mineure de cellules de la moelle osseuse humaine qui inclut les CFU-F. Par ailleurs, la fraction STRO-1<sup>+</sup> de ces cellules est connue pour contenir les ostéoprécurseurs (Gronthos *et al.*, 1994). L'anticorps SB10, qui a été créé par Bruder *et al.* (1997), cible les cellules stromales de la moelle osseuse

et les ostéoprogéniteurs sans atteindre les cellules plus différenciées exprimant la phosphatase alcaline. L'anticorps SH-2 est connu pour se lier à l'*endoglin* (CD105) qui est également le récepteur III du TGF- $\beta$  présent au sein des cellules du tissu conjonctif stromal, des cellules endothéliales, des cellules du syncytiotrophoblaste et des macrophages (Barry *et al.*, 1999). Cette molécule pourrait potentiellement être impliquée dans la voie du TGF- $\beta$  et dans le contrôle de la différenciation chondrogénique des MSCs. L'anticorps HOP-26 cible plus particulièrement les fibroblastes de la moelle osseuse qui ont la capacité de former des tissus osseux au sein du périoste (Joyner *et al.*, 1997). Les plus forts taux de synthèse de l'antigène ciblé par HOP-26 étant retrouvés au sein de la population des CFU-F, HOP-26 est considéré comme un bon marqueur de sélection de ces cellules. (Oreffo *et al.*, 2001).

L'expression de l'isoforme osseuse/hépatique/rénale de la phosphatase alcaline a été étudiée en parallèle de l'expression de l'antigène détecté par STRO-1 au sein de la population capable d'ostéodifférenciation. Les cellules n'exprimant que STRO-1 apparaissent être des ostéoprécurseurs précoces qui n'ont pas encore les capacités de synthèse des protéines constitutives de l'os (sialoprotéine osseuse, ostéopontine, ou récepteur de l'hormone parathyroïdienne). Ainsi, les cellules STRO-1<sup>-</sup>/ALP<sup>+</sup> et STRO-1<sup>-</sup>/ALP<sup>-</sup> sont considérées comme des ostéoblastes différenciés alors que les cellules STRO-1<sup>+</sup>/ALP<sup>+</sup> sont considérées comme des cellules dans une phase intermédiaire de développement et les cellules STRO-1<sup>+</sup>/ALP<sup>-</sup> sont considérés comme des pré-ostéoblastes (Gronthos, 1999).

Les CFU-O représentent la phase terminale de différenciation et de prolifération des ostéoprogéniteurs. De nombreuses études ont retrouvé de faibles concentrations (<1%) de ces cellules au sein des cultures d'explants de calvaria fœtale de rat (Bellows et Aubin, 1989), de moelle osseuse de rat (Aubin *et al.*, 1999) et de souris (Falla *et al.*, 1993). Par ailleurs, il a été émis l'hypothèse de l'existence de deux populations distinctes d'ostéoprogéniteurs : une première ayant la capacité constitutive de se différencier *in vitro* et une autre, moins mature, qui nécessite l'induction de la différenciation par l'adjonction d'inducteurs spécifiques comme des corticoïdes tels que la dexaméthasone (Bellows *et al.*, 1987), des stéroïdes tels que la progestérone (Ishida et Heersche, 1997) ou des BMPs (Hugues *et al.*, 1995). L'observation de l'augmentation du nombre d'ostéoprogéniteurs retrouvés dans les modèles de cultures d'explants lors de l'adjonction de ces inducteurs permet d'émettre l'hypothèse de la coexistence de ces deux populations au sein de ces cultures. De nombreux auteurs pensent également qu'il existe un grand nombre de modes de différenciation ayant la capacité d'emprunter divers phénotypes qui aboutissent à la création d'un pool d'ostéoblastes. Pour

Aubin (1999), ces cellules aboutissent à un point final commun si on considère leur capacité à former la matrice ostéoïde mais demeurent très certainement différentes du point de vue de leur phénotype.

#### **1.4.4.7. Différenciation des ostéoprogéniteurs en ostéoblastes**

La différenciation des ostéoblastes a été scindée en 3 phases : une phase proliférative, une phase de maturation et de synthèse de matrice extracellulaire et une phase de minéralisation. L'expression de certaines macromolécules osseuses aide à signer le développement de l'ostéoblaste. Il a ainsi été démontré que la lignée ostéoblastique entamait sa différenciation bien avant la fin de sa phase multiplicative. De ce fait, une grande variabilité dans l'expression de ces macromolécules existe tout au long de la vie de l'ostéoblaste. Ainsi, la phosphatase alcaline voit sa synthèse augmenter tout au long de sa maturation en parallèle de la nécessité de minéralisation du milieu. Dans les phases quiescentes de la vie ostéoblastique (cellules bordantes, ostéocytes), cette enzyme n'est plus exprimée. L'ostéopontine connaît deux pics de synthèse : un premier lors des toutes premières phases de multiplication des cellules souches ostéoprogénitrices puis lors des phases tardives de différenciation cellulaire. Il est important de noter que cette protéine connaît une expression faible mais présente tout au long de la vie ostéoblastique. La sialoprotéine osseuse (*BSP-Bone sialoprotein*) connaît un pic de synthèse transitoire lors de la maturation des ostéoprogéniteurs puis voit son expression fortement augmenter lors de phases de transition des préostéoblastes vers les ostéoblastes en parallèle de la formation osseuse. L'ostéocalcine (OCN) est synthétisée lors de l'apparition de la minéralisation osseuse et est la seule protéine dont l'augmentation de la synthèse intervient après l'arrêt de la prolifération. Il est important de noter que plusieurs modèles de culture ont été employés afin de décrire les mécanismes de prolifération et de différenciation et que tous ont montré que des contradictions existaient dans l'expression phénotypique de ces modèles. Aubin (2002) considère donc cette mécanistique comme une base de réflexion et non comme un schéma absolu. En effet, les variations phénotypiques allant à l'encontre de ce modèle ont été associées aux différences des populations cellulaires étudiées (différences entre les espèces étudiées, grande hétérogénéité inhérente aux cultures cellulaires, utilisation de cellules en lignées...). Aubin (1999), Onyia *et al* (1999), par l'utilisation de cellules ROS (lignée cellulaire provenant d'ostéosarcome de rat), ont décrit des mécanismes de prolifération et de différenciation totalement différents de ceux décrits ci-dessus. Par ailleurs, des études de cellules uniques (*single cells analysis*), réalisées par Liu *et al* en 1997, ont démontré que cette diversité dans les mécanismes de différenciation et de multiplication

n'étaient pas la conséquence ou un artéfact des études *in vitro* : les études *in vivo* ayant abouti aux mêmes résultats. Ainsi, pour Candelieri *et al* (2001), seules les expressions de COLIA1, ALPL et PTHR1 (Récepteur de l'hormone parathyroïdienne) sont relativement ubiquitaires du fait des fonctions princeps que leur expression conditionne et par le fait que leur invalidation au sein de souris *Knock-Out* aboutit à un phénotype osseux fortement altéré signant la non redondance de ces fonctions. Les autres marqueurs de différenciation peuvent connaître des variations de synthèse plus importante sans modification du phénotype de la cellule ou de l'organisme les portant. Ainsi, les études d'invalidation de l'OCN (Ducy *et al*, 1996), de l'OPN (Yoshitake *et al*, 1999) ou de la BSP (Aubin *et al*, 1996b) ne concluent pas sur un blocage total de la différenciation ou de la maturation ostéoblastique.

#### 1.4.4.8. La lignée clastique

La résorption du tissu osseux dépend essentiellement de cellules très particulières issues de la différenciation de cellules de la lignée des monocytes-macrophages : les ostéoclastes. Ces cellules se trouvent essentiellement dans des lacunes de résorption nommées lacunes de Howship. Ce sont des cellules de grande taille dont le grand axe peut atteindre une centaine de micromètres ou plus pour un volume de  $200\ 000\ \mu\text{m}^3$ . En microscopie photonique, leurs contours paraissent assez réguliers sauf au contact du tissu osseux où il existe une bordure en brosse de quelques micromètres d'épaisseur. Ils contiennent de 20 à 30 noyaux et parfois plus. La microscopie électronique de ces cellules révèle un cytoplasme riche en mitochondries d'aspect dense et à crêtes serrées. L'appareil de Golgi existe sous forme de dyctyosomes séparés dont les saccules sont disposés concentriquement aux membranes nucléaires. Le réticulum endoplasmique est relativement peu abondant. La bordure en brosse est constituée de replis et d'expansions cytoplasmiques irréguliers qui s'enfoncent dans une matrice minéralisée désorganisée constituée de fentes communicantes formant un labyrinthe. En périphérie de ce labyrinthe, l'ostéoclaste adhère étroitement à une matrice minérale. Ce dispositif permettrait un scellement du labyrinthe formant ainsi un véritable espace clos favorable et nécessaire à la dégradation matricielle (Coujard et Poirier, 1980).

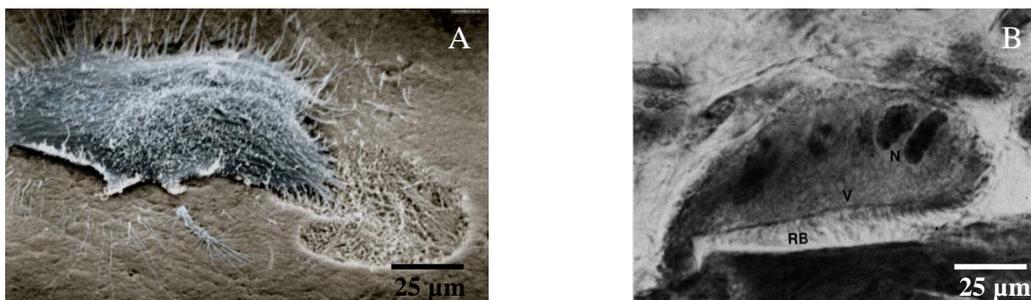


Figure 20 : Ostéoclaste en cours de résorption osseuse vu en microscopie électronique à balayage (A - Arnett, 2010) et microscopie électronique à transmission (B - Fetter, 1975).

## 1.5. La physiologie osseuse : le remodelage osseux

Le squelette est un organe dynamique spécialisé qui connaît un remodelage continu. De par sa spécialisation, l'os doit constamment s'adapter aux charges reçues dans le but d'optimiser sa résistance tout en ayant une masse la plus faible possible. Après une phase de développement et de maturation, l'os connaît une phase de maturité qui se caractérise par un remodelage incessant aboutissant à la régénération globale du squelette en une période estimée à 10 ans. Ce phénomène permet à cet organe très sollicité de ne pas accumuler trop de dommages ou de fatigues risquant de corrompre sa solidité (Martin *et al.*, 2008)

Pour cela, le phénomène de remodelage osseux se caractérise par la constitution d'unités multicellulaires incluant des ostéoclastes, chargés de la résorption osseuse, et des ostéoblastes, chargés de l'apposition (Manolagas *et al.*, 2000). Ces deux phénomènes ne peuvent se dissocier et forment un processus unique et régulé. Ainsi, une unité multicellulaire de base (*basic multicellular unit* – ou BMU) se caractérise par un front d'ostéoclastes suivi d'un amas d'ostéoblastes en relation avec les ostéocytes auprès desquels il existe un système vasculaire et une innervation. Physiologiquement, on retrouve environ 3 à 4 millions de nouvelles BMU par an dont un million de ces dernières sont actives à un moment donné. La durée de vie d'une BMU est estimée à 6 à 9 mois, sa progression est d'environ 25µm par jour qui aboutit à un remplacement de 0,025mm<sup>3</sup> d'os. La durée de vie d'un ostéoblaste différencié étant estimée à 3 mois et celle d'un ostéoclaste à 2 semaines, il apparaît clairement qu'un important apport de progéniteurs ostéoclastiques est nécessaire. (Parfitt *et al.*, 1994). Ainsi, selon Parfitt *et al* (1987), le remodelage osseux concerne 20% de la surface totale de l'os spongieux et la fréquence de remodelage d'un point donné du squelette a pu être estimée à 2 ans.

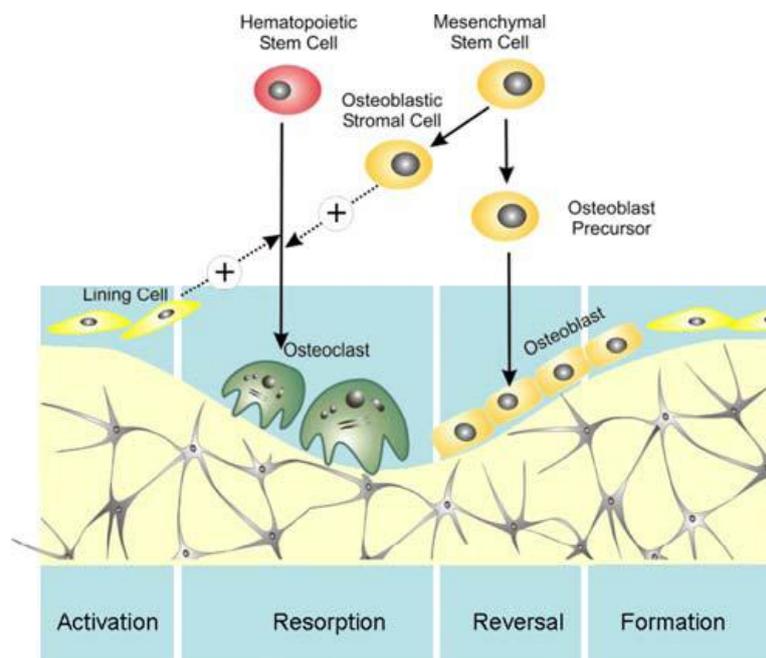


Figure 21: BMU et Remodelage osseux d'après Proff et Römer (2009).

### **1.5.1. Le couplage**

Le mécanisme de couplage du remodelage n'a pas encore été entièrement élucidé. Ainsi, selon Turner et Forwood (1995), les ostéocytes auraient un grand rôle dans l'activation du remodelage osseux qui prend racine dans l'activation des cellules bordantes. En effet, les ostéocytes ont la capacité de synthétiser en réponse aux stress mécaniques des médiateurs moléculaires connus pour influencer la balance osseuse (PTH, IGF, IL-1, IL-6, PGE, calcitriol, TNF, NO). Par ailleurs, Verborgt *et al* (2000) ont montré que les zones de micro-dommages, sièges de remaniements osseux, étaient corrélées à une apoptose des ostéocytes (Hazenbergh *et al.*, 2006), ce qui conduit Martin *et al.* (2000) à émettre l'hypothèse de l'existence d'une inhibition continue des cellules bordantes par les ostéocytes. En effet, la sclérostine, qui est sécrétée uniquement par les ostéocytes, a la capacité d'inhiber la voie Wnt par liaison aux récepteurs LRP5/6 et donc de limiter la prolifération et la survie ostéoblastique. Il est important de noter que la synthèse de sclérostine peut être fortement diminuée par un traitement par PTH ou PTHrP (Van Bezooijen *et al.* 2004, 2005 et 2007) ou par la mise en place de stress mécaniques (Robbling *et al.* 2008). Par ailleurs, les études *in vitro* montrent que les corps apoptotiques libérés lors de l'apoptose des ostéocytes avaient la capacité d'augmenter la formation ostéoclastique via un processus TNF $\alpha$ -dépendant. (Kogianni *et al.*, 2008). Enfin, le micro-environnement (présence de cytokines, état inflammatoire, facteurs de croissance, ...) aurait un grand rôle dans la physiologie des cellules bordantes et pouvait donc fortement influencer l'activation des BMUs.

### **1.5.2. La séquence de remodelage**

#### **1.5.2.1. Activation des cellules bordantes**

Une fois activées, les cellules bordantes changent de forme pour prendre une forme arrondie et sécrètent des collagénases. Il en résulte une dégradation de la matrice collagénique osseuse qui laisse apparaître à nu la phase minérale de l'os : ce nouvel état de surface, qui acquiert alors la capacité de fixer et d'activer les cellules circulantes, est nécessaire à l'initiation du processus de remodelage (Parfitt *et al.*, 1996) En effet, lors de l'incubation de surfaces osseuses saines avec des ostéoclastes, la présence de matrice organique collagénique en surface de l'os a le pouvoir d'inhiber la fixation des cellules clastiques. Au contraire, une surface traitée par de la collagénase, de façon à laisser apparaître une surface minérale exempte de collagène, a la capacité de fixer les ostéoclastes et donc de permettre une résorption (Chambers et Fuller, 1985). Par ailleurs, les ostéoclastes n'ont pas la capacité de synthétiser les métalloprotéases matricielles nécessaires à l'exposition de la phase minérale,

cette aptitude est pleinement possédée par les cellules de la lignée ostéoblastique (Fuller et Chambers, 1995).

Concomitamment, les cellules bordantes produisent le ligand au récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (receptor *activator of nuclear factor kappa B ligand* - *RANK-ligand* - (RANKL)) pouvant se lier au récepteur RANK présent à la surface des ostéoclastes et capables de les activer. Les cellules bordantes ont également la capacité de synthétiser de nombreux facteurs de croissance, interleukines et hormones dans le but de faciliter le recrutement des ostéoclastes. (Parfitt *et al.*, 1996). D'autre part, les cellules de la lignée ostéoblastique ont également la capacité de synthétiser un ligand compétitif non activateur soluble du récepteur RANK, nommé ostéoprotégérine (OPG), agissant comme un inhibiteur local de la formation des ostéoclastes : un contrôle local par la lignée ostéoblastique existe donc (Simonet *et al.*, 1997). Après activation, une phase de recrutement des ostéoclastes se met en place : les cellules stromales (ostéoblastes, cellules bordantes et leurs précurseurs) ayant été activées par les signaux des ostéocytes produisent du M-CSF (Macrophage *colony stimulating factor*) qui permettent de stimuler la prolifération et la différenciation des pré-ostéoclastes.

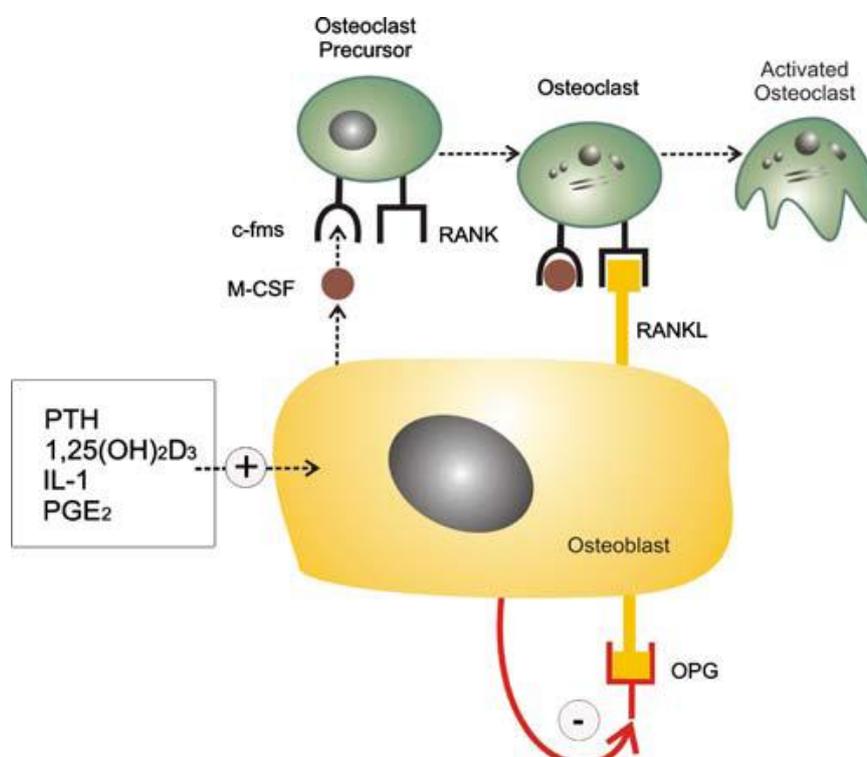


Figure 22 : : Interaction ostéoblaste/ostéoclaste et régulation osseuse d'après Proff et Römer (2009)

### **1.5.2.2. Résorption et Inversion**

Les précurseurs ostéoclastiques provenant de précurseurs hématopoïétiques de la lignée des monocytes/macrophages du sang ou de la moelle fusionnent suite à l'interaction RANK/RANKL et s'activent pour former des ostéoclastes matures. Une phase de résorption se met alors en place. Ericksen *et al* (1984) ont décrit deux phases de résorption : la première, très rapide, est formée de la mise en fonction des ostéoclastes appelés sur le site par les cellules bordantes et a été décrite comme pouvant durer 8 jours ; la seconde, plus lente, pouvant durer 32 jours entre ensuite en jeu et nécessite le recrutement des mononucléaires et une nouvelle activation. En effet, une fois activés, les ostéoclastes ont une durée de vie de 12 jours avant d'entrer en apoptose (Parfitt *et al.*, 1996). Les sites d'apoptose ayant été décrits au niveau de la jonction entre les zones de résorption et d'inversion, ce processus pourrait être un des signaux nécessaire à la création de la phase suivante : l'inversion. Par ailleurs, lors de la résorption et au moment de leur apoptose, les ostéoclastes libèrent de l'interleukine 6 ainsi que de l'annexine-II pouvant également signaler aux ostéoblastes la fin de la résorption (Parfitt, 1996). Durant la résorption, de nombreux facteurs de croissance déposés lors de la formation osseuse sont libérés tels que le TGF- $\beta$ , l'IGF ou le FGF. Ces facteurs (et plus particulièrement le TGF- $\beta$ ) pourraient être activés par la modification de pH créée par la synthèse de protons par les ostéoclastes et pourraient ainsi activer les ostéoblastes situés à proximité du site de résorption. Néanmoins, certains auteurs (Parfitt *et al.*, 2000) pensent que ces composés pourraient être inactivés par les enzymes protéolytiques également présentes au sein des sites de résorption. Par ailleurs, les peptides libérés par la digestion de la matrice protéique osseuse (matrikines) (Maquart, 1999) pourraient également intervenir dans la naissance de la phase de reformation osseuse.

### **1.5.2.3. La formation.**

La phase de reformation est alors caractérisée par une convergence des ostéoblastes vers le fond de la cavité qui est suivie d'une sécrétion importante d'ostéoïde. Après 15 jours de sécrétion, l'ostéoïde commence à se minéraliser. Ce phénomène dure entre 124 et 168 jours avec un rythme d'apposition de 1,2  $\mu\text{m}$  par jour au maximum de la phase d'apposition pour ensuite décroître vers zéro lorsque la cavité est remplie (Erickson *et al.*, 1984). La morphologie ostéoblastique évolue également passant du morphotype ostéoblastique au morphotype de cellule bordante. Certains d'entre eux sont inclus dans la matrice et se transforment alors en ostéocytes. Ces ostéocytes sécrètent alors des facteurs dont la sclérostine, ayant la capacité d'inhiber la voie Wnt et donc inhibant graduellement la néosynthèse osseuse (Martin *et al.*, 2000). Il est important de noter qu'au sein de la cohorte

ostéoblastique existant au sein de la BMU, les ostéoblastes sont tous du même âge et que, lorsque la BMU progresse, les nouveaux ostéoblastes sont ajoutés aux extrémités de cette dernière (Parfitt *et al*, 1996) ; une synchronisation de ces cellules existe donc et permet une néosynthèse harmonieuse de l'ostéoïde.

#### 1.5.2.4. Régulation ostéoblastique

La régulation des ostéoblastes est un phénomène complexe.

Ainsi, les *ostéoclastes* ont la capacité de réguler les ostéoblastes. L'éphrine (Eph), qui est un médiateur local de la physiologie et du développement cellulaire, intervient dans cette régulation via la médiation de l'adhésion et de l'attraction cellulaire mais aussi via la création de signaux pouvant séparer des cellules. Ainsi, l'EphB2 portée par des ostéoclastes peut se lier aux récepteurs EphB4 situés sur les ostéoclastes et entraîner une augmentation de la différenciation ostéoblastique et de la formation osseuse. (Zhao *et al*, 2006).

Les ostéoblastes possèdent également un système d'autorégulation. La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (*parathyroid hormone related protein* – PTHrP) peut agir comme un régulateur paracrine via le récepteur à l'hormone parathyroïdienne I (PTHrI) présent à la surface des ostéoblastes. Cette protéine est importante dans l'engagement et la maturation des progéniteurs dans la voie ostéoblastique. Elle permet une augmentation de la différenciation ostéoblastique ainsi qu'une réduction de l'apoptose des ostéoblastes mais augmente la synthèse de RANKL (Amizuka *et al*, 1996).

Les ostéoblastes s'autorégulent également via la voie Wnt. Cette voie a la capacité de réguler la croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules via la sécrétion de glycoprotéines agissant sur des complexes de récepteurs membranaires augmentant la concentration en  $\beta$ -caténines du cytoplasme et aboutissant à l'activation du facteur de transcription *T-Cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) (Moon *et al*, 2004). Ce contrôle du recrutement des ostéoprogéniteurs et donc de la prolifération des ostéoblastes pourrait expliquer en partie la régulation du remplissage des BMU (Martin *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les facteurs matriciels libérés lors de la résorption osseuse ont également la capacité de réguler le volume d'os formé (Mohan et Baylink, 1991). Un grand nombre de protéines extractibles de la matrice se sont révélées mitogènes pour les ostéoblastes ou capables de stimulation de l'ostéogénèse *in vivo* (Hauschka *et al.*, 1986). Citons : *l'insulin growth factor* (IGF) I et II (Spencer *et al*, 1991), *l'acidic and basic fibroblast growth factor* (FGF) (Rodan et al, 1992), le *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) I et II (Centrella *et al*, 1991), les *bone morphogenetic proteins* 2, 3, 4, 6 (Harris *et al*, 1994) et 7 (Vukicevic *et al*, 1994), le *platelet derived growth factor* (PDGF) (Rydzziel *et al*, 1992). Ainsi, les injections

intra-osseuses de TGF- $\beta$  ou de BMPs induisent un déséquilibre de la balance osseuse vers la formation osseuse. Certains de ces facteurs sont sécrétés sous forme inactive et nécessitent une activation chimique (baisse du pH) ou enzymatique (clivage protéolytique) pour avoir un effet biologique (TGF- $\beta$  par exemple). Le contrôle de ces paramètres aura donc également une action biologique.

L'environnement local influence également le remodelage osseux. Ainsi, la vascularisation a un rôle important. En effet, chaque BMU est associée à un capillaire : au niveau des surfaces trabéculaires, de petits capillaires sont fréquemment observés au contact des ostéoblastes et au niveau de l'os cortical, les capillaires colonisent les parois des cavités néoformées. Il est intéressant de noter que les études réalisées par étude de la cinétique de l'incorporation du  $^{35}\text{Sr}$  ont montré une corrélation entre le flux sanguin et le taux de synthèse des ostéoblastes et les indices biochimiques de formation ou de résorption osseuse (Reeves *et al.*, 1988). L'hypothèse d'une intervention des cellules endothéliales dans le couplage de la résorption/formation osseuse a été émise (Parfitt *et al.*, 2000). Ces cellules, positionnées stratégiquement au niveau des sites de résorption, auraient la possibilité de répondre aux signaux émis lors de phénomènes de résorption par sécrétion de facteurs mitogéniques pour les ostéoblastes. Par ailleurs, la vascularisation peut également intervenir via l'apport en nutriments et la mise à disposition des précurseurs cellulaires.

Le système nerveux a également été impliqué dans le contrôle du couplage. Les études anatomiques ont révélé une innervation dense et intime des tissus osseux et des fibres nerveuses ont été décrites au contact des vaisseaux au sein des trabécules osseux (Serre *et al.*, 1999). Les études immunohistochimiques ont montré que ces fibres appartiennent aux systèmes sympathique et sensoriel. Des terminaisons nerveuses contenant du glutamate ont été décrites au contact des cellules osseuses laissant penser qu'une innervation glutaminergique pourrait prendre place dans la balance osseuse. Par ailleurs, l'injection de leptine dans le cerveau des souris entraîne une diminution notable de la formation osseuse alors que cet effet n'était pas constaté si les injections avaient lieu par voie intraveineuse. Cette expérience montre qu'un contrôle du système nerveux s'exerce sur la balance osseuse (Ducy *et al.*, 2000). Par ailleurs, une régulation neuroendocrine a été également démontrée par l'étude de l'impact de la *thyroid-stimulating hormone* (TSH) (Seeman *et al.*, 2006) et de la *follicle-stimulating hormone* (FSH) (Li *et al.*, 2006) sur les cellules osseuses.

Les adipocytes ont également été incriminés dans le contrôle de la balance osseuse. Certains composés lipidiques auraient la capacité de promouvoir la différenciation adipogénique au détriment de la différenciation ostéogénique (Parhami *et al.*, 2000). Il a également été constaté que les zones occupées par les cellules graisseuses augmentaient proportionnellement en cas

de diminution du volume osseux minéralisé (Meunier *et al*, 1971). Par ailleurs, des expérimentations *in vitro* ont démontré que la co-culture d'adipocytes et d'ostéoblastes entraînait l'inhibition de la croissance ostéoblastique (Maurin *et al*, 2000).

Il existe donc, au sein de tout tissu osseux sain, un équilibre permettant un constant remaniement et une constante adaptation de l'architecture osseuse. Toutefois, dans certains cas (forces excessives dépassant les seuils de tolérance de l'os et aboutissant à des traumatismes, inflammations chroniques de longue durée aboutissant à des résorptions osseuses, ...), des bouleversements de cet équilibre peuvent aboutir à des pathologies destructrices vis-à-vis du tissu osseux. Les thérapeutiques visent alors à redonner une physiologie correcte aux tissus lésés. Toutefois, dans certains cas, l'apport de matière au sein des tissus lésés est nécessaire dans le but de redonner une résistance ou de restaurer la fonction osseuse et, bien souvent, d'éviter une cicatrisation qui pourrait être néfaste à l'avenir de ces tissus. L'emploi des biomatériaux est alors une possibilité offerte au thérapeute.

## **2. Les biomatériaux**

### **2.1. Introduction**

Selon la définition du consensus de Chester (1991), « les biomatériaux sont des matériaux destinés à être mis en contact avec des tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps ». Ils se différencient des médicaments en ce sens qu'ils ne réalisent pas leur objectif thérapeutique principal par un effet chimique à l'intérieur de l'organisme et n'ont pas besoin d'être métabolisés pour être actifs. Sont considérés comme biocompatibles les matériaux implantés dans l'organisme à titre temporaire ou définitif n'engendrant pas de troubles physiologiques, cellulaires ou immunitaires ; la biocompatibilité dépend donc essentiellement de l'interface et de l'interaction Biomatériau / Tissu hôte.

### **2.2. Classifications.**

La classification des biomatériaux peut se faire de par leur composition chimique ou leurs propriétés biologiques : une large panoplie de matériaux a été étudiée en vue d'applications médicales.

Selon Hoffmann (2004), il est ainsi possible de distinguer les biomatériaux selon leur composition chimique : il est possible de discerner ainsi :

- Les polymères,
- Les silicones,
- Les fibres,
- Les hydrogels,
- Les matériaux naturels,
- Les métaux,
- Les matériaux céramiques,
- Les composites.

Par ailleurs, le comportement biologique des biomatériaux implantables peut permettre de distinguer les biomatériaux ostéoinertes, les biomatériaux ostéoconducteurs et les biomatériaux ostéoinducteurs. Ces matériaux peuvent également classifiés en fonction de leurs biotolérance, leur bioinertie ou de leur bioactivité.

### **2.3. Les biocéramiques phosphocalciques**

Les biocéramiques représentent une grande famille qui possède de nombreuses applications biomédicales. L'os est composé d'une forte proportion de matière minérale dont la majorité est constituée de calcium et de phosphate organisés sous forme d'une céramique phosphocalcique particulière nommée hydroxyapatite (HA). Cette hydroxyapatite est non stœchiométrique, c'est-à-dire qu'elle présente un rapport Calcium/Phosphore inférieur à 1,67 en raison de l'incorporation dans sa trame de traces de constituants mineurs (magnésium, carbonate, chlore, fluor, strontium...). Au cours des 30 dernières années, de nombreuses formes de phosphates de calcium ont été étudiées et Driessens, en 1983, a montré que seuls les composés ayant un rapport Ca/P supérieur à 1 étaient utilisables pour les implantations biologiques. Il est ainsi possible de réaliser une classification en fonction de ce rapport : pour des valeurs comprises entre 1 et 1,33, on distingue des phosphates dicalciques parmi lesquels il est possible de discerner la monetite et la brushite (Johnsson *et al*, 1992; Hench et Best, 2004). Les phosphates octocalciques dont la whitlockite, auront un rapport Ca/P compris entre 1,33 et 1,5 (Hench et Best, 2004). Au delà, entre 1,5 et 1,67, les phosphates tricalciques cohabiteront avec les hydroxyapatites déficientes en calcium (Han *et al*, 2001; Hench et Best 2004) Enfin, les hydroxyapatites synthétiques sont stœchiométriques et possèdent donc un rapport Ca/P de 1,67.

Ca : P	Mineral name	Formula	Chemical name
1.0	Monetite	CaHPO <sub>4</sub>	Dicalcium phosphate (DCP)
1.0	Brushite	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Dicalcium phosphate Dihydrate (DCPD)
1.33	—	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Octocalcium phosphate (OCP)
1.43	Whitlockite	Ca <sub>10</sub> (HPO <sub>4</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	
1.5	—	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Tricalcium phosphate (TCP)
1.67	Hydroxyapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	
2.0		Ca <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	Tetracalcium phosphate

**Figure 23 : Classification des phosphates de calcium d'après de Groot, 1988.**

L'hydroxyapatite est une céramique phosphocalcique. Elle appartient à la famille cristallographique des apatites, un ensemble de composés possédant une même structure hexagonale (Kay *et al.*, 1964). Ses principales utilisations sont les revêtements de prothèses et les comblements osseux (blocs de céramique phosphocalcique, ciments ioniques...) (Jarcho *et al.*, 1981 ; De Groot *et al.*, 1993; Finkemeier *et al.*, 2002). L'hydroxyapatite est naturellement présente chez l'homme. Elle est le composant majeur de la phase minérale osseuse et représente environ 65-67% de la masse de l'os (Nanci *et al.*, 2008). Les apatites naturelles sont le plus souvent non stoechiométriques c'est à dire qu'elles présentent un Ca/P inférieur à 1,67 en raison de l'incorporation de constituants mineurs de l'environnement (cations, anions...) (Mayer *et al.*, 2000). L'hydroxyapatite synthétique, de formule Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, affiche quant à elle un rapport Ca/P de 1,67 et est donc stoechiométrique.

### 2.3.1. Les modes d'obtention

Selon Nanci (2008), le principal constituant de la phase minérale de l'os réside en une hydroxyapatite carbonatée déficiente en calcium. De nombreuses méthodes ont été étudiées afin de produire ce composé.

Selon Hench et Best (1998), deux méthodes sont principalement employées dans le but d'élaborer de l'hydroxyapatite :

- La précipitation en milieu aqueux qui peut être effectuée par réaction d'un sel de calcium avec un phosphate alcalin ou par réaction de neutralisation de l'hydroxyde de calcium ou du carbonate de calcium avec de l'acide phosphorique (cette réaction permettant d'obtenir de grandes quantités d'hydroxyapatite avec peu de matériel (Osaka *et al.*, 1991) ;

- La conversion d'un autre phosphate de calcium en HA par traitement thermique comme le montre le diagramme de phase suivant (fig 24) (De Groot *et al.* 1988, Hench et Best 1998).

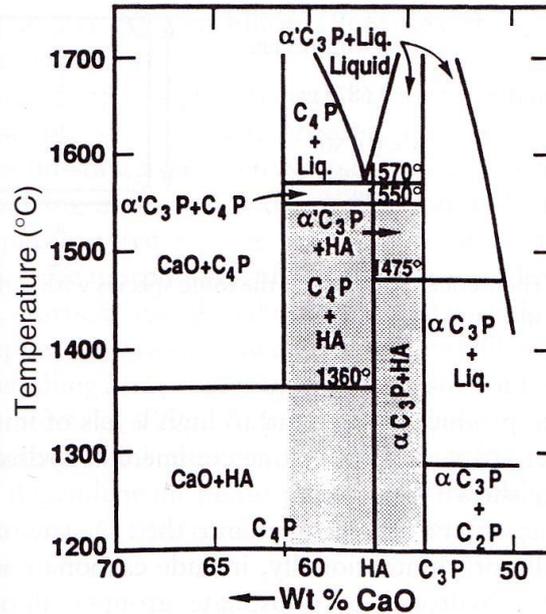
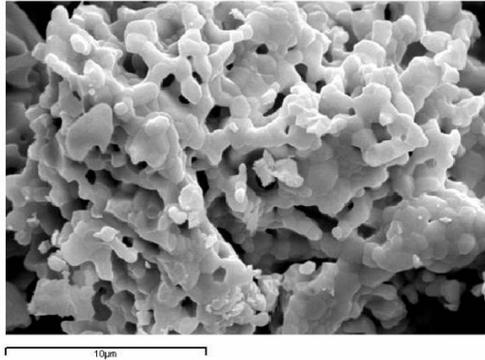


Figure 24 : Diagramme de phase des phosphates de calcium d'après de Groot *et al.*, 1988.

D'autres méthodologies existent :

- La réaction en phase solide a été décrite par Rhee *et al.* en 2002 : elle consiste à chauffer un mélange réactionnel constitué de pyrophosphate de calcium et de carbonate de calcium dans un rapport molaire de  $\frac{3}{4}$  afin d'obtenir un Ca/P de 1,67.
- La technique sol-gel consiste en la transformation d'une solution en un solide (Livage *et al.*, 1992). Ainsi, une solution de nitrate de calcium et de phosphate dissous dans de l'éthanol, permet d'obtenir après évaporation de l'éthanol, une poudre d'hydroxyapatite hautement pure (Jallot *et al.*, 2005) qu'il est possible de « doper » avec des éléments traces dans le but de leur donner des compositions particulières et ainsi des propriétés biologiques ou physiques précises. Cette approche a été suivie pour la conception du biomatériau utilisé dans ce travail.



**Figure 25 : Microphotographie en microscopie électronique à balayage (MEB) d'une poudre d'HA obtenue par sol-gel (Jallot *et al.*, 2005)**

La méthode de synthèse de l'HA va influencer fortement ses paramètres physiques (surface spécifique, taille des cristallites, tailles des porosités,...) ou chimiques (résorbabilité,...) et donc le comportement biologique de l'implant.

### **2.3.2. Paramètres physiques de développement des biomatériaux :**

#### **2.3.2.1. Influence de la forme :**

La forme des particules influence grandement la réponse cellulaire. Les formes sphériques ou quelconques sont relativement bien tolérées alors que les formes en aiguilles induisent une réponse inflammatoire augmentée (synthèse et sécrétion d'IL-18, d'IL1 $\beta$ , de MMPs et de la protéine ICE) de la part des monocytes humains. (Grandjean-Laquerriere *et al.*, 2004, Laquerriere *et al.*, 2003).

#### **2.3.2.2. Influence de la taille des pores :**

La taille des pores de la céramique conditionne sa colonisation par les cellules osseuses. Il est ainsi possible de distinguer les micropores (< 10  $\mu\text{m}$ ) propices à la diffusion des ions et des liquides, des macropores (100-600  $\mu\text{m}$ ) propices à la colonisation cellulaire et vasculaire osseuse. Si le biomatériau se présente sous forme de granules, la taille des particules influe sur l'activité des cellules osseuses. Ainsi, les petites particules d'hydroxyapatite (< 20  $\mu\text{m}$ ) ont un effet inhibiteur plus important sur la croissance des ostéoblastes que des particules plus grosses (Sun *et al.*, 1998). Des granules de taille intermédiaire (40-80  $\mu\text{m}$ ) sont par contre plus rapidement dégradés. Ce facteur influence également la résorbabilité du matériau.

### **2.3.2.3. Influence de la surface spécifique dans le cas de matériaux particuliers**

Des études réalisées sur l'interaction cellules / particules ont montré une grande influence de la surface spécifique des poudres qui se révèle plus importante que la dose elle-même. (Shanbhag *et al.* 1994; Shanbhag *et al.* 1997). La surface spécifique se définit comme la surface libre de particules en fonction de leur masse. Cette valeur permet d'adapter la surface cellulaire à la surface du matériau de façon à ne pas biaiser les études par un effet de surface supérieure du biomatériau. En effet, un grand nombre d'interactions cellules / matériaux se réalisant lors du contact entre le matériau et la cellule, la notion de rapport de surface entre ces deux acteurs apparaît essentielle. Cette notion est également retenue dans les études de pollution environnementale (Park JY *et al.*, 2010).

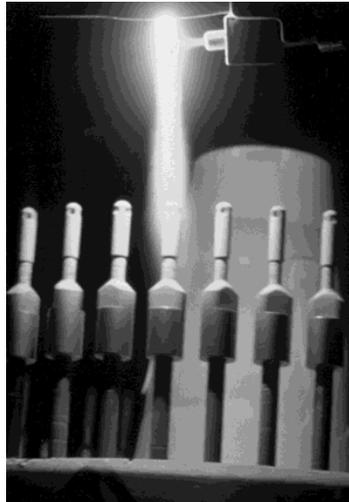
## **2.4. Applications des phosphates de calcium**

### **2.4.1. Les revêtements prothétiques**

*Dépôts par torche à plasma.*

Ce processus est utilisé industriellement depuis les années 80 (Geesink *et al.*, 1989 ; Furlong *et al.*, 1991) et est désormais la méthode la plus répandue pour appliquer l'hydroxyapatite à la surface des implants. La poudre d'HA est injectée dans la flamme du plasma et se trouve alors accélérée à plus de  $200 \text{ m.s}^{-1}$ . Elle va alors frapper et se coller au substrat sous l'effet de l'énergie cinétique (Fauchias *et al.*, 1992 ; Pfender *et al.*, 1994). L'impact a pour inconvénient de modifier la nature du phosphate de calcium par respect du diagramme de phase (figure 24) et donc d'induire la présence de différentes espèces phosphocalciques à la surface de l'implant tels que les phosphates tricalciques  $\alpha$  et  $\beta$  (TCP), le phosphate tétracalcique, l'oxyde de calcium ou le phosphate de calcium amorphe (De Groot *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1994). La présence de ces phases peuvent modifier la bioactivité de l'implant vis-à-vis de l'os hôte ; il convient donc de maîtriser et de normaliser la fabrication de ces phases (Sun *et al.*, 2001) en contrôlant les nombreux paramètres qui influencent ces variations (distance du substrat, taille des particules projetées, angle du substrat, débit de gaz du plasma ou refroidissement de la pièce... (Gross *et al.*, 1998)). Par ailleurs, le recouvrement ainsi obtenu n'est pas uniforme en densité et des altérations chimiques et structurales du matériau ont été décrites (Filiaggi *et al.*, 1991 ; Radin *et al.*, 1992).

Enfin, si le but recherché est l'augmentation de la fixation de l'implant à l'os, cet objectif n'est pas atteint en raison de la faiblesse de la jonction entre le titane et le revêtement qui donne des forces d'adhésion inférieures aux fixations obtenues par les prothèses non revêtues (Ong *et al*, 2004).



**Figure 26 : Torche à plasma en cours d'utilisation pour le recouvrement d'implants (Sun *et al*, 2001)**

#### *Dépôt par Electrodéposition.*

Cette technique de revêtement permet de recouvrir l'hydroxyapatite des substrats à faible température (65°C) (Dumelié *et al*, 2008) sans utiliser de poudre de biomatériau préalablement élaborée (Han *et al*, 1999). La technique se déroule en trois temps : de la brushite est déposée sur le substrat sous l'effet de l'électrodéposition puis elle subit un traitement hydro-thermique (125°C en atmosphère humide saturée) avant d'être cuite à plus de 400°C pour finalement aboutir à un revêtement d'hydroxyapatite stœchiométrique (Benhayoune *et al*, 2002). Bien que transposable dans le monde industriel, cette méthodologie est trop « chronophage » en l'état pour satisfaire aux exigences du marché.

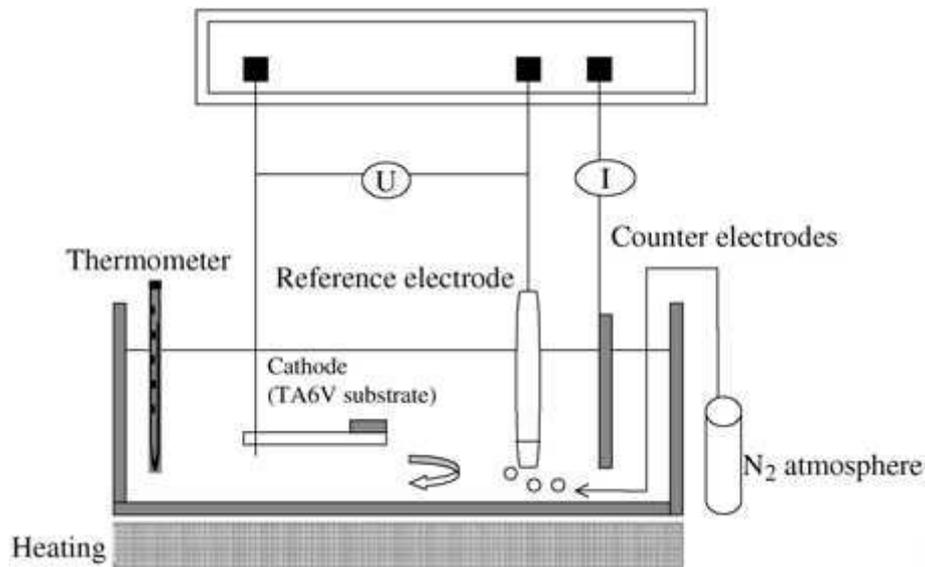


Figure 27 : Dispositif d'électrodéposition d'hydroxyapatite (Benhayoune *et al*, 2002)

#### 2.4.2. Le comblement osseux

Toute opération de résections et de curetage des tumeurs osseuses, même bénignes, peut entraîner des opérations de comblements osseux (Matsumine *et al*, 2004). La fréquence de ces interventions fait du tissu osseux le second tissu transplanté après le sang (Van Heest *et al*, 1999 ; Boyce *et al*, 1999) avec 2,2 millions d'interventions annuelles à travers le monde (Giannoudis *et al*, 2005). Les comblements osseux représentent une technique de choix dans le traitement des défauts osseux parodontaux en apportant une amélioration clinique démontrable en comparaison des débridements chirurgicaux seuls. Par ailleurs, les phosphates de calcium (hydroxyapatite) et les verres bioactifs n'ont pas montré de différence statistiquement significative avec les allogreffes. Néanmoins, le gold standard demeure la greffe osseuse autologue (Revue systématique de Reynolds *et al*, 2003). En effet, seule la greffe osseuse autologue permet de conjuguer au sein d'un biomatériau l'ostéoconduction, l'ostéoinduction et l'ostéogénèse tout en ayant une immunogénicité nulle et une sureté dans le risque d'apport exogène de microorganismes ou d'agents transmissibles non conventionnels. Malgré tout, l'autogreffe se heurte à un certain nombre d'inconvénients : la quantité de matériel osseux prélevable demeure limitée, la nécessité d'un second site opératoire impose un risque de morbidité et de iatrogénie. Par ailleurs, le prélèvement augmente nettement la durée de l'intervention.

Les autres techniques disponibles imposent une perte de qualité du matériau : les allogreffes (os humains lyophilisés déminéralisés ou non) permettent de conserver la biocompatibilité de l'os humain, d'éviter les complications liées au prélèvement de l'autogreffe, d'avoir un

matériau résorbable extrêmement bien toléré et de conserver les propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction de l'os autogène. (Mellonig *et al.*, 1996 ; Becker *et al.*, 1996). Mais il présente une grande fluctuation de son pouvoir inducteur et présente un risque de transmission virale ou d'agents transmissibles non conventionnels. Les xéno greffes sont également employées (os animal traité). Ces matériaux sont disponibles en grande quantité et permettent de réduire les risques de transmission sans toutefois les annuler (Berglungh et Lindhe, 1997). Les biomatériaux synthétiques sont donc les seuls capables d'éviter une transmission d'agents pathogènes et possèdent la caractéristique de pouvoir être obtenus en grandes quantités.

Par ailleurs, l'amélioration des techniques chirurgicales se basant sur des actes les moins invasifs possibles, les biomatériaux injectables sont de plus en plus recherchés. Les ciments phosphocalciques ont la capacité de durcir *in situ* (Miyamoto *et al.*, 1997, Ikenaga *et al.*, 1998, Gisep *et al.*, 2002). Il en existe de nombreuses formulations qui consistent en une poudre contenant les composés phosphocalciques et un liquide qui peut être de l'eau ou une solution aqueuse. Mélangés en proportions convenables, ils forment une pâte qui durcit, à température ambiante ou corporelle, par enchevêtrement des cristaux précipités dans la pâte (Fernandez *et al.* 1998-1 et 1998-2). Ces ciments présentent des problèmes concernant leur temps de prise, leur solidité mécanique, leur utilisation pratique ou leurs propriétés biologiques (Kurashina *et al.*, 1997). Des adjuvants peuvent être adjoints aux phosphates de calcium pour améliorer leur injectabilité sans modifier fondamentalement les réactions intervenant pendant le durcissement. Différents adjuvants comme l'acide lactique, le glycérol, le glycérophosphate ou encore le chitosan ont été testés dans le but d'améliorer l'injectabilité des ciments phosphocalciques (Leroux *et al.*, 1999).

D'autre part, de nombreux travaux cherchent à associer des poudres de phosphate de calcium avec un polymère vecteur comme granules de phosphates de calcium biphasiques (*Biphasic Calcium Phosphate* – BCP) associés à une solution d'hydroxy-propylmethyl-cellulose (Grimandi *et al.*, 1998) ou l'association de polymères d'acide polylactique–hydroxyapatite. Ici, l'acide polylactique polymérisé est comprimé à haute température avec une poudre d'hydroxyapatite. *In vivo*, le biomatériau a été utilisé pour combler un défaut osseux creusé à la surface externe du fémur de rats (Higashi *et al.*, 1986) et a montré des résultats prometteurs. Ces polymères peuvent être additionnés d'antibiotiques, de substances anticancéreuses ou de protéines possédant des capacités d'induction sur la formation osseuse (*bone morphogenic protein* par exemple) afin de former des composites d'hydroxyapatite pour améliorer la néoformation osseuse (Noshi *et al.*, 2000).

Dans cette optique, il apparaît que le développement de ces biomatériaux composites passe par le développement distinct d'un vecteur actif incorporant des charges actives dans le but de favoriser l'ostéointégration. Par ailleurs, Mac Arthur *et al* (2001) étend l'ingénierie tissulaire à l'emploi de la biologie et de la physiologie de l'hôte dans le développement de stratégies thérapeutiques visant le remplacement, la réparation, la maintenance ou l'amélioration de la fonction tissulaire. Ainsi, il apparaît que le développement d'une poudre minérale ayant la capacité d'induire une réaction tissulaire positive au sein de l'organisme receveur revêt un fort intérêt dans le développement des biomatériaux composites.

### **2.4.3. Une nouvelle approche thérapeutique : l'Individual Based Implant Therapy**

Selon Razzouk *et al.* (2010), la somme de connaissances acquises dans le domaine des biomatériaux et dans la physiologie osseuse doit mener les thérapeutes à considérer chaque patient comme un patient unique ayant des caractéristiques uniques. Ainsi le développement d'un biomatériau « multi-usages » et ubiquitaire semble ne pas avoir d'intérêt face à une recherche d'adaptation du biomatériau aux caractéristiques propres du patient. Cette nouvelle approche thérapeutique demande une grande multiplicité des biomatériaux de façon à permettre au thérapeute une approche individualisée. Dans ce but, de nombreuses approches ont visé à modifier les biomatériaux existants de façon à leur conférer une activité spécifique dans le but de les adapter aux particularités d'une pathologie ou d'un patient spécifique. Il est donc dorénavant possible d'adapter le biomatériau à la physiologie du tissu remplacé de façon à induire, lors de la réaction intervenant entre le biomatériau et les tissus hôtes, l'effet le plus adapté sur le tissu receveur. L'étude de ces réactions revêt donc un intérêt primordial lors de l'utilisation de matériaux au sein d'un l'organisme.

## **2.5. Réactions biomatériaux-tissus hôtes**

Leur application majeure réside dans les comblements osseux et dans le revêtement implantaire dont le succès dépend essentiellement de la création et de la conservation d'une attache avec les tissus conjonctifs environnants. Le mécanisme d'attachement de ces tissus dépend directement du type de réponse de ces tissus avec l'implant à l'interface tissu/implant.

### 2.5.1. Réponse tissulaire

Selon Hench et Best (2004), il est possible de distinguer 4 types de réponses tissulaires en fonction de l'implant utilisé :

- Une destruction tissulaire peut avoir lieu si le matériau est toxique,
- Une fibrose péri-implantaire peut être constatée si le matériau est non-toxique et peu actif biologiquement (concept de bioinertie),
- Un nouveau tissu de jonction peut se mettre en place si le tissu est non-toxique et biologiquement actif (concept de bioactivité),
- Une régénération tissulaire ou une cicatrisation tissulaire peuvent avoir lieu si le matériau est non-toxique et résorbable.

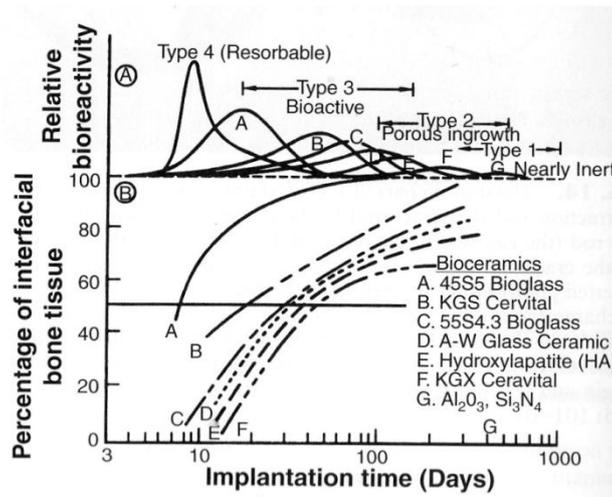
Par ailleurs, toujours selon Hench et Best (2004), la réponse des tissus hôtes peut aboutir à plusieurs types d'attache de l'implant aux structures osseuses :

- Les céramiques denses, non poreuses, et bioinertes seront intégrées par un effet de scellement réalisé par la croissance de l'os dans les irrégularités de surfaces ou par effet de pression dans le cas d'un défaut comblé. Ce phénomène est connu sous la dénomination de fixation morphologique. L'alumine non poreuse peut être citée en exemple de ce phénomène.
- Les implants poreux et bioinertes verront leurs porosités colonisées par l'os en croissance et connaissent alors le concept de fixation biologique. Ici, l' $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou l'HA poreuse employée en revêtement de surface peuvent entraîner ce phénomène.
- Les céramiques denses, non poreuses ayant une surface bioactive pourront avoir une liaison chimique directe avec l'os : il existera alors une fixation bioactive. Il est possible de prendre pour exemples les verres bioactifs ou l'HA.
- Enfin, les céramiques biorésorbables comme les sulfates de calcium ou le phosphate tricalcique pourront être lentement remplacées par l'os.

Du point de vue temporel, ces matériaux n'auront pas les mêmes spectres d'activité ni les mêmes comportements biologiques (cf figure 28)

- Ainsi, les *biomatériaux relativement bioinertes* (type 1 – figure 28) développent une interface qui n'est ni chimiquement, ni biologiquement liée à l'os environnant. Il en découle une possibilité de micromouvements et le développement progressif d'une capsule fibreuse à l'interface entre les tissus durs et les tissus mous. La présence et l'importance de l'intensité de ces mouvements conditionnent en grande partie

l'épaisseur de la capsule fibreuse qui se mettra en place et peuvent entraîner également la détérioration de la fonction de l'implant ou des tissus proches.



**Figure 28 : Spectre de bioréactivité des bio-céramiques (A) et temporalité de la création de l'interface os-implant (B) selon Hench *et al.* 2004.**

- Les *implants bioinertes mais poreux* (type 2 – figure 28) ont la capacité de créer une fixation biologique. En effet, de par l'augmentation de la surface de contact os/implant résultant de la présence des pores et du microclavetage qui en découle, les possibilités de micromouvements sont fortement amoindries et donc l'interface fibreuse créée est beaucoup moins importante. Il en résulte un meilleur comportement vis-à-vis des stress mécaniques. Il est important de noter que pour conserver un tissu viable et résistant, les pores doivent avoir un diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$  pour permettre le développement d'une vascularisation efficace.
- Les *biomatériaux bioactifs* (type 3 – figure 28) apparaissent comme intermédiaires entre les biomatériaux bioinertes (type 1) et les biomatériaux biorésorbables (type 4). En effet, ces matériaux ont la capacité de créer une réponse biologique spécifique résultant en la formation d'une interface liant chimiquement et biologiquement le matériau aux tissus environnants. Il en résulte une adhésion bien plus importante ainsi que l'absence de possibilité de hiatus entre le matériau et les tissus. Par ailleurs, il est possible de contrôler le temps de création de l'interface, l'intensité de l'adhésion ou l'épaisseur de l'interface par le contrôle du type ou de la composition du biomatériau.
- Enfin, les *biomatériaux résorbables* (type 4 – figure 28) sont utilisés pour leur capacité à se dégrader graduellement pendant une période donnée afin d'être remplacés par les tissus environnants. Ces matériaux sont donc les seuls à permettre

une régénération tissulaire et non plus une cicatrisation. Cette optique régénératrice confère à ces matériaux des contraintes supplémentaires : ces matériaux doivent être capables de maintenir une interface stable pendant leur dégradation et donc avoir une vitesse de dégradation compatible avec les capacités régénératives de l'organisme. Par ailleurs, les produits de dégradation de ces matériaux se doivent d'être acceptables du point de vue métabolique et non toxiques.

Toute implantation de biomatériaux génère au sein de l'organisme receveur une réaction spécifique et ceci quelque soit le mode d'implantation choisi. Selon Anderson *et al.* (2004), il est possible de distinguer une séquence de réactions de l'hôte. Ainsi, toute implantation crée un traumatisme local qui entraîne la rupture de vaisseaux sanguins en raison de la nécessité de l'accès au site implantaire. Cette première phase est nécessaire à tout protocole de cicatrisation et permet d'apporter sur le site les cellules capables de déclencher au sein de l'organe cible le processus de cicatrisation. Cette première phase aboutit à la mise en contact de l'implant avec le sang de l'hôte. Il en résulte une première phase d'interactions sang-matériau qui aboutit à la mise en place d'une matrice provisoire (caillot). Il s'en suit une phase d'inflammation aiguë qui peut évoluer en inflammation chronique et aboutir à une réaction de type corps étranger de la part de l'organisme pouvant aboutir à une encapsulation fibreuse de l'implant.

### **2.5.2. L'Inflammation**

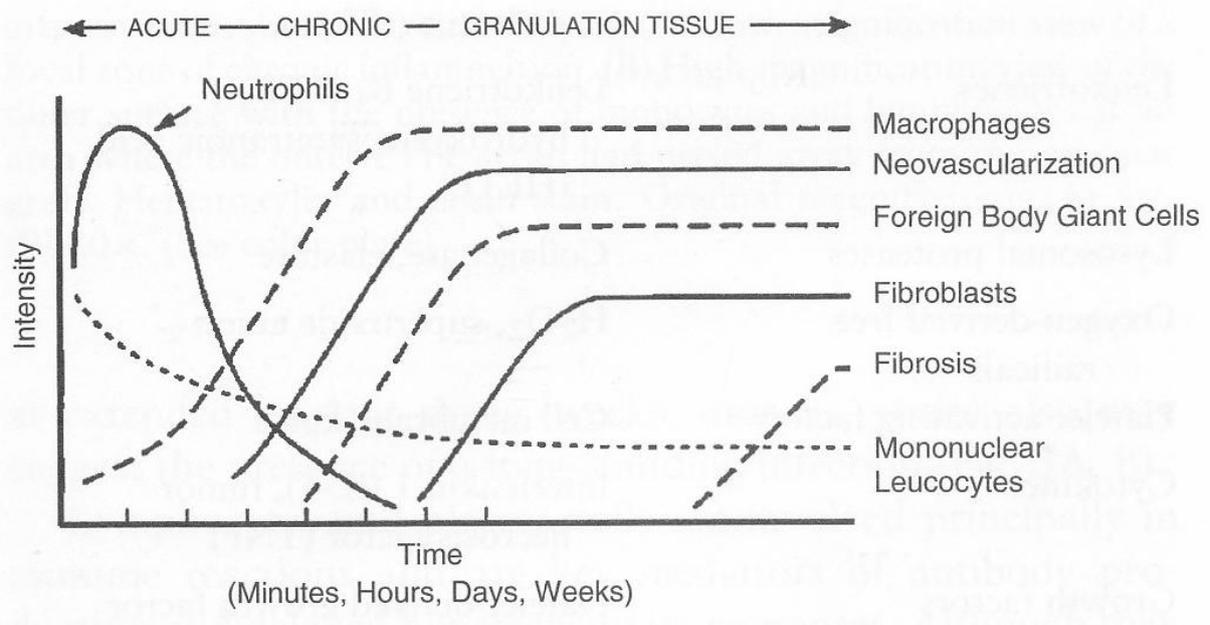
Lors de l'implantation, une réponse tissulaire de l'organisme se met en place. La première étape prend la forme d'une inflammation aiguë, puis l'inflammation passe à la chronicité avec une intensité plus ou moins importante et enfin, une génération de débris d'usure peut avoir lieu sous l'effet de la fonctionnalité de l'implant et de son vieillissement entraînant le maintien ou le développement d'une inflammation iatrogène.

L'inflammation est donc le mode de réponse de l'organisme et plus particulièrement des tissus vascularisés qui le composent aux traumatismes locaux. Le but de l'inflammation est de contenir, neutraliser, diluer ou isoler les processus traumatogènes atteignant l'organisme. Pour cela, l'organisme procède à une modification du flux, du calibre et de la perméabilité de ses capillaires sanguins pour aboutir à une extravasation de cellules et une exsudation de fluides



### **2.5.2.1. La réaction inflammatoire aiguë**

La réaction inflammatoire aiguë est une étape rapide pouvant durer quelques heures à quelques jours en fonction de l'intensité du traumatisme. Ses caractéristiques principales étant l'exsudation massive de fluides et de protéines plasmatiques et la migration de polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs). Les cellules intervenant dans cette phase inflammatoire seront différentes en fonction du stade de l'inflammation. Ainsi, les neutrophiles seront prédominants dans les premiers jours post-implantation et seront ensuite remplacés par les monocytes. En effet, les neutrophiles ont une durée de vie courte (24 à 48H), leur migration dans les tissus est rapide, et leurs facteurs chimiotactiques sont les premiers à être activés lors d'une réaction inflammatoire. Les monocytes interviendront ensuite après différenciation en macrophages et auront une durée de vie bien plus longue (quelques semaines). Le rôle de ces cellules sera la détection et la phagocytose des éléments indésirables pour l'organisme (corps étrangers phagocytibles, micro-organismes...) ainsi que la médiation des réponses immunitaires. La phagocytose intervient en trois étapes : l'agent étranger est reconnu puis est conduit à l'intérieur de la cellule pour y être détruit. Dans le cas de biomatériau, en fonction de la taille des particules et de leur composition, cette phagocytose peut ne pas avoir lieu. D'autre part, le phénomène d'opsonisation peut avoir lieu : l'agent exogène peut avoir été recouvert de protéines plasmatiques (les opsonines : IGg, C3b) facilitant grandement leur phagocytose de par la signalisation engendrée par ces molécules. De par la grande hétérogénéité de taille des particules composant la majorité des biomatériaux, un phénomène de phagocytose frustrée peut avoir lieu qui aboutit à la synthèse par les PMNs et les macrophages de produits leucocytaires visant à détruire le biomatériau. Ainsi, Henson (1971) a montré que les PMNs qui adhéraient à un biomatériau non phagocytible relarguaient par exocytose des enzymes de dégradation. La phase inflammatoire aiguë s'éteint généralement rapidement, souvent en moins d'une semaine.



**Figure 30 : Variations temporelles des réponses inflammatoires aiguë et chronique et leurs implications cellulaires selon Anderson *et al.* 1984.**

### **2.5.2.2. La réaction inflammatoire chronique :**

En général, ce type d'inflammation est caractérisé par la prolifération et l'organisation de vaisseaux sanguins ainsi que par la présence de macrophages, de monocytes et de lymphocytes. Dans le cas où l'implant ne présente pas de mobilité ou d'infection iatrogènes, cette phase se résout rapidement et reste confinée à l'interface implant-hôte.

#### *Le tissu de granulation :*

Dans la première journée suivant l'implantation, la cicatrisation est amorcée par l'action conjointe des monocytes et des macrophages. Les fibroblastes et les cellules endothéliales prolifèrent et forment le tissu de granulation. Ce tissu, qui peut être observé dans les 3 à 5 jours suivant l'implantation, consiste en la mise en place d'une néo-vascularisation par germination de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux existants ainsi que par la synthèse par les fibroblastes d'une matrice essentiellement composée de collagène de type III et de protéoglycannes. Les fibroblastes peuvent également se différencier en myofibroblastes et induire une contraction de la plaie.

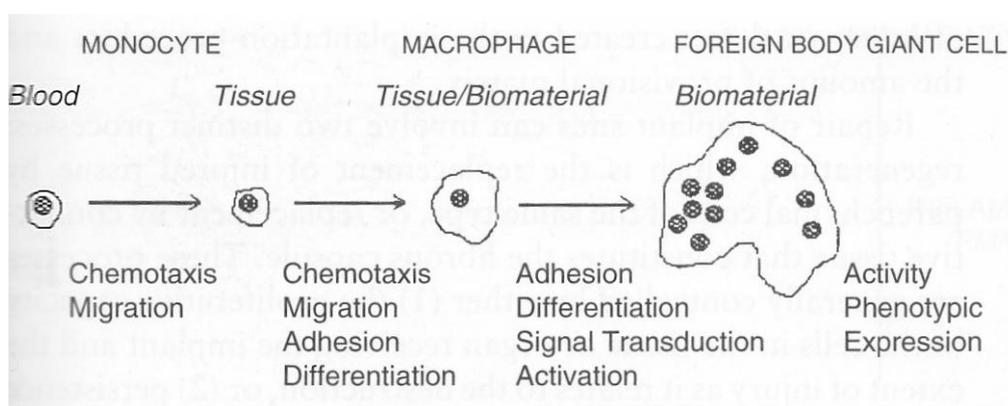
Deux types de cicatrisation peuvent être rencontrés :

- La cicatrisation de première intention intervient lorsque les berges de la plaie sont propres et jointives.

- La cicatrisation en seconde intention intervient lorsqu'il existe un « défaut » tissulaire. Bien souvent, la cicatrisation n'arrive pas à régénérer le tissu *ad-integrum* et laisse place à une cicatrice ou à un tissu de comblement souvent fibroïde.

#### *La réaction à corps étranger :*

La réaction à corps étranger est une réaction de l'organisme vis-à-vis des corps étrangers mettant en jeu, en plus des composants du tissu de granulation (fibroblastes, macrophages, et néocapillaires), un type cellulaire particulier : les cellules géantes multinucléées (foreign-body giant cells – FBGC).



**Figure 31 : Transition du monocyte en cellule géante d'après Anderson *et al.* (2004).**

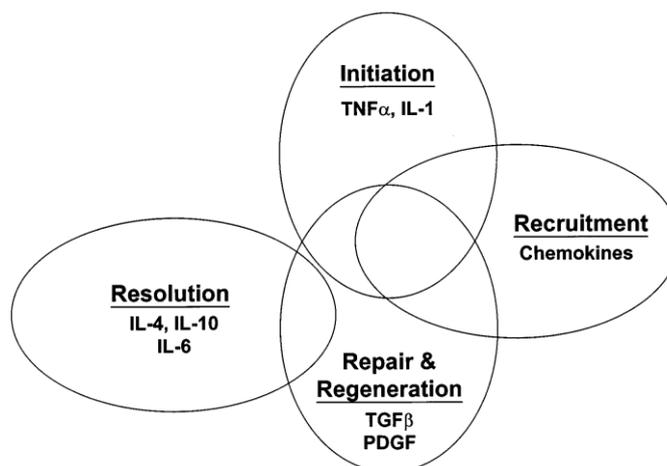
Les surfaces relativement lisses et plates à l'échelle microscopique auront tendance à déclencher des réactions à corps étranger particulière: la surface aura tendance à être recouverte par une à deux couches de macrophages et présentera très peu de cellules géantes. Au contraire, les surfaces rugueuses entraineront la mise en place de nombreuses cellules géantes accompagnées de macrophages. La micro-topographie influence donc complètement la réponse inflammatoire mise en place.

Le développement de cette réaction est bien souvent suivi d'une encapsulation fibreuse qui favorise la persistance des macrophages et des cellules géantes en surface de l'implant tout au long de la vie de l'implant et inhibe donc toute possibilité d'intégration biologique de cet implant.

### **2.5.3. Les cytokines.**

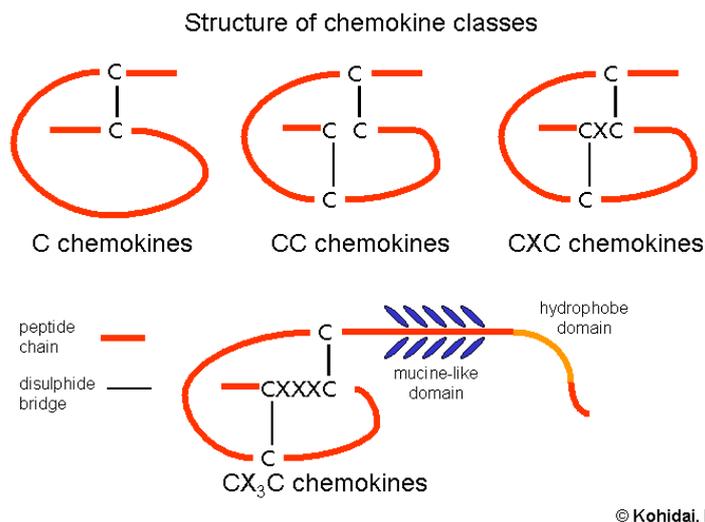
Les cytokines sont des protéines de masse moléculaire relativement faible (8 à 40 kDa), formées le plus souvent d'une seule chaîne polypeptidique. Elles sont en général glycosylées, ce qui permet de les stabiliser et de faciliter leur solubilisation. Il n'existe pas de similitude de

séquence primaire ou de structure tridimensionnelle entre toutes les cytokines. Seules leurs activités biologiques permettent de les classer en différents groupes (Figure 32).



**Figure 32 : Classification fonctionnelle des cytokines tenant compte de leur rôle dans la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire. (D'après Driscoll, 2000)**

Les cytokines agissent à de très faibles concentrations comme les hormones endocrines. Cependant, elles se distinguent des hormones par la diversité des cellules susceptibles de les synthétiser, par la diversité des cellules cibles sur lesquelles elles agissent et enfin par la diversité de leurs activités qui peuvent être endocrines, paracrines ou autocrines. Les cytokines sont essentiellement impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Au cours du processus inflammatoire, les cytokines capables de promouvoir l'inflammation sont dites pro-inflammatoires (exemple du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6) par opposition aux cytokines limitant ce phénomène (exemple de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ ) qui sont dites anti-inflammatoires (Driscoll, 2000). Les cytokines, douées de capacités attractantes envers les cellules, sont appelées chimiokines (pour cytokines chimioattractantes) et sont déterminantes dans les phénomènes de migration cellulaire vers les sites infectieux ou dans le trafic des cellules présentatrices d'antigène vers les ganglions lymphatiques pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. On en dénombre actuellement une cinquantaine chez l'homme (Baggiolini *et al.*, 2001). Elles sont classées en quatre groupes (figure 33) tenant compte de la position des deux premiers de quatre résidus cystéines hautement conservés dans leur structure (Baggiolini *et al.*, 1994; 1997). On trouve ainsi les chimiokines de type CC, CXC (majoritaires), XC et CX3C où X est un acide aminé quelconque. Les chimiokines peuvent lier un ou plusieurs récepteurs (nommés XCR, CCR, CXCR et CX3CR) et ces récepteurs peuvent également lier une ou plusieurs chimiokines.



**Figure 33 : Illustration des classes de chemokines d'après Kohidai *et al.* 2006.**

Les récepteurs aux chimiokines sont des protéines à sept hélices transmembranaires couplées à des protéines G. Chaque type cellulaire présente un panel de récepteurs qui lui sont propres et orientent sa réponse migratoire.

L'implantation d'un biomatériau au sein d'un organisme entraîne une importante réaction de ce dernier qui peut s'avérer délétère à la survie de l'élément implanté. Par ailleurs, le vieillissement de l'implant peut entraîner la libération de particules d'usure ayant également la capacité de créer une importante réaction inflammatoire pouvant aboutir à un descellement aseptique ou à un rejet de l'implant. Dans tous ces cas de figure, l'utilisation d'un matériau limitant ces réactions pourrait augmenter les indications implantaires et permettre une meilleure longévité des implants. Dans ce but, nous avons modifié un des matériaux les plus employés par « dopage » ionique (strontium) afin de le doter de capacités améliorées dans le domaine de l'ostéointégration.

### 3. Le strontium

#### 3.1. Généralités

Le strontium est un élément chimique de symbole Sr et de numéro atomique 38.

Il a été isolé en 1808 par Sir Humphry Davy (Angleterre) après que son oxyde (Strontianite- $\text{SrCO}_3$ ) fut identifié dans le minerai d'une mine proche d'un village écossais nommé Strontian par Thomas Charles Hope en 1790. Ce dernier s'était inspiré des travaux de William Cruikshank et Adair Crawford qui avaient postulé l'existence d'un élément inconnu dans la strontianite. Le strontium naturel est formé d'un mélange de 4 isotopes stables :  $^{84}\text{Sr}$  (0,56%),  $^{86}\text{Sr}$  (9,86%),  $^{87}\text{Sr}$  (7,02%),  $^{88}\text{Sr}$  (82,56 %). Il existe aussi un isotope radioactif (produit de fission) : le  $^{90}\text{Sr}$ , émetteur bêta-, qui a une période de 28,78 ans. Le strontium est un métal mou, malléable, gris. Au contact de l'air, il forme un film d'oxyde protecteur. Il s'enflamme et brûle facilement dans l'air et réagit avec l'eau (Nielson *et al.*, 2004). Il est naturellement présent sous forme de traces au sein des tissus osseux. Dans des conditions physiologiques, sa concentration sanguine a été évaluée à 11,4  $\mu\text{g/l}$  soit  $1,25 \cdot 10^{-7}\text{M}$  par Versieck *et al* en 1993 et sa concentration dans le sérum a été évaluée à 2,52  $\text{ng/ml}$  soit  $2,52 \cdot 10^{-7}\text{M}$  par Piette *et al* en 1994.

### 3.2. Sources naturelles du strontium

Le strontium se trouve dans des minerais tels que la célestine  $\text{SrSO}_4$  et le strontianite  $\text{SrCO}_3$ . Mais il est rare d'en trouver à l'état pur. Le taux de strontium présent dans la croûte terrestre est faible (0,034%).



Figure 34 : Le strontium métallique.

### 3.3. Utilisations

- Colorant rouge : Il est utilisé dans les vernis et glaçures pour céramiques et dans les pigments, les feux d'artifice et les fusées de détresse pour donner une teinte rouge.
- Son carbonate  $\text{SrCO}_3$  est ajouté au verre de la dalle des tubes cathodiques couleur pour freiner les rayons X produits.
- L'oxyde de strontium, la strontiane  $\text{SrO}$ , est utilisé pour extraire le sucre de la mélasse de betterave.
- La mesure des rapports isotopiques du strontium et du rubidium dans certaines roches permet leur datation absolue.
- Il est utilisé dans le traitement de l'ostéoporose sous forme de ranélate de strontium.

### **3.4. Propriétés pharmacologiques du ranélate de strontium**

#### **3.4.1.1. Généralités**

Le ranélate de strontium est composé de 2 atomes de strontium stable et d'une molécule d'acide ranélique, la partie organique permettant le meilleur compromis en termes de poids moléculaire, de pharmacocinétique et d'acceptabilité du médicament. Les propriétés pharmacocinétiques du strontium et de l'acide ranélique ont été évaluées chez des volontaires sains, hommes jeunes et femmes ménopausées, ainsi qu'au cours de l'exposition chronique de femmes ménopausées ostéoporotiques incluant des femmes âgées. Etant donné sa forte polarité, l'absorption, la distribution et la liaison aux protéines plasmatiques de l'acide ranélique sont faibles. Il n'y a pas d'accumulation de l'acide ranélique et aucun métabolisme n'a été mis en évidence chez l'animal ou chez l'homme. L'acide ranélique absorbé est rapidement éliminé sous forme inchangée par le rein. (AFSSAPS, 2010).

#### **3.4.2. Propriétés pharmacodynamiques (AFSSAPS, 2010)**

##### Classe pharmaco-thérapeutique

Médicaments pour le traitement des maladies osseuses

Autres médicaments agissant sur la structure osseuse et la minéralisation.

In vitro, le ranélate de strontium augmente la formation osseuse dans les cultures de tissus osseux ainsi que la réplication des précurseurs ostéoblastiques et la synthèse de collagène dans les cultures de cellules osseuses. Il diminue également la résorption osseuse en diminuant la différenciation des ostéoclastes et leur activité de résorption. Il rééquilibre ainsi le métabolisme osseux en faveur de la formation. L'activité du ranélate de strontium a été étudiée sur plusieurs modèles non cliniques. En particulier, chez les rats, le ranélate de strontium augmente la masse osseuse trabéculaire, le nombre et l'épaisseur des travées ; ceci a pour conséquence une amélioration de la solidité de l'os. Dans le tissu osseux que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme, le strontium est principalement adsorbé à la surface des cristaux d'apatite de l'os et ne se substitue que faiblement au calcium dans ces cristaux nouvellement formés. Le ranélate de strontium ne modifie pas les caractéristiques de ces cristaux. Des biopsies osseuses de la crête iliaque, obtenues lors d'études de phase III, après des durées de traitement allant jusqu'à 60 mois à raison de 2 g/jour de ranélate de strontium, n'ont montré aucun effet délétère sur la qualité osseuse ou sur sa minéralisation. Dans les études de phase III, comparativement au placebo, les marqueurs biochimiques de la formation osseuse (phosphatases alcalines osseuses et propeptide C-terminal du procollagène de type I) ont

augmenté et ceux de la résorption osseuse (C-télopeptides sériques et N-télopeptides urinaires) ont diminué, à partir du troisième mois et jusqu'à 3 ans de traitement. Secondairement aux effets pharmacologiques du ranélate de strontium et sans qu'aucune conséquence clinique n'ait été notée, de légères diminutions des taux sériques de calcium et de parathormone (PTH) ainsi que des augmentations des concentrations sanguines de phosphore et de l'activité totale des phosphatases alcalines ont été observées (AFSSAPS, 2010).

### **3.4.3. Propriétés pharmacocinétiques**

#### **3.4.3.1. Absorption**

Le strontium se retrouve dans l'organisme sous forme de traces : son absorption par l'alimentation représente 1,9 mg/j. Les sources d'apport naturel du strontium sont essentiellement l'eau et les végétaux. L'apport normal est estimé entre 2 et 4 mg par jour.

La biodisponibilité absolue du strontium est d'environ 25 % (de 19 à 27 %) après une administration orale de 2 g de ranélate de strontium. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 3 à 5 heures après l'administration d'une dose unique de 2 g. L'état d'équilibre est atteint après 2 semaines de traitement. La prise de ranélate de strontium avec du calcium ou des aliments réduit la biodisponibilité du strontium d'environ 60 à 70 %, comparativement à une administration 3 heures après un repas. En raison de l'absorption relativement lente du strontium, la prise d'aliments et de calcium doit être évitée avant et juste après l'administration de PROTELOS® (AFSSAPS, 2010). Le strontium est donc peu absorbé dans le tractus intestinal et, chez le rat (non démontré chez l'homme), l'absorption est diminuée avec l'âge. La vitamine D permet l'augmentation de l'absorption intestinale et le calcium l'inhibe. Le lactose et les hydrates de carbone peuvent promouvoir cette absorption qui a lieu essentiellement au niveau du jéjunum. Le ratio d'absorption Sr/Ca a été situé entre 0,6 et 0,7. La préférence calcique a été attribuée à la taille plus faible de l'ion calcium. Par ailleurs, le transport actif contre gradient du strontium de la lumière intestinale vers le sérum n'a pas été observé contrairement au calcium. Le sens inverse demeure possible à l'identique du calcium. (Marcus, 1962)

#### **3.4.3.2. Distribution**

Le strontium a un volume de distribution d'environ 1 l/kg. La liaison du strontium aux protéines plasmatiques humaines est faible (25 %) et le strontium possède une forte affinité pour le tissu osseux. La mesure de la concentration en strontium dans des biopsies de la crête

iliaque chez des patientes traitées jusqu'à 60 mois à raison de 2 g de ranélate de strontium par jour semble indiquer que les concentrations osseuses atteignent un plateau après environ 3 ans de traitement.

Aucune donnée sur la cinétique de l'élimination osseuse du strontium n'est disponible chez le patient après arrêt du traitement (AFSSAPS, 2010).

#### **3.4.3.3. Biotransformation**

Etant un cation divalent, le strontium n'est pas métabolisé. Le ranélate de strontium n'inhibe pas les enzymes du cytochrome P450 (AFSSAPS, 2010).

#### **3.4.3.4. Elimination**

L'élimination du strontium est temps- et dose-indépendante. La demi-vie effective du strontium est d'environ 60 heures. L'excrétion du strontium se fait par voie rénale et gastro-intestinale : voie urinaire (0,34mg/j), fèces (1,5mg/j), sueur (0,02mg/j). Sa clairance plasmatique est d'environ 12 ml/min (CV 22 %) et sa clairance rénale d'environ 7 ml/min (CV 28 %). La liaison du strontium aux protéines plasmatiques est de même intensité que celle du calcium.

Calcium et Strontium semblent emprunter les mêmes voies de transport tubulaire. Le strontium comme le calcium, inhibe la production d'AMP cyclique PTH-dépendante pour des concentrations supérieures à 10 mM. La clairance rénale du strontium apparaît comme 3 fois plus importante que celle de calcium. Ce constat a encore été attribué à la plus petite taille de l'ion Strontium (Mathias, 1991).

#### **3.4.3.5. Accumulation**

Le strontium peut se fixer dans l'organisme (dents, os, cheveux...) (Nielsen *et al.*, 2004).

#### **3.4.4. Déficience en strontium**

Le Strontium est un élément essentiel : son absence totale peut provoquer la mort (Bonnevier *et al.*, 2002). Par ailleurs, la prévalence de la carie est inversement liée à la quantité de strontium présent dans l'eau de boisson, la plaque dentaire et l'émail dentaire (Curzon *et al.*, 1985).

### **3.4.5. Toxicité du strontium**

Aucun syndrome toxique n'a été observé chez l'homme. Néanmoins, l'administration de strontium par voie intraveineuse entraîne une hypocalcémie en raison de l'excrétion rénale du calcium. (Morohashi *et al.*, 1994). Par ailleurs, les études biomécaniques et histomorphométriques réalisées sur le squelette de la souris et du rat ont montré que le strontium n'induisait aucun effet toxique sur les cellules osseuses ou la minéralisation osseuse s'il était introduit dans l'alimentation à des doses inférieures à 1% (Marie *et al.*, 1986). Malgré tout, les fortes doses de strontium (> 4 mmol Sr/kg/jour) peuvent induire des anomalies au niveau du squelette et plus particulièrement chez les animaux qui ont une alimentation pauvre en calcium faisant état d'une apparition de rachitisme et une altération des profils minéraux (Sobel *et al.*, 1935). De jeunes porcs nourris avec une alimentation comportant 6700 ppm de strontium ont montré une difficulté à coordonner leurs mouvements qui s'est suivie d'une paralysie postérieure. Les adultes se sont montrés plus résistants. Par ailleurs, la production d'œufs chez les poules s'est montrée diminuée lorsque l'alimentation contenait plus de 50000 ppm de Strontium (Doberenz *et al.*, 1969). Il a été montré que les régimes très riches en strontium produisent des phosphates de strontium insolubles pouvant entraîner des déficiences en phosphore et des rachitismes (Jones *et al.*, 1938). Le seul composé stable contenant du strontium considéré comme extrêmement toxique pour l'homme à faible concentration est le chromate de strontium en raison de l'extrême carcinogénicité du chrome (Nielsen *et al.*, 2004). Néanmoins, des cas exceptionnels de dermatite exfoliative (Smith *et al.* 2010), d'alopécie (Sainz *et al.*, 2009), de syndromes d'hypersensibilité médicamenteuse ou « Drug Rash with Eosinophila and Systemic Symptoms syndrom » (DRESS) (Joinville-Béra *et al.* 2009) ou d'insuffisance rénale aigue (Paz Yepes *et al.* 2010) ont été recensés. Au niveau cellulaire, peu d'étude ont montré un effet toxique : seule une étude rapporte une toxicité à forte concentration (supérieure à 10 mg/ml de ranélate de strontium) sur des fibroblastes gingivaux humains. (Er *et al.*, 2008). Au niveau moléculaire, le strontium peut, à très forte dose, se substituer au calcium au sein des sites de fixation du calcium de la phosphatase alcaline humaine et perturber la stabilité d'une boucle protéique aboutissant à une modification de l'activité de l'enzyme qui pourrait expliquer les cas d'ostéomalacie rencontrés lors d'utilisation du strontium à trop forte dose. (Llinas *et al.*, 2006)

### **3.4.6. Effets biologiques *in vivo***

A faibles doses (< 4mmol Sr/kg/jour), le strontium diminue la résorption osseuse et augmente l'ostéofomation. Les études chez le rat dont l'apport en calcium était normal, ont montré que

le strontium stimule la formation osseuse corticale et augmente le volume d'os trabéculaire sans altérer le profil minéral ou le processus de minéralisation. Ces effets n'ayant pas entraîné de modifications des niveaux en PTH ou 1,25-dihydroxyvitamine D3, le strontium apparaît donc avoir un effet direct sur la formation osseuse (Gryn timer *et al.* 1990). D'autres études ont montré que le strontium sous forme ionique (SrCl<sub>2</sub> – 1,9 mmol Sr/kg/jours) augmentait le nombre de sites ostéoformateurs et le volume des vertèbres chez le rat sans induire d'altération détectable de la minéralisation de la matrice osseuse (Gryn timer *et al.* 1996). Chez la souris, le strontium a montré des capacités à augmenter la formation d'os trabéculaire au sein de la vertèbre de souris. (Marie *et al.*, 1986). L'administration locale de strontium (SrCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol injecté par voie intra-péritonéale 1 fois par semaine pendant 6 semaines) augmente aussi la formation d'os alvéolaire chez le rat. (Ferraro *et al.*, 1983). L'administration plus longue de ranélate de strontium (2,4 mmol Sr/kg/jour pendant 104 semaines) a montré l'apparition d'une augmentation du diamètre huméral démontrant ainsi une stimulation de l'ossification endopériostée. Les paramètres mécaniques ont été améliorés. En effet, des études ont montré une amélioration de la dureté osseuse, une augmentation de la densité minérale osseuse, et des dimensions osseuses sans en altérer la qualité (Ammann *et al.* 1995). Par ailleurs, des études réalisées par implantation de vis titane recouvertes d'hydroxyapatite au sein de rates ovariectomisées sous ranélate de strontium ont montré une amélioration dose dépendante de la stabilité des vis montrant ainsi une meilleure ostéointégration. (Li *et al.* 2010). D'autre part, les surfaces d'implants traités de façon à obtenir une surface d'oxyde de titane incorporant du strontium améliorent l'ostéointégration des implants au sein des os corticaux et trabéculaires par augmentation de l'apposition osseuse. (Park *et al.*, 2010)

Chez l'Homme, des études basées sur des biopsies osseuses de femmes ostéoporotiques ont montré une augmentation des taux d'apposition minéral (*Mineral Apposition Rate* – MAR), une augmentation de la surface ostéoblastique. Les micro-tomographies X ont révélé une modification de la microarchitecture osseuse avec une augmentation de l'épaisseur des corticales et du nombre des trabécules avec une diminution de la séparation trabéculaire sans modification de la porosité corticale. (Arlot *et al.* 2010, Hamdy *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été rapporté que ces effets étaient également retrouvés pour les patients présentant une ostéoporose masculine (Ringe *et al.* 2010). Enfin, le strontium a la capacité de remplacer partiellement le calcium au sein des cristaux d'hydroxyapatite de l'os néoformé et donc de renforcer son effet local (Li *et al.* 2010).

### 3.4.7. Effet biologique *in-vitro*

Le mécanisme précis de l'action du strontium n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, de nombreuses pistes ont été récemment publiées. Ainsi, le strontium a la capacité d'augmenter la prolifération cellulaire dans des cultures de cellules primaires murines issues de calvaria tout en conservant les capacités de différenciation (expression de RUNX2) et de synthèse protéique de ces cellules (Collagène de type I, phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine) (Bonnelye *et al.* 2007, Park *et al.* 2010(2), Zreiqat *et al.* 2010). D'autre part, le strontium possède également une action sur la balance osseuse médiée par la voie du ligand du récepteur de l'activateur de NFkappaB (RANKL) par sa capacité à induire une surexpression de l'ostéoprotégérine au sein de cultures primaires humaines (Atkins *et al.* 2008, Brennan *et al.* 2009). Certains pensent même que les ostéoblastes traités par le strontium sont poussés dans leur différenciation vers un phénotype ostéocytaire (synthèse de DMP-1 et de sclérostine) (Atkins *et al.* 2008).

Le strontium possède également la propriété de prolonger les capacités prolifératives des cellules souches mésenchymateuses (hMSC) tout en favorisant leur différenciation ostéoblastique (Sila-Asna *et al.*, 2007) et cela, sans avoir recours aux cellules souches sanguines (HSC). (Lymperi *et al.* 2008). Par ailleurs, la différenciation des hMSC semble guidée par le strontium dans la voie ostéogénique au détriment de la voie adipogénique (Peng *et al.* 2010). Par ailleurs, le strontium possède également des capacités de limitation de la maturation des ostéoclastes ainsi que des capacités de disjonction de la zone de scellement de l'ostéoclaste. (Bonnelye *et al.* 2007).

Le récepteur sensible au calcium (Calcium-sensing receptor – CaSR) a été pointé du doigt lors de l'effet du strontium sur la prolifération ostéoblastique, sa présence étant nécessaire à l'induction de la surexpression de c-fos et egr-1 impliqués dans l'augmentation strontium dépendante de la prolifération des cellules primaires ostéoblastiques chez le rat (Chattopadhyay *et al.* 2006). Par ailleurs, le ranélate de strontium a démontré une capacité à augmenter la phosphorylation de la voie ERK1/2 capable d'induire la prolifération ostéoblastique chez les cellules possédant les canaux sensibles au calcium (Fromigué *et al.* 2009). D'autres études ont également montré une phosphorylation des *mitogen activated protein kinase* (MAPK) et de p38 avec en parallèle une augmentation de synthèse de l'homologue à l'oncogène viral du sarcome du rat (*Rat Sarcoma viral oncogen* – RAS) qui est également un régulateur facilitant des voies ERK1/2 et p38 au sein de cultures de MSC (Peng *et al.* 2009) (figure 35).

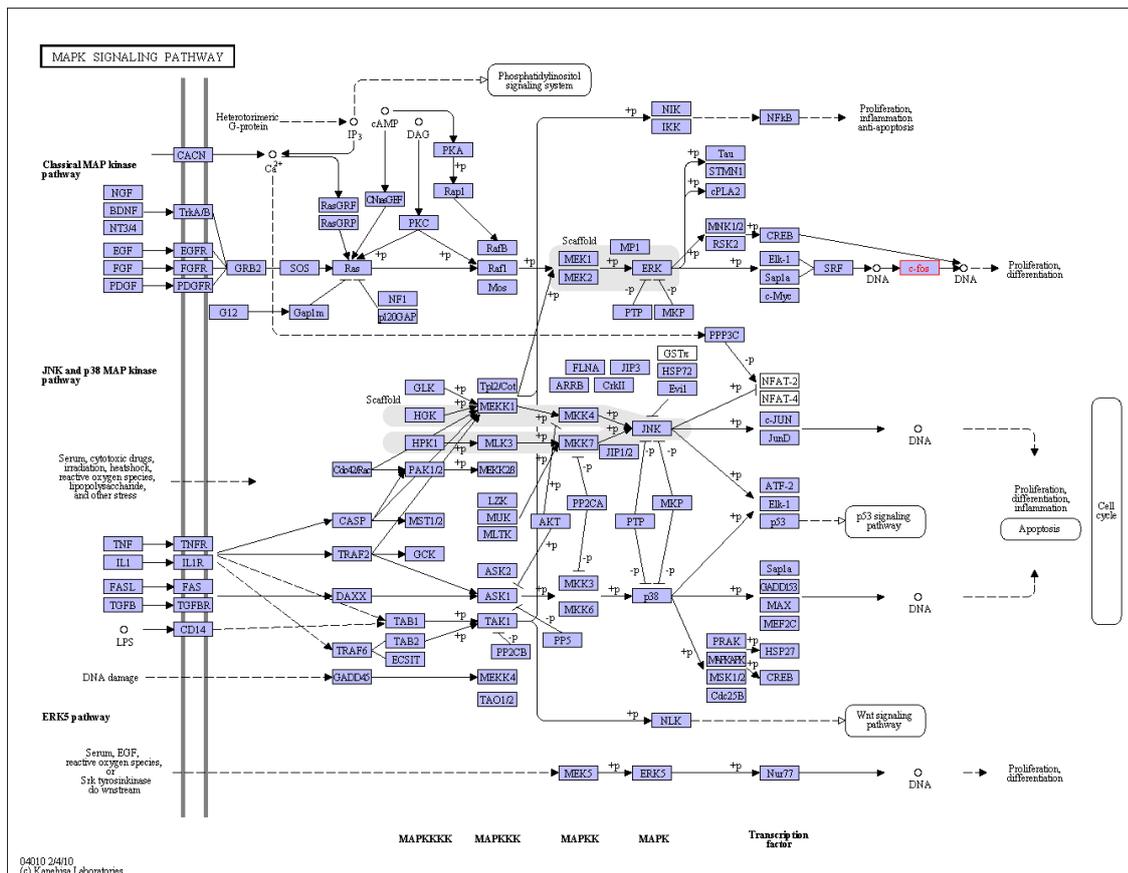


Figure 35 : La voie MPAK d'après la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Néanmoins, les cellules ne possédant pas ce canal répondent tout de même au traitement par le strontium : le canal sensible au calcium n'est donc pas le seul mode d'action du strontium. En effet, le strontium a montré des capacités anti-apoptotiques lors de l'induction de l'apoptose par déplétion en IL-1 et TNF- $\alpha$  du sérum de culture de cellules murines. Ce dernier a la capacité d'activer la voie de survie Akt. L'inhibition pharmacologique de cette voie inhibe également les capacités anti-apoptotiques du strontium. Par ailleurs, l'inhibition de la COX-2 entraîne l'inhibition à la fois des capacités anti-apoptotiques du strontium mais également ses capacités pro-prolifératives (Fromigué *et al.* 2009).

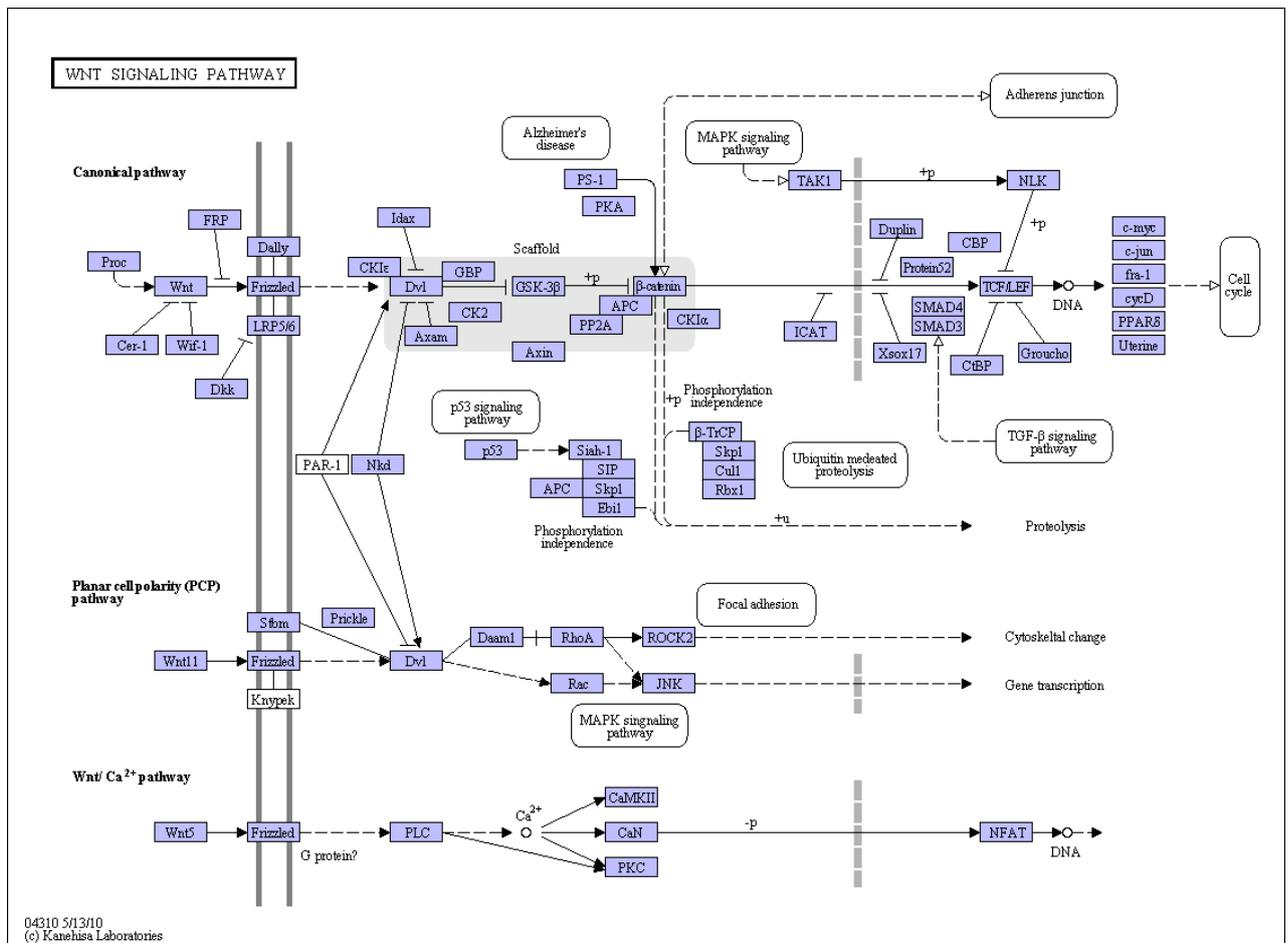


Figure 36 : La voie Wnt aboutissant à NFAT selon la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Enfin, il a été montré au sein de lignées murines (MC3T3) que le ranélate de strontium a également la capacité d'induire une activation de NFATc1 et une augmentation d'expression de Wnt3a, de Wnt5a et de la  $\beta$ -caténine. Cette activation du facteur nucléaire des cellules T activées (*nuclear factor of activated T cells*- NFATc1) permet une activation des voies Wnt canonique et non canonique. (Fromigué *et al.* 2010) (figures 36 et 37).

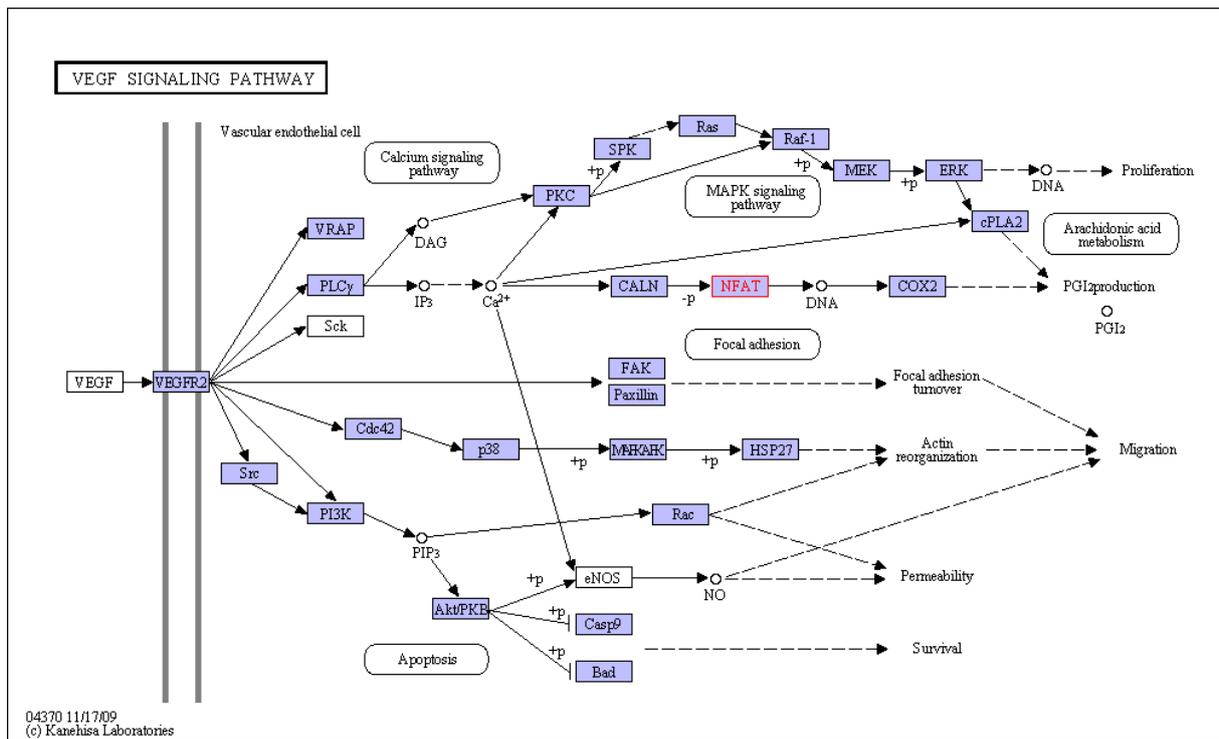


Figure 37 : La voie du VEGF selon la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Le récepteur sensible au calcium (CaSR) a également été impliqué dans l'augmentation de l'apoptose ostéoclastique induite par le strontium : le strontium a la capacité de stimuler de façon dose dépendante l'apoptose ostéoclastique en prenant une voie métabolique similaire mais non identique à la voie utilisée par le calcium impliquant une potentialisation de ces deux ions. (Hurtel-Lemaire *et al.* 2009) (figure 37).

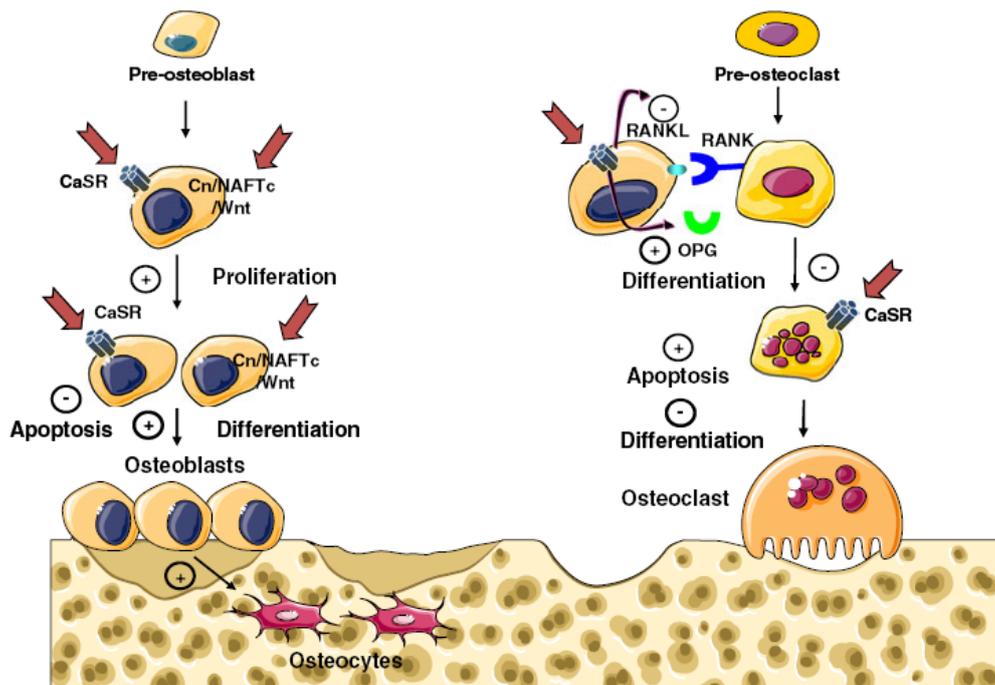


Figure 38 : Récapitulatif de l'effet du strontium sur les ostéoblastes humains (Marie *et al.*, 2010).

# **OBJECTIFS**

Devant l'ensemble de ces données, il nous est apparu intéressant d'étudier l'effet d'un biomatériau « dopé » afin d'évaluer la capacité de ce dernier à être vecteur du strontium et de le délivrer localement dans le but d'obtenir un matériau bioactif.

Dans le but d'acquérir nos premières informations quant à une éventuelle toxicité du strontium et de déterminer une concentration efficace de ce dernier, une étude préliminaire de mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire a été réalisée sur des cultures de cellules en lignée (MG-63). Cette étude a permis de restreindre la plage de concentrations testées dans notre étude et ainsi de diminuer la quantité de cellules nécessaires à la répétition de cette partie de l'étude sur notre modèle primaire (ces cellules étant difficiles à obtenir et à maintenir). Les résultats de ces études nous ont permis de sélectionner une plage de concentrations où le strontium a une efficacité maximale sur ces paramètres. Parallèlement, une étude des capacités de relargage de strontium de différents biomatériaux incorporant cet ion à différentes concentrations a été réalisée. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner un des matériaux en notre possession.

Une étude en microscopie électronique à balayage a alors été menée de façon à déterminer le comportement des cellules vis-à-vis de ce matériau. Afin d'affiner la part du strontium dans ces modifications de comportement, nous avons comparé ces résultats aux résultats acquis lors de l'utilisation d'un matériau synthétisé par une méthodologie en tout point semblable à celle employée pour la synthèse du matériau dopé mais ne présentant pas ce dopage ainsi que lors de la supplémentation en strontium du milieu de culture à la concentration relarguée par le matériau.

Dans un deuxième temps, les nouvelles technologies de biologie moléculaire (PCRArrays) nous ont permis de mener une étude large de l'expression génique de nos cultures et nous ont permis de réaliser une caractérisation de notre modèle de culture. Ces résultats nous ont ensuite permis de mieux appréhender les éventuelles différences d'expressions que le matériau dopé par le strontium pouvait induire. Deux groupes de gènes ont ensuite été étudiés : une première étude a permis d'étudier les gènes codant des protéines impliquées dans la physiologie osseuse et une seconde a visé les gènes codant les cytokines et leurs récepteurs. Cette étude de l'expression génique a été complétée par l'analyse des protéines, codées par ces gènes, produites par notre système cellulaire.

Enfin, une étude in vivo a été menée de façon à observer et caractériser le comportement de nos matériaux au sein d'un organisme vivant. Une collaboration avec l'unité INSERM 577 (Bordeaux) nous a permis d'étudier nos matériaux au sein d'un modèle de lacune osseuse fémorale chez la souris. Une étude en microtomographie X et en histologie ex vivo a ainsi permis de qualifier et quantifier différents paramètres signant le devenir et l'intégration de nos matériaux dans ces organismes et ainsi d'acquérir des informations sur un modèle plus complexe.

## **MATERIELS ET METHODES**

# 1. Matériels.

## 1.1. Produits chimiques et réactifs

Acide acétique, PROLABO

Alcool 95°, 99,9°, CHARBONNEAUX-BRABANT

Agarose, INVITROGEN

Amorces PCR, EUROGENTEC

BSA 30 % (sérumalbumine bovine), SIGMA

Bleu trypan, SIGMA

Bleu de Coomassie, SIGMA

Bromure d'éthidium (BET), INVITROGEN

CaCl<sub>2</sub>, FLUKA

Chlorure de strontium, FLUKA

Collagénase de type II, INVITROGEN

DMEM, EMEM, INVITROGEN

DNase, QIAGEN

Gélatine bovine : SIGMA

Glutaraldéhyde, AGAR SCIENTIFIC

Hcl, VWR

HMDS (hexaméthylidisilane), SIGMA

Isopropanol, PROLABO

Méthanol, MERCK

NaOH, MERCK

NaCl, SIGMA

Paraformaldéhyde, PROLABO

Pastilles d'or-palladium, JEOL

PBS, INVITROGEN

Polyacrylamide, BIORAD

PSA (Pénicilline, Streptomycine, Antimycocine) (10000 U/ml ; 10000 µg/ml), INVITROGEN

PS (Pénicilline, Streptomycine), INVITROGEN

Sodium dodecyl Sulfate (SDS),

SVF, INVITROGEN

TMB, SIGMA

Tris base, BIORAD

Triton X-100, BIORAD

## **1.2. Kits.**

Kit MTS « CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay », PROMEGA  
Kit de quantification des ARN « Quant-IT RNA Assay » : INVITROGEN  
Cytokines arrays : Human Inflammation III : Raybiotech.  
Kit de d'extraction et de purification des ARN « RNEasy Mini Kit » : QIAGEN  
Kit de transcription inverse « RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Kit » : SABIOSCIENCES  
Kit de transcription inverse “High capacity cDNA Reverse transcription Kit” : APPLIED BIOSYSTEMS.  
Human Osteogenesis PCR Array, SABIOSCIENCES.  
Human Inflammatory cytokines & Receptors PCR Arrays, SABIOSCIENCES.  
RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master Mix, SABIOSCIENCES.  
Power SYBR Green : Applied Biosystems  
Kits ELISA pro-MMP-1, total MMP-2 : Quantikines – R&D  
Kit ELISA Duosets MCP-1, Gro $\alpha$ , TIMP-1 et TIMP-2 : Duosets – R&D.

## **1.3. Matériels.**

Boîtes de culture 25 et 75 cm<sup>2</sup>, NUNC  
Centrifugeuse 5417R, EPPENDORF  
Cuve à électrophorèse horizon 11.14, LIFE TECHNOLOGIES  
Etuves, SANYO  
Evaporateur cathodique ion sputter JFC-1100, JEOL  
Filtres 0,22  $\mu$ , MILLIPORE  
Fluorimètre Qubit : INVITROGEN  
Hématocytomètre de Malassez  
Hotte à biologie moléculaire, AIRLAB  
Lamelles thermanox®, VWR  
Lecteur de microplaques, LABSYSTEMS  
Mastercycler Gradient, EPPENDORF  
Microscope électronique à balayage (MEB), JEOL 5400 LV  
Microscope inversé, ZEISS  
pHmètre, ORION  
Poste de sécurité microbiologique, ESI FLUX France  
Rampe UV, UVP  
Spectrophotomètre, EPPENDORF  
Thermocycler : ABI7000 , APPLIED BIOSYSTEMS

## 1.4. Poudres d'HA et d'HA5%.

Les poudres ont été fournies gracieusement grâce à la collaboration de notre unité avec le laboratoire de physique corpusculaire et le laboratoire des matériaux inorganiques de l'université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. Leurs analyses quantitatives par diffraction X ont montré la présence de plusieurs phases au sein des poudres. La poudre d'HA a révélé 2 phases principales : apatite (92.8%), whitlockite (7%) et une phase mineure : chaux (0.2%) alors que la poudre d'HA5% a révélé une phase mineure de plus : la portlandite (0,4%). Cette dernière a, par ailleurs, montré des proportions de phases différentes de la poudre d'HA. Ainsi, la poudre d'HA contient 93% en poids de phase apatitique contre 65% pour la poudre d'HA5% qui contient une phase amorphe (donc non accessible par diffraction X) pour 2,2% de son poids essentiellement composée d'oxyde de strontium. Ces résultats indiquent qu'une forte partie (environ 40%) du strontium incorporé lors de la synthèse est retrouvée dans cette phase contre 32% dans la phase apatitique et 28% au sein de la whitlockite. Cette phase amorphe a été localisée à la surface des grains cristallisés (Renaudin *et al.*, 2008, figure 39).

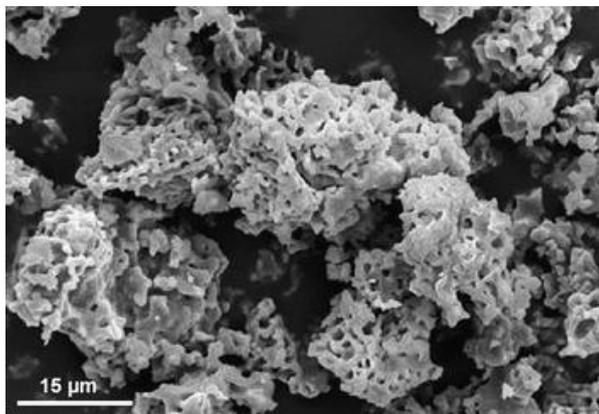
Apatite		Sr:apatite	
<i>Synthesis:</i>			
(Ca + Sr)/PO <sub>4</sub>	1.67	1.67	
Sr amount	0%	5.0%	
<i>Refined:</i>			
<i>Phase</i>		<i>Formula</i>	
Apatite	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	92.8(6)	66.5(6)
whitlockite	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	7.0(3)	32.6(5)
lime	CaO	0.2(1)	0.5(1)
portlandite	—	—	0.4(1)
(Ca + Sr)/PO <sub>4</sub>	1.66(2)	1.63(3)	
Sr amount	0(—)%	2.86(4)%	
<i>Estimated assuming the used synthesis ratios:</i>			
<i>Phase</i>		<i>Formula</i>	
apatite	—	Ca <sub>4.88</sub> Sr <sub>0.12</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	65.0
whitlockite	—	Ca <sub>2.87</sub> Sr <sub>0.13</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	31.9
lime	—	CaO	0.5
portlandite	—	Ca(OH) <sub>2</sub>	0.4
amorphous <sup>a</sup>	—	(Ca,Sr)O <sub>amorph.</sub>	2.2
(Ca + Sr)/PO <sub>4</sub>	—	1.67(—)	—
Sr amount	—	5.0(—)%	—

<sup>a</sup> Refers to 'an amorphous (Ca,Sr)O' in the text.

**Figure 39 : Analyse quantitative des phases présentes au sein des poudres employées d'après Renaudin *et al.* (2008).**

Le strontium incorporé au sein de la maille cristalline a la capacité de déstabiliser cette dernière et entraîne une augmentation de la solubilité des phases qui le contiennent (Christoffersen *et al.*, 1997). Par ailleurs, les tests de biocompatibilité classiques réalisés sur des ciments phosphocalciques contenant de l'HA dopée au strontium (test de toxicité aiguë, tests hémolytique et pyrogène) ont montré que ces composés n'induisent ni toxicité aiguë, ni réaction hémolytique ou réaction pyrogène (Dagang *et al.*, 2007). Malgré tout, ces auteurs ont retrouvé une certaine cytotoxicité pour les échantillons substitués à plus de 5% par le strontium. L'étude morphologique microscopique des matériaux utilisés dans cette étude présentent une architecture poreuse à plusieurs échelles avec des pores de surface de quelques

microns de diamètres et une architecture macroporeuse présentant une morphologie quelconque sans présence de pics.



**Figure 40 : Microphotographie par microscopie électronique à balayage de poudre d'HA d'après Renaudin *et al.* (2008).**

## **2. Méthodes**

### **2.1. Evaluation de la concentration en strontium efficace**

#### **2.1.1. Cultures cellulaires**

##### **2.1.1.1. Lignée MG63**

Une culture de cellules MG-63 (cellules humaines issues d'un ostéosarcome développé par un jeune garçon caucasien âgé de 14 ans (Référence ATCC : CRL 1427)) a été maintenue en culture dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> en présence d'E.M.E.M. (Eagle Minimum Essential Medium, Sigma) supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,5% d'un mélange d'antibiotiques (10000 U/mL Pénicilline- 25µg/ml Streptomycine (PS)). Les cellules ont été placées sous atmosphère humide à 37°C en présence de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été remplacé tous les trois jours et, lors de la confluence, les cellules ont été détachées par la trypsine, centrifugées et transférées dans de nouveaux flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> en présence de 10 ml de milieu précédemment décrit.

##### **2.1.1.2. Explants osseux**

Les prélèvements osseux sont obtenus au cours de chirurgies orthopédiques réalisées au sein du Service de chirurgie orthopédique et traumatologique du Centre Hospitalier Universitaire de Reims chez des patients consentants âgés de 57 à 81 ans (âge médian : 61 ans, Q1 : 52,5 ans, Q3 : 68 ans ) et transportés au laboratoire dans des flacons stériles contenant du milieu de

transport : DMEM + antibiotique/antimycotique (PSA) à 1%. Ces prélèvements sont découpés en fragments de 2 à 3 mm<sup>3</sup> à la pince et aux ciseaux puis subissent plusieurs rinçages successifs de 10 min par une solution de PBS afin d'éliminer le sang et les graisses. Puis, les explants sont soumis à une série de digestions enzymatiques : un bain de trypsine de 10 min à 37°C sous agitation suivi de 3 bains de collagénase II (0,14 %) de 20 min à 34°C sous agitation. Ils sont alors recouverts de quelques gouttes de milieu de culture composé de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D.M.E.M.) enrichi de 20% de S.V.F. et de 1% d'un mélange d'antibiotiques composé de 10000 U/mL de Pénicilline, 10mg/ml de Streptomycine et 25mg/ml d'Actinomycine et placés en incubateur à 37°C sous atmosphère humide de 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24H, le surnageant contenant les débris cellulaires et les cellules flottantes est retiré puis remplacé par 5ml de milieu frais. Ce milieu sera renouvelé tous les 3 jours après un rinçage au P.B.S. complémenté en PSA jusqu'à confluence des cellules. Au bout d'une semaine, la PSA est remplacée par un mélange d'antibiotiques : pénicilline-streptomycine (PS) à 0,5 %. A confluence, en moyenne au bout de 4 semaines, un repiquage est effectué, les cellules sont détachées sous l'action de la trypsine-EDTA 1X (diluée à partir de trypsine-EDTA 10X dans du PBS). Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est rincé au PBS et la trypsine 1 X, préalablement chauffée à 37°C, est ajoutée (2 ml par flacon de 25cm<sup>2</sup>, 5 ml par flacon de 75 cm<sup>2</sup>). Après détachement des cellules, la suspension cellulaire est récupérée et centrifugée pendant 10 min à 2500 tpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans du DMEM + 10 % de SVF + 0,5 % de PS puis réparti dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Le volume total par flacons est ensuite ajusté à 10 ml.

Le milieu est ensuite changé une fois par semaine jusqu'au prochain repiquage. Après un rinçage au PBS, le tapis cellulaire est traité par la trypsine/EDTA pendant 10 min à 37°C afin de détacher les cellules de la boîte de culture. Après centrifugation pendant 10 min, le culot cellulaire est repris et homogénéisé dans un milieu de culture composé de D.M.E.M complémenté de 10% de S.V.F. et 0,5% de P.S. Deux passages sont effectués, les cellules seront utilisées au 3<sup>ème</sup> passage.

### **2.1.2. Cultures cellulaires - Prolifération induite et toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en Sr<sup>2+</sup>**

Des solutions de chlorure de strontium sont préparées extemporanément par dissolution de poudres de chlorure de strontium dans du milieu de culture de façon à obtenir une gamme de concentration croissante en chlorure de strontium (10<sup>-12</sup> à 10<sup>-2</sup> M par incrémentation de 10<sup>1</sup>). 10 000 cellules MG-63 sont mises en place au sein de plaques de culture de 6 puits en

présence des milieux complémentés décrits ci-dessus. Le pH des solutions est vérifié et éventuellement aligné sur le pH de la solution témoin composée de milieu de culture seul par ajout de NaOH ou de HCl.

### **2.1.3. Cultures cellulaires : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en $\text{Sr}^{2+}$ sur les cellules primaires – Tests d'exclusion au bleu trypan**

100 000 cellules primaires ont été mises en culture au sein de flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> avec 20 ml de milieux de culture contenant les poudres d'hydroxyapatite pure (HA), d'hydroxyapatite substituée à 5% en strontium (HA5%) ou enrichie par 5.10<sup>-5</sup> M de chlorure de strontium. Le rapport de surface biomatériau/cellules (SAR) employé a été fixé à 1. Un témoin consistant en une culture simple de ces cellules a également été réalisé et a permis de lisser les résultats obtenus. Trois temps ont été explorés : 7, 14 et 21 jours. Le nombre de réplicats a été de 45 par conditions répartis sous la forme de 5 donneurs, en triplicats techniques, avec une triple lecture.

### **2.1.4. Cultures cellulaires : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en $\text{Sr}^{2+}$ sur les cellules primaires – MTS**

10000 cellules primaires ont été mises en cultures au sein de plaques de cultures 24 puits dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus. Le nombre de réplicats a été ici de 27 par conditions répartis sous la forme de 3 donneurs, en duplicats techniques.

### **2.1.5. Cultures cellulaires : Réalisation des banques d'ARNm**

Afin de pouvoir étudier les différences d'expression génique au sein des différentes conditions, des cultures cellulaires en flacons de 75 cm<sup>2</sup> ont été amenées à confluence. Puis, les cellules ont été mises en présence des différents effecteurs (HA, HA5%, milieu enrichi par 10<sup>-5</sup>M de SrCl<sub>2</sub>) pendant 7, 14 et 21 jours. 5 réplicats ont été réalisés à partir de 5 donneurs.

## **2.2. Tests d'exclusion au bleu trypan - Prolifération induite et Toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en $\text{Sr}^{2+}$**

Des tests au bleu trypan basés sur la capacité du bleu trypan à pénétrer les cellules et la capacité de ces dernières à le rejeter sont réalisés. Plus précisément, seules les cellules possédant une source d'Adénosine Triphosphate (ATP) peuvent mettre en place un rejet actif

du colorant. Ainsi, une cellule vivante expulse le colorant et apparaît blanche au microscope alors qu'une cellule morte n'a pas le moyen de le rejeter et apparaît bleue. Par ailleurs, la membrane intacte des cellules vivantes empêche l'entrée massive du colorant dans le cytoplasme cellulaire alors que la membrane lésée d'une cellule morte, ou en passe de le devenir le laisse passer plus facilement. Après un rinçage au P.B.S., le tapis cellulaire est traité par la trypsine/EDTA pendant 10 min à 37°C afin de détacher les cellules de la boîte de culture. Après centrifugation pendant 10 min, le culot cellulaire est repris et homogénéisé dans du D.M.E.M, un échantillon de 100 µl est alors prélevé et le bleu trypan est incorporé (ratio 4/1). Les cellules ainsi colorées sont comptées à l'aide d'un hématocytomètre de Malassez au moyen d'un microscope. 8 réplicats techniques par conditions ont été réalisés.

### **2.3. Spectrométrie d'émission atomique à source plasma (Inductively-Coupled-plasma/ Atomic-Emission –Spectrometry - ICP-AES) : Validation de l'indice de substitution des poudres**

L'I.C.P.-A.E.S. est une analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon ou d'hélium. Lors de leur retour à l'état fondamental, les électrons des atomes ainsi excités émettent un photon dont l'énergie est caractéristique de l'élément et qui peut être détectée et mesurée. Un étalonnage permet alors de déduire la quantité de l'élément recherché. Les biomatériaux substitués en strontium ont été incubés au sein des milieux de culture. Après centrifugation, les surnageants ont été dilués (1/10) afin de placer les échantillons dans la fenêtre de détection de l'instrument.

### **2.4. Tests d'exclusion au bleu trypan et MTS : Validation de l'effet des poudres et de la concentration efficace en Sr<sup>2+</sup> sur les cellules primaires**

Un test au bleu trypan réalisé comme décrit précédemment a permis d'évaluer le nombre de cellules vivantes au sein de ces cultures ainsi que la viabilité cellulaire par détermination du ratio cellules mortes / cellules vivantes. Afin de valider ces résultats, un test au MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] , CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) a également été réalisé selon le protocole préconisé par le fabricant. Ce test est basé sur la détection et la quantification de l'absorption à 490 nm induite par la conversion du MTS en formazan soluble réalisée par les déshydrogénases des cellules métaboliquement actives (490nm).

## **2.5. Microscopie électronique à balayage - Etude de la morphologie cellulaire**

Afin de pouvoir étudier la morphologie cellulaire, les cellules osseuses humaines sont cultivées sur lamelles de Thermanox®. Après l'étape de culture cellulaire, les surnageants sont éliminés et les lamelles sont rincées 2 fois pendant 5 min avec du PBS préalablement chauffé à 37°C. Puis les cellules se trouvant sur la lamelle de Thermanox® sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, les lamelles sont rincées pendant 5 min avec du PBS puis une seconde fois pendant 5 min avec de l'eau distillée. Les échantillons subissent ensuite une déshydratation par des bains successifs d'alcool à 50°, 70° et 95° (10 min chacun) et enfin 2 bains de 10 min dans de l'alcool 100°. Puis les lamelles sont plongées pendant 10 min dans un bain d'un mélange d'héxaméthylsilazane (HMDS)/alcool 100° (v/v) et enfin dans un bain d'HMDS pendant une nuit. Les lamelles sont ensuite métallisées à l'or-palladium à l'aide d'un évaporateur cathodique puis observées au microscope électronique à balayage.

## **2.6. Etude de l'expression génique**

L'intégralité de l'étude de l'expression génique a été réalisée antérieurement à la publication des recommandations du minimum d'information de publication des expériences de PCR en temps réel (Minimum Information for Publication of quantitative Real-Time PCR Experiments – MIPQE Guidelines (Bustin, 2009)). Cependant, la majorité de ces recommandations ont été appliquées.

### **2.6.1. Extraction, purification, quantification et qualification des ARN totaux**

#### **2.6.1.1. Extraction/Purification**

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à l'aide de kits RNeasy Mini Kit (QIAGEN) : cette technologie combine les propriétés de fixation des membranes en silice avec les forces de centrifugation. Les échantillons sont lysés et homogénéisés dans un tampon hautement dénaturant contenant du thiocyanate de guanidyle de façon à inactiver les RNAses présentes dans les milieux biologiques immédiatement et ainsi permettre d'assurer une bonne préservation des ARNs. Le lysat est ensuite filtré et homogénéisé sur colonne (QIAshredder, QIAGEN). De l'éthanol est ensuite ajouté afin de créer les conditions nécessaires à l'étape de fixation. Ainsi, l'utilisation d'un tampon hautement salin permet de fixer jusqu'à 100 µg d'ARN de plus de 200 bases sur la membrane. Une étape de traitement par DNase est

réalisée sur colonne afin d'éliminer une éventuelle présence d'ADN génomique et des étapes de rinçages permettent ensuite d'éliminer les impuretés et de concentrer les ARNm, les ARNs de tailles inférieures à 200 bases étant éliminés. Enfin, une élution est réalisée de façon à les libérer.

### **2.6.1.2. Quantification des ARNm**

La quantification des ARNm a été réalisée grâce au kit Quant-IT RNA Assay (Invitrogen) sur un fluoromètre Qubit (Invitrogen). Cette technique est la méthode la plus fiable recommandée par les MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (Bustin *et al.*, 2009)). Brièvement, elle permet de marquer par un fluorochrome la molécule à détecter et quantifie la présence de cette dernière par fluorométrie.

### **2.6.1.3. Qualification des ARNm**

Une migration sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium a été réalisée afin de vérifier l'absence de dégradation. Pour cela, un gel d'agarose à 1 % (p/v) est réalisé par mélange de TBE (Tris Borate EDTA) 0.5 x préalablement chauffé et de poudre d'agarose. Une fois le gel bien homogénéisé, 1,5 µL de bromure d'éthidium, un agent intercalant fluorescent sous lumière UV, sont insérés au sein du gel. Après gélification, une électrophorèse est réalisée et la validation de l'absence de dégradation des ARN 18S et 28S est réalisée sous lumière UV.

Par ailleurs, une qualification par calcul des rapports d'absorbance A260/A280 (contamination protéique) et A260/A230 (contaminations salines, phénoliques...) sont réalisés par mise en place de 500 ng d'ARNm dans 200 µl de tampon TE (pH = 8.0). Théoriquement, une solution pure d'ARN possède des rapports A260/A280 de 2,1 et A260/A230 de 2. Ces mesures ont été réalisées dans des cuves en quartz sur un spectrophotomètre.

La validation des échantillons a consisté en la sélection des ARNs ne présentant pas de dégradation visible sous UV et présentant des rapports A260/A280 supérieurs à 1,85 et ne présentant pas de rapports A260/A230 inférieurs à 1.

## **2.6.2. Transcription inverse**

La transcription inverse a été réalisée grâce à deux kits afin de respecter les impératifs inhérents à la réalisation des PCR en temps réel et des PCR Arrays. Ainsi les kits « RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Kit » (SABiosciences) et « High capacity cDNA Reverse transcription Kit »

(Applied Biosystems) ont été respectivement employés en vue de la réalisation de l'étude par PCR Arrays et de PCR en temps réel sur primers désignés. La transcription inverse étant une importante source de variation, cette dernière a été réalisée en duplicats puis repoolée. 1µg d'ARNm a été ainsi traité en suivant strictement les recommandations des fabricants des kits.

### 2.6.3. Réalisation d'un calibrateur

Un calibrateur composé du mélange de 1 µl de l'ensemble des échantillons constituant la banque a été réalisé dans le but de mener les essais de mise au point des primers (cet échantillon représentant un échantillon moyen de l'ensemble de la banque) et de conserver une base de vérification et de référence tout au long des études de PCR.

### 2.6.4. PCR Arrays

Les PCR Arrays ont été effectués par suivi strict du protocole du fabricant en utilisant les plaques « Human Osteogenesis PCR Array » (SAbiosciences) sur 3 donneurs en duplicat sur toutes les conditions et « Human Inflammatory cytokines & Receptors PCR Arrays » (SAbiosciences) sur les témoins de 3 donneurs avec le « master mix » recommandé par le fabricant (RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix – Sabiosciences).

### 2.6.5. Design des primers et étude *in silico*

Le design des primers a été réalisé *in-silico* (universalprobeslibrary – Roche) par l'utilisation de primers destinés à l'utilisation de sondes fluorescentes : ces derniers ayant déjà été validés avant commercialisation. Néanmoins, les étapes de validation ont été tout de même respectées afin d'éviter tout biais. Ainsi, tous les primers employés lors de ce travail ont été recherchés dans le génome humain (BLAST), leurs amplicons idéalement situés à cheval sur un minimum de 2 exons ont également été retrouvés et la spécificité a été vérifiée. Tous ont une température de fusion de 60°C +/- 1°C. Les amorces suivantes ont été dessinées :

#### HPRT

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	24	136	159	59	33	tgacctgattatmttgcatacc
ANTISENS	20	218	237	60	55	cgagcaagacgttcagtcct

**Amplicon:** 102 pb:  
tgacctgattatmttgcataccctaatcattatgctgaggatttgaagggtgtttattcctcatggactaattggacaggactgaacgtcttctcg

#### B2M

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	19	105	123	60	58	ttctggcctggaggctatc
ANTISENS	23	168	190	59	35	tcaggaaattgactttccattc

**Amplicon** 86 nt:  
ttctggcctggaggctatccagcgtactccaaagattcaggttactcacgtcatccagcagagaatggaagtcaaatttctga

### SPP1–Ostéopontine

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	18	47	64	59	61	gagggcttggtgtgcagc
ANTISENS	25	151	175	60	40	caattctcatgtagtagtttcc

**Amplicon:** 129pb

Gagggcttggtgtgcagcagcagcaggaggaggcagagcacagcatcgtcgggaccagactcgtctcaggccagttgcagcct  
ctcagccaaacgccgaccaaggaaaactcactaccatgagaattg

### BGLAP - Ostéocalcin

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	20	39	60	60	tgagagccctcacactcctc
ANTISENS	20	98	117	60	55	acctttgctggactctgcac

**Amplicon:** 98 pb:

tgagagccctcacactcctcgcctattggccctggccgactttgcatcgtggccaggcaggtgcgaagcccagcgggtgcagagtcagcaaggt

### IBSP

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	21			60,4	60	tggatgaaaacgaacaaggca
ANTISENS	21			61	55	aaaccaccatttgagaggt

**Amplicon** 200nt:

Tggatgaaaacgaacaaggcataaacggcaccagtaccaacagcacagaggcagaaaacggcaacggcagcagcggga  
ggagacaatggagaagaaggggaagaagaagtgtcactggagccaatgcagaaggcaccacagagaccggaggggcag  
ggcaagggcactcgaagacaacaacctctccaatgtgggttt

### SPARC/OSTEONECTINE

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	278	297	59	55	gtgcagaggaaaccgaagag
ANTISENS	20	322	341	60	50	tgtttgcagtggtgttctg

**Amplicon:** 64 pb:

Gtgcagaggaaaccgaagaggaggtggtggcggaaaatccctgccagaaccaccactgcaaca

### COL1A1

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	1866	1885	59	55	gggattccctggacctaaag
ANTISENS	19	1910	1928	60	63	ggaacacctcgtctccag

**Amplicon:** 63 pb:

gggattccctggacctaaagtgctgctggagagcccggcaaggctggagagcaggtgttcc

### MMP1

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	26	914	939	59	38	gtaacctttgatgctataactacga
ANTISENS	21	968	988	59	43	tttgtcgcgatgtagaatctg

**Amplicon** 75 nt:

gtaacctttgatgctataactacgattcggggagagtgatgttcttaagacagattctacatgcacaaa

### MMP2

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	19	2148	2166	60	53	ataacctggatgccgtcgt
ANTISENS	21	2190	2210	59	52	aggcacccttgagaagtagc

**Amplicon:** 63 pb:

ataacctggatgccgtcgtggacctgcagggcggcgtcacagctacttctcaagggtgcct

### MMP3

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	27	1259	1285	59	30	caaaacatattctttgtagaggacaa
ANTISENS	21	1329	1349	59	38	ttcagctatttgctgggaaa

**Amplicon:** 91 pb:

Caaaacatattctttgtagaggacaaactgagattgatgagaagagaaattccatggagccagccttccaagcaaatgctga

### MMP-8

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	24	1237	1260	59	33	tctttgtaaatgaccaattctgga
ANTISENS	20	1305	1324	59	50	ggaaaggcactgatatgct

**Amplicon:** 88 nt:

tctttgtaaatgaccaattctggagatgataaccaagacaattcatggagccaggtatcccaaaagcatatcaggtgcctttcc

### MMP9

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	126	145	60	55	gaaccaatctcaccgacagg
ANTISENS	20	173	192	60	55	gccaccgagtgtaaccata

**Amplicon:** 67 pb:

gaaccaatctcaccgacaggcagctggcagaggaatacctgtaccgctatggttactactcgggtggc

### MMP13

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	909 -	928	60	55	ccagtctccgaggagaaaca
ANTISENS	20	974 -	993	60	45	aaaaacagctccgcatcaac

**Amplicon:** 85pb:

ccagtctccgaggagaaacaatgatctttaagacagattcttctggcgcctgcacctcagcaggtgatcggagctgtttt

### MMP14

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	22	899	920	59	45	ctgtcaggaatgaggatctgaa
ANTISENS	19	976	994	60	58	aggggtcactggaatgctc

**Amplicon:** 96 pb:

Ctgtcaggaatgaggatctgaaatgacaatcttctggtggctgtgcacagctgggcatgccctggggctcagcattccagtgaccct

### TIMP-1

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	603	622	60	55	gggcttcaccaagacctaca
ANTISENS	20	654	673	60	50	tgcaggggatggataaacg

**Amplicon:** 71 pb:

gggcttcaccaagacctactgttgctgtgaggaatgcacagtgttccctgttatccatcccctgca

### TIMP2

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	725	744	59	55	gaagagcctgaaccacaggt
ANTISENS	19	791	809	60	63	cggggaggagatgtagcac

**Amplicon:** 85 pb:

gaagagcctgaaccacaggtaccagatgggctgcgagtgcaagatcacgcgctgccccatgatcccgtgctacatctcctcc  
ccg

### CXCL1 - GRO $\alpha$

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	20	340	359	60	50	tctgcatccccatagta
ANTISENS	20	425	444	60	55	cttcaggaacagccaccagt

**Amplicon:** 105 nt:

Tctgcatccccatagtaagaaatcatcgaaaagatgctgaacagtgacaatccaactgaccagaaggaggaggaagctcactggtggctgtt  
cctgaag

### CCL-2 – MCP-1

Primer	Taille(pb)	Début	Fin	Tm(°C)	GC(%)	Séquence
SENS	18 79	96	60	61		agtctctgccgccctct
ANTISENS	19 153	171	59	53		gtgactggggcattgattg

**Amplicon:** 93 nt:

agtctctgccgccctctgtgctgctgctcatagcagccacctcattccccagggtcgtcagccagatgcaatcaatccccagtcac

## 2.6.6. Mise au point des primers

La mise au point des primers est une étape primordiale dans la réalisation de toute étude en PCR. Elle consiste à déterminer la concentration suffisante efficace en amorces des milieux de réplication, de valider la spécificité des amorces, et de donner à la réaction la meilleure efficacité possible.

### Essai de spécificité – détermination de la concentration optimale.

Les essais de spécificité ont été menés conjointement aux études de recherche de la concentration optimale : des réactions de PCR ont été menées à partir de différentes concentrations des solutions de couples d'amorces et les concentrations les plus appropriées ont été sélectionnées de façon à obtenir la meilleure efficacité possible (Ct le plus précoce possible) tout en conservant une spécificité pleine (courbe de dissociation présentant un pic unique).

### Calculs d'efficacité.

Les calculs d'efficacité ont été réalisés en pratiquant des PCR sur des concentrations croissantes d'ADNc ce qui a permis de tracer la courbe de calibration permettant de calculer l'efficacité par la formule :  $10^{(-1/\text{pente})}$ . Les primers ont été validés si l'efficacité de la réaction avoisine une efficacité de 2. (Figure 41)

	Gène Cible	Pente	Efficacité	Ct mini	Ct maxi	Background	TM (°C)	Volume d'utilisation (µl/25µl)
Contrôles Internes	HPRT	-3,35	1,99	26,5	34,5	1/19	74,3	12,5
	B2M	-3,71	1,86	22,43	31,3	1/19	77,0	12,5
Ostéogénèse	SPP1	-3,29	2,01	31	35	1/23	84,3	10
	BGLAP	-3,53	1,92	30,3	36,7	1/23	84,5	5
	BSP	-3,43	1,96	28,5	33	1/23	82,9	12,5
	ON	-3,70	1,86	20,9	30	1/13	78,3	12,5
	COL1A1	-3,80	1,83	21,85	26,5	1/19	80,3	12,5
MMPs / TIMPs	MMP1	-3,33	1,99	27,8	32,2	1/23	73,7	12,5
	MMP2	-3,25	2,03	22,5	26,2	1/13	81,5	10
	MMP3							NE
	MMP8							NE
	MMP9							NE
	MMP13	-3,26	2,03	29	33	1/23	77,2	12,5
	MMP14	-3,47	1,94	22,4	30,8	1/13	82,4	12,5
	TIMP1	-3,34	1,99	20,6	36,8	1/13	77,4	10
TIMP2	-3,47	1,94	22,3	30,6	1/19	81,8	12,5	
Inflammation	GROa	-3,37	1,98	28,3	32,5	1/23	77,8	10
	MCP1	-3,40	1,97	23,51	31,14	1/19	82,4	10

**Figure 41 : Tableau représentant les efficacités, plages et conditions d'utilisation des primers et Tm des amplicons. NE signifie Non Exploitable.**

## 2.6.7. Real Time PCR

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur ABI7000 (Applied Biosystems). Les cycles ont été réalisés conformément aux nécessités du master mix (RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master

Mix – Sabiosciences) pour les PCR Arrays et Power SYBR Green – Applied Biosystems – pour les PCR à amorces dessinées). Une étape de dissociation a systématiquement été réalisée de façon à assurer la spécificité de la réaction : les échantillons présentant des courbes de dissociation incorrectes ont été rejetés et ré-amplifiés dans un second temps.

## **2.7. Etude de la synthèse protéique**

### **2.7.1. Dosage quantitatif de protéines par ELISA**

L'immunodosage de type ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") est une méthode sandwich qui permet la détermination quantitative de molécules à l'aide d'anticorps spécifiques. Un premier anticorps, spécifique de la molécule recherchée est fixé sur les puits d'une microplaque 96 puits. Après une première incubation, la protéine recherchée contenue dans les surnageants de culture se fixe au premier anticorps. Après rinçage et aspiration, un second anticorps, spécifique d'un autre épitope de la molécule recherchée, couplé à la peroxydase, est ensuite ajouté. Il se fixe à l'antigène étudié et forme alors un complexe immobilisé. Après rinçage, la quantité de peroxydase liée à chaque puits est déterminée par l'addition du substrat TMB (3,3' 5,5' tétraméthylbenzidine). La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique 1 M et l'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde spécifique (450 nm pour ceux utilisés au cours de nos expériences). Les résultats obtenus sont comparés à une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions avec un standard interne.

Les kits ELISA utilisés proviennent de chez R&D en ce qui concerne le dosage de la pro-MMP-1, total MMP-2 (Quantikines – R&D), MCP-1, Gro $\alpha$ , TIMP-1 et TIMP-2 (Duosets – R&D).

### **2.7.2. Zymographie**

L'activité gélatinolytique des surnageants de cultures a été évaluée par électrophorèse au sein de gels de polyacrylamide à 15% contenant un agent dénaturant (SDS-sodium dodécylsulfate) et 1mg /ml de gélatine bovine (Sigma). Après migration des protéines, le SDS a été retiré du gel par 2 incubations de 30 min dans une solution de Triton X100 à 2,5%. Les gels ont ensuite été placés dans un incubateur (Thermo) à 37°C pendant 20h dans une solution contenant 50mM de tampon Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl et 5 mM de CaCl<sub>2</sub> avant d'être colorés par une solution de bleu de Coomassie G250 puis décolorés pendant 60min dans une solution comprenant 10% de méthanol et 20% d'acide acétique. Les gels ont ensuite été numérisés sur un analyseur (Wilbur) : l'activité protéique est alors détectée par la quantification de bandes

claires sur le fond bleu via la densité optique intégrée (Integrated Optical Density – IOD) à l'aide du logiciel Gelpro.

### **2.7.3. Cytokines arrays**

Les cytokines arrays (Human Inflammation III, Raybiotech) ont été réalisées selon les protocoles du fabricant : des échantillons constitués de surnageants de culture dilués au dixième ont été incubés sur des membranes coatées par un ensemble d'anticorps. La détection des protéines liées à ces anticorps est réalisée par la création d'un complexe anticorps/streptavidine/biotine/peroxidase de raifort qui a la propriété d'émettre une chimioluminescence si elle est en présence de luminol. Un film photographique est alors exposé et la quantification peut alors être réalisée. Suite à un fond peu continu et la présence d'artéfacts lors de l'impression photographique, les logiciels classiques d'analyse d'image n'ont pu donner une quantification fiable ce qui a nécessité la création d'une application particulière sous ImageJ. Il a été développé une macro de quantification ImageJ qui a permis d'isoler et de prendre en compte le fond présent au niveau de chaque spot afin de le soustraire de l'information donné par le spot lui-même. Cette macro permet également une vérification par l'utilisateur de l'absence d'artéfact pouvant biaiser l'analyser et éventuellement la correction de ce dernier. Cette macro a été validée en interne par étude d'images calibrées.

## **2.8. Etude in vivo**

Afin de valider nos constatations sur notre modèle *in vitro*, une étude *in vivo* à été réalisée.

### **2.8.1. Implantation des souris**

Cette partie de l'étude a été réalisée en collaboration avec les membres de l'équipe INSERM U577 (Bordeaux). 42 souris C57BL/6 femelles de 12 semaines ont été obtenues auprès des laboratoires Charles River (Wilmington, MA) et ont été réparties aléatoirement en 3 lots de 14 destinés à tester les temps d'implantation de 7, 14 et 28 jours puis au sein de ces lots de la façon suivante :

- 5 souris HA : droite = HA / gauche = HA.
- 5 souris HASr : droite = HA5 / gauche = HA5.
- 3 souris témoins : droite = défaut vide / gauche = défaut vide.

Les souris ont été élevées dans des conditions standard d'élevage (22-25°C, cycles jour/nuit de 12 heures, alimentation et apport hydriques libre d'accès). Après induction de l'anesthésie au sein d'une chambre d'induction (Halothane à 5%), les animaux sont maintenus sous anesthésie par insufflation d'halothane à 1,5% au masque. Après une désinfection alcoolique, une incision est réalisée au niveau de la face latéro-externe du genou, un décollement des

tissus mous est réalisé de façon à exposer l'épiphyse distale du fémur. Un défaut osseux est alors créé par fraisage avec une fraise multi-lame métallique en carbure de tungstène de 1,2 mm de diamètre monté sur une pièce à main (Harvard Apparatus, Cambridge, MA) tournant à 10000 tours par minute. Un rinçage au liquide physiologique à l'aide d'une seringue de 1 ml montée d'une aiguille 25 gauges est fréquemment effectué pendant le fraisage de façon à éviter toute induction de nécrose par élévation thermique. Une fois la profondeur atteinte (1,2mm), le défaut osseux ainsi créé est laissé ainsi au sein des témoins ou est comblé à l'aide des biomatériaux étudiés humidifiés de sérum physiologique. Une suture est ensuite effectuée après remise en place des tissus mous. Après sacrifice (anesthésie suivie d'une asphyxie au CO<sub>2</sub>), une dissection est effectuée afin d'extraire les fémurs en conservant l'articulation fémoro-tibiale et sa capsule articulaire. Une fixation en paraformaldéhyde est effectuée pendant 24H puis les échantillons sont stockés dans de l'alcool à 70° à 4°C. Toutes ces études sont réalisées conformément aux directives 86/609/EEC relatives aux expérimentations animales et les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique régional auquel est affilié le laboratoire



Les échantillons sont ensuite placés au sein d'un porte objet par groupe de 8 en milieu alcoolique puis scannés au sein d'un microscanner X Explore Locus SP X-Ray ICT réglé et calibré pour une définition isotropique de 8  $\mu\text{m}$  (plateforme d'imagerie du petit animal du centre d'investigation clinique et d'innovation technologique de Bordeaux, microscanner General Electric, Milwaukee, WI). Après acquisition, les 900 images obtenues sont utilisées afin de créer un micro-volume 3D permettant de définir les zones d'intérêt (isolement et identification des épiphyses distales fémorales). Ces zones d'intérêt sont ensuite reconstruites à pleine résolution après calibration des volumes par les témoins internes présents au sein du porte objet (HA, eau et air) et correction du centre de rotation. Une fois reconstruits, les volumes ont été exportés en format DICOM afin de pouvoir les réimporter dans le logiciel ImageJ. Il a alors été possible de réaliser la segmentation des zones minéralisées par utilisation de la valeur de calibration calculée lors de la reconstruction comme valeur seuil. Après lissage de la pile d'image, une reconstruction volumique a été réalisée.

Les analyses osseuses ont été réalisées grâce au logiciel Advances Bone Analysis (General Electric) sur plusieurs zones d'intérêt :

La première consiste en la réalisation d'une tranche virtuelle de 400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, perpendiculaire au grand axe fémoral, située à 2,7 mm de la partie la plus caudale du fémur (zone saine immédiatement placée sous la lésion). Cette région d'intérêt (region of interest – ROI) a été nommée ROI-1 et a été segmentée de façon à séparer la corticale de la zone médullaire afin de pouvoir réaliser les analyses spécifiques de ces régions d'intérêt. L'objectif de cette zone d'intérêt est d'étudier les paramètres osseux d'une zone de tissu non directement impactée par la lésion mais proche de celle-ci.

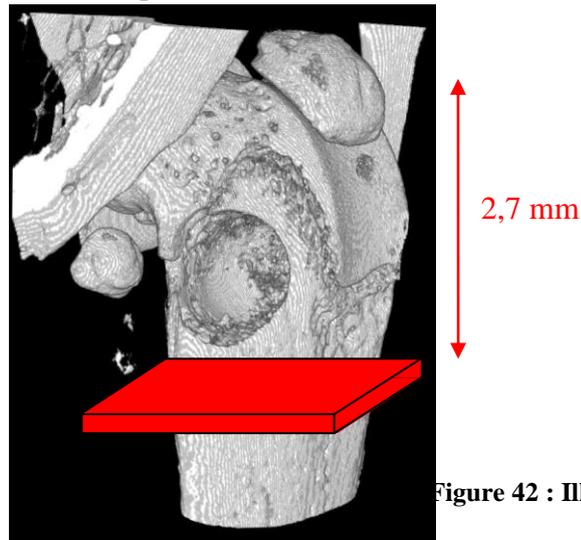


Figure 42 : Illustration de la ROI-1.

La seconde mesure a consisté en la mesure du diamètre d'un disque épousant la zone visible de la lésion ou du biomatériau, dont le centre de gravité est centré sur l'axe de la lésion et est situé à 400  $\mu\text{m}$  sur cet axe dans un plan parallèle au plan constitué par la jonction des points d'inflexion de l'orifice de la lésion. L'intérêt de cette mesure permet de quantifier une éventuelle reformation osseuse latérale aboutissant au comblement de la lésion et/ou à la résorption des matériaux. Cette zone d'intérêt constitue la zone ROI-2.



Figure 43 : Illustration de la ROI-2.

La dernière zone d'intérêt a consisté en la réalisation d'un cylindre de 1mm de diamètre pour les échantillons obtenus à 7 et 14 jours et de 0,7 mm de diamètre pour les échantillons obtenus à 28 jours, d'une épaisseur de 160  $\mu\text{m}$ , dont le centre de gravité a été placé sur l'axe de la lésion à 400  $\mu\text{m}$  de l'orifice de cette lésion et dont les faces latérales sont parallèles au plan d'orifice décrit ci-dessus. L'objectif de cette zone d'intérêt est de réaliser une étude des matériaux afin de voir si des modifications interviennent avec le temps d'implantation.

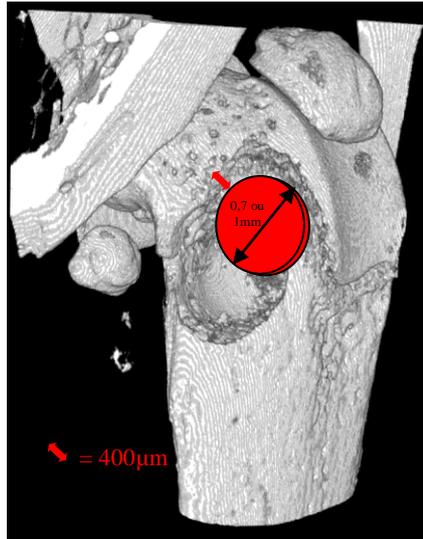


Figure 44 : Illustration de la ROI-3.

### **2.8.3. Histologie descriptive**

Les échantillons ont ensuite été transférés au service d'histologie de la plateforme technologique d'innovation biomédicale de Bordeaux afin de réaliser l'étude histologique.

Les fémurs ont été séparés en 2 lots distincts : le premier lot a été directement inclus en résine (methylnmethacrylate) puis coupé en sections longitudinales de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur par un microtome Leica RM 2255 (Leica, Deerfield, IL) équipé d'une lame en carbures de tungstène. Pour chaque fémur, 3 coupes successives ont été réalisées et colorées au :

- Vert lumière (coloration en vert du collagène (os minéralisé et non minéralisé))
- Von Kossa, permettant de mettre en évidence les dépôts minéralisés de calcium (cristaux noirs au sein de la matrice extracellulaire colorée en jaune/marron).
- Trichrome de Goldner modifié, permettant de discriminer l'os minéralisé (vert) de l'ostéoïde (rouge), et ainsi mettre en évidence le remaniement osseux.

Les lames sont observées avec un microscope Nikon 80i à tête motorisée 90i.

Le second lot est décalcifié pendant 3 jours dans un bain d'EDTA à 0,5M puis est coloré par une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES). Après décalcification, l'ensemble du protocole de déshydratation/pré-inclusion est réalisé automatiquement grâce au Leica TP 1020 (Leica, Deerfield, IL). L'inclusion proprement dite est effectuée manuellement (Station d'enrobage Leica EG 1150 H), de manière à ce que les fémurs soient coupés en sections longitudinales. Les coupes de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont effectuées au microtome motorisé Leica RM 22550 et sont ensuite colorées manuellement à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES).

Les coupes sont observées sous un microscope Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, Japan) et les microphotographies sont prises par une camera CCD DXM1200C (Nikon, Tokyo, Japan).

Les commentaires sont validés par le Dr Geneviève Belleannée du service d'Anatomopathologie de l'hôpital Haut Lévêque (Pessac), lors d'une deuxième lecture

### **2.9. Statistiques :**

Du fait du faible nombre de donneurs et donc un nombre d'échantillons ne permettant pas d'atteindre une distribution normale, l'intégralité des résultats a été étudiée par statistiques non paramétriques. Les courbes ont été réalisées à partir des médianes et des quartiles 1 et 3. La majorité des résultats ont été représentés sous forme de valeurs + médiane. La significativité des résultats a été déterminée par des tests non paramétriques de permutation stratifiés avec  $p < 0,05$ .

## **Résultats**

# 1. Prolifération induite et Toxicité du chlorure de strontium: Détermination de la concentration efficace en Sr<sup>2+</sup>

La première partie de l'étude a consisté en la recherche de l'effet du strontium sur une large gamme de concentrations allant de 10<sup>-2</sup>M à 10<sup>-12</sup>M par incrément de 10<sup>-1</sup>M. De par l'importance de cette étude et la difficulté d'obtention des cultures de cellules primaires humaines, il a été décidé de la réaliser sur des cultures d'ostéoblastes en lignées (MG-63) puis de valider ces données sur les cultures primaires. Les premiers résultats acquis sur le strontium publiés dans la littérature faisant état d'une augmentation de la prolifération ostéoblastique, il a été décidé de prendre ce paramètre comme indice de référence de l'activité du strontium dans le but de rechercher la concentration ou la plage de concentration présentant une forte activité. Par ailleurs, ce paramètre permet de rechercher une éventuelle toxicité induite.

## 1.1. Etude préliminaire sur la lignée MG-63

### 1.1.1. 7 jours.

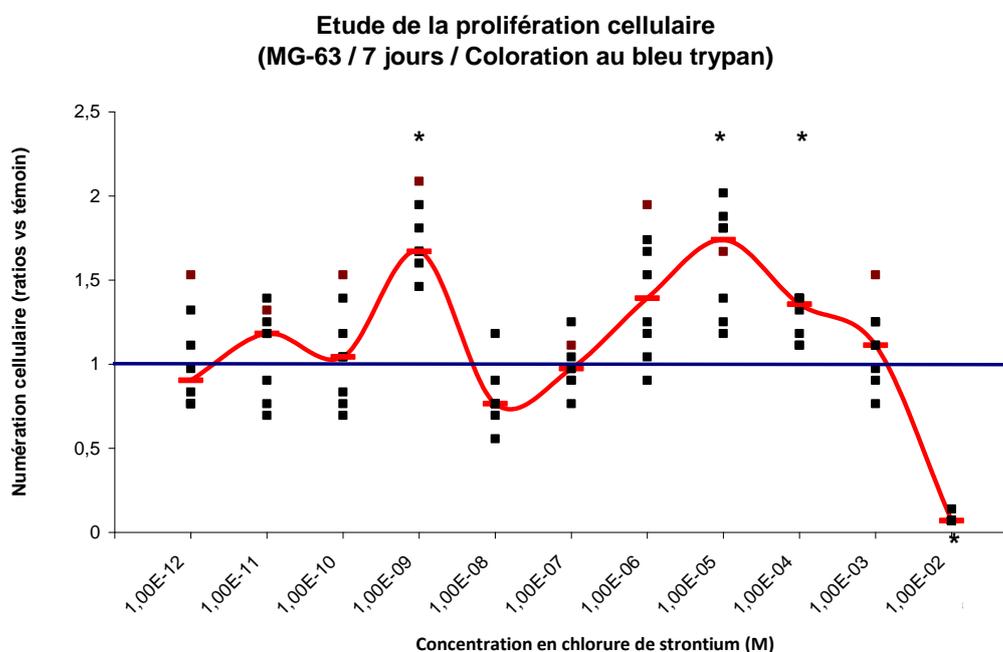
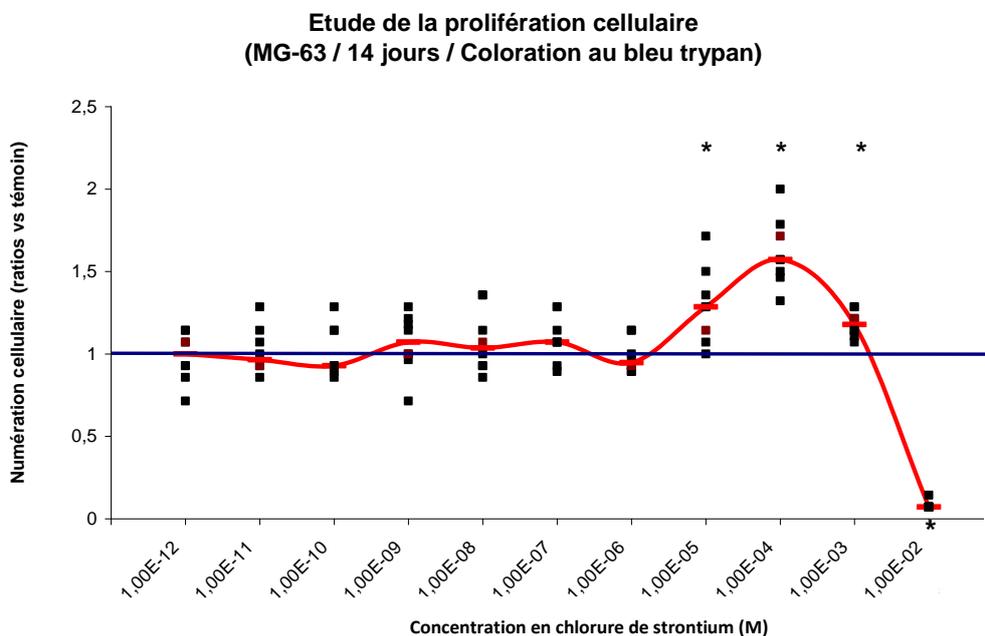


Figure 45 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 7 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules MG-63.

Le chlorure de strontium a montré une capacité trivalente au niveau des cultures de MG-63 à 7 jours. Ainsi, pour des concentrations de 10<sup>-9</sup>M puis pour des concentrations comprises entre

$10^{-4}$  et  $10^{-5}$ M, le chlorure de strontium possède une capacité d'induction de la prolifération cellulaire. Au contraire, pour des concentrations de  $10^{-2}$ M, une forte toxicité a été retrouvée.

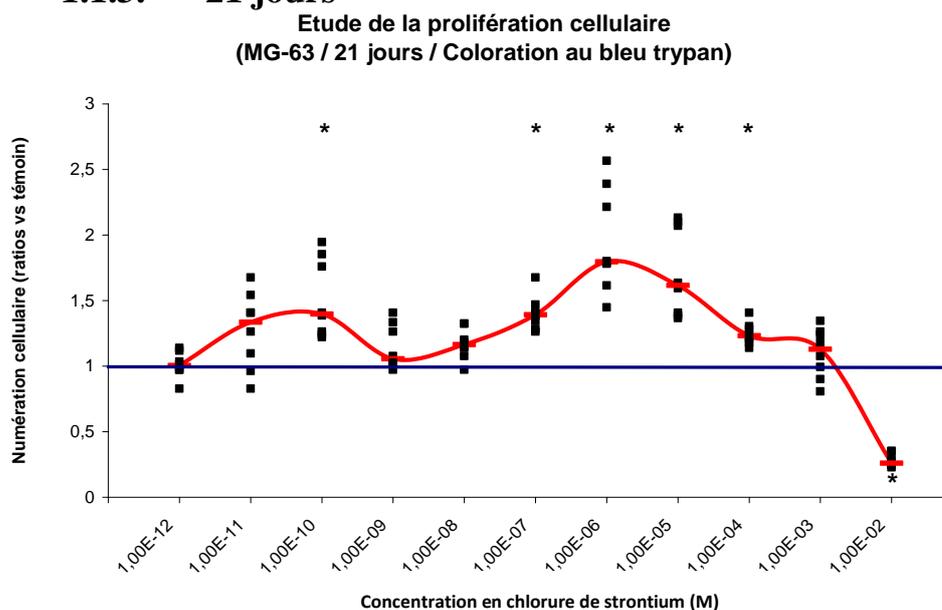
### 1.1.2. 14 jours



**Figure 46 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 14 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules MG-63.**

A 14 jours, le chlorure de strontium a permis une augmentation de la prolifération cellulaire sur une seule zone située de  $10^{-5}$ M à  $10^{-3}$ M. Une forte toxicité a de nouveau été retrouvée à  $10^{-2}$ M.

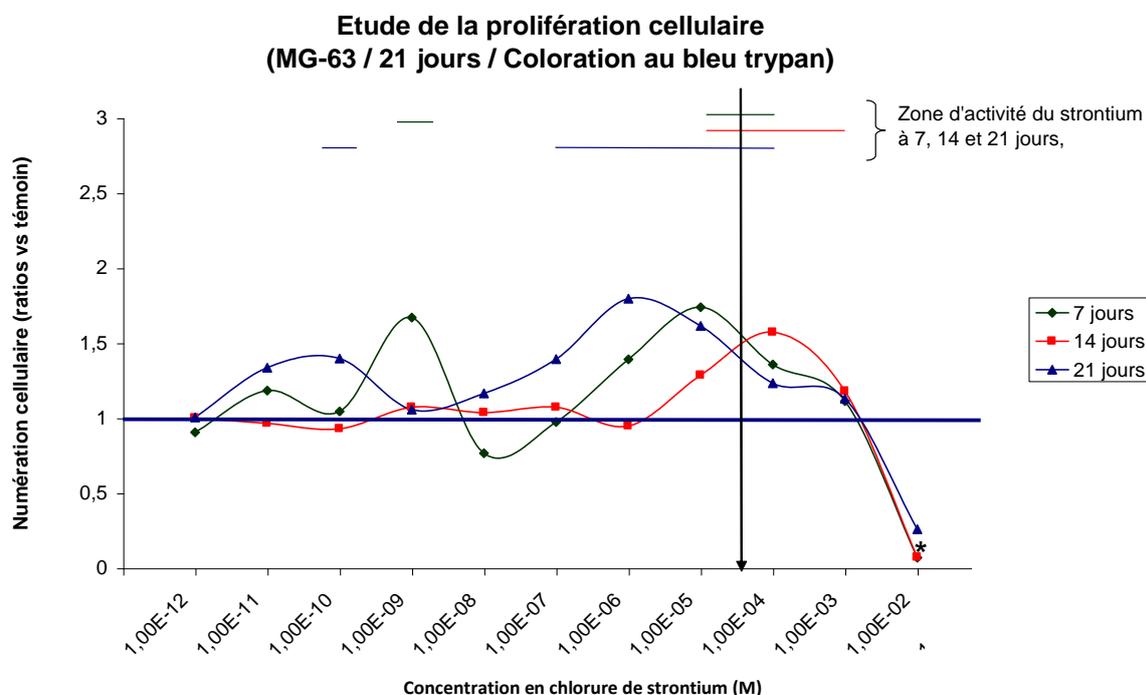
### 1.1.3. 21 jours



**Figure 47 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 21 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules MG-63.**

A 21 jours, le chlorure de strontium a permis de nouveau une augmentation de la prolifération cellulaire sur deux zones situées respectivement à  $10^{-10}$ M et de  $10^{-6}$ M à  $10^{-3}$ M. Une forte toxicité a encore été retrouvée à  $10^{-2}$ M.

### 1.1.4. Conclusion



**Figure 48 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 7, 14 et 21 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules MG-63.**

Les plages d'activité optimales du chlorure de strontium se recoupent autour de la concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$ M. Un second effet a été constaté aux alentours de  $10^{-9}$  et  $10^{-10}$ M à 7 et 21 jours. Enfin, la concentration de  $10^{-2}$ M a présenté une toxicité pour l'ensemble des échantillons. Il a été décidé d'investiguer les concentrations comprises entre  $10^{-2}$  et  $10^{-6}$ M auprès des cellules primaires dans un but de réduction des quantités cellulaires requises pour l'étude.

## 1.2. Etude sur cellules primaires

Afin de confirmer nos résultats sur les cultures de cellules primaires, une étude comparable à la précédente a été menée sur les cellules primaires. Les tests MTS étant réalisés en plaque 24 puits, ils présentent l'avantage d'une économie cellulaire.

### 1.2.1. Résultats à 7 jours

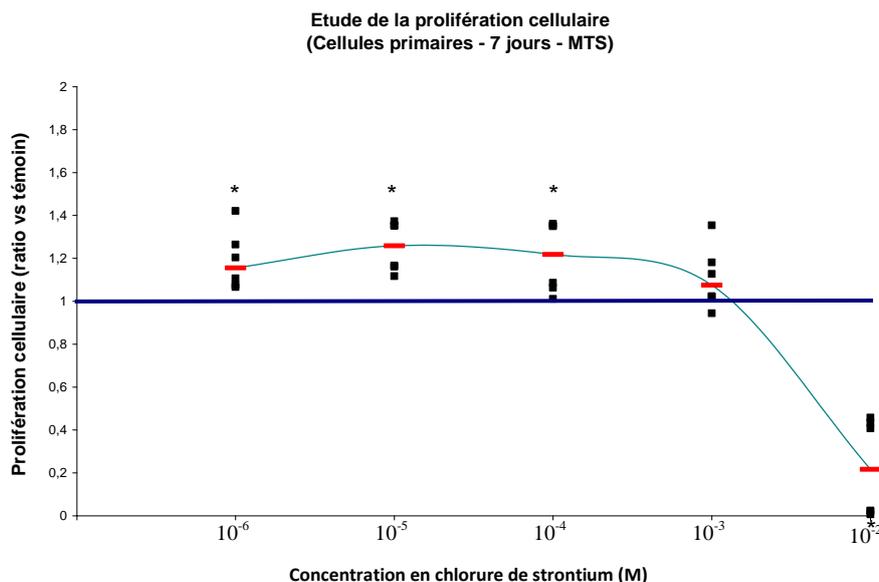


Figure 49 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 14 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques primaires .

A 7 jours, le chlorure de strontium a de nouveau montré une capacité à augmenter la prolifération cellulaire des cultures de cellules primaires ostéoblastiques. Ainsi, pour des concentrations comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ M, le chlorure de strontium possède une capacité d'induction de la prolifération cellulaire. Au contraire, la concentration de  $10^{-2}$ M a montré de nouveau une forte toxicité.

### 1.2.2. Résultats à 14 jours.

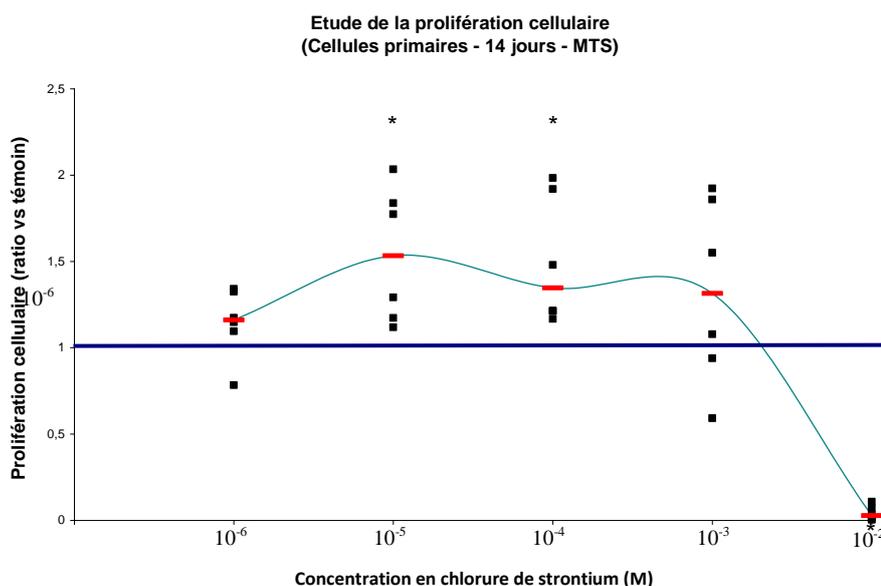


Figure 50 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 14 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques primaires .

A 14 jours, les concentrations de chlorure de strontium comprises entre  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ M possèdent une capacité d'induction de la prolifération cellulaire. Au contraire, la concentration de  $10^{-2}$ M a encore montré une forte toxicité.

### 1.2.3. Résultats à 21 jours.

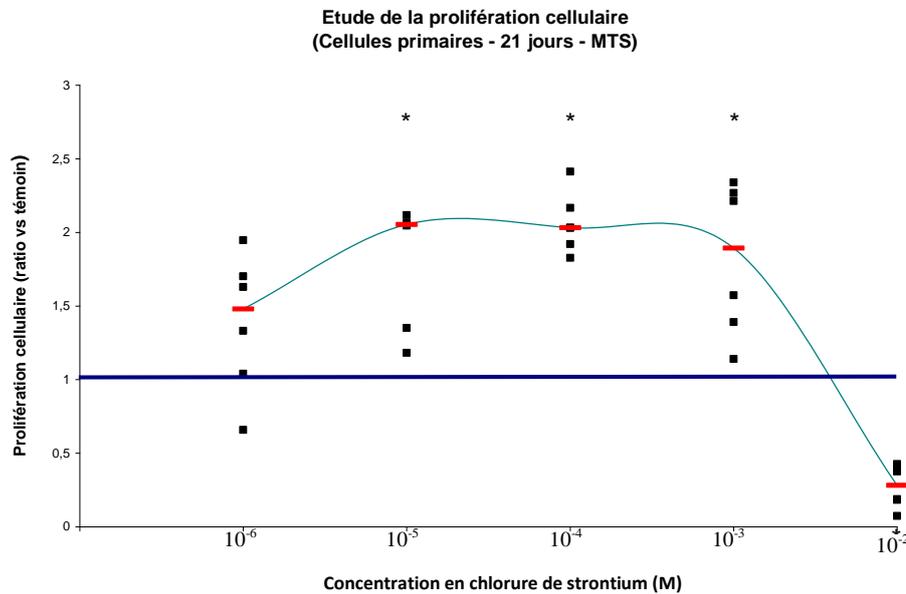


Figure 51 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 21 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques primaires.

Les concentrations de chlorure de strontium comprises entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$ M possèdent, à 21 jours, une capacité d'induction de la prolifération cellulaire. Au contraire, la concentration de  $10^{-2}$ M a encore montré une forte toxicité.

### 1.2.4. Conclusions.

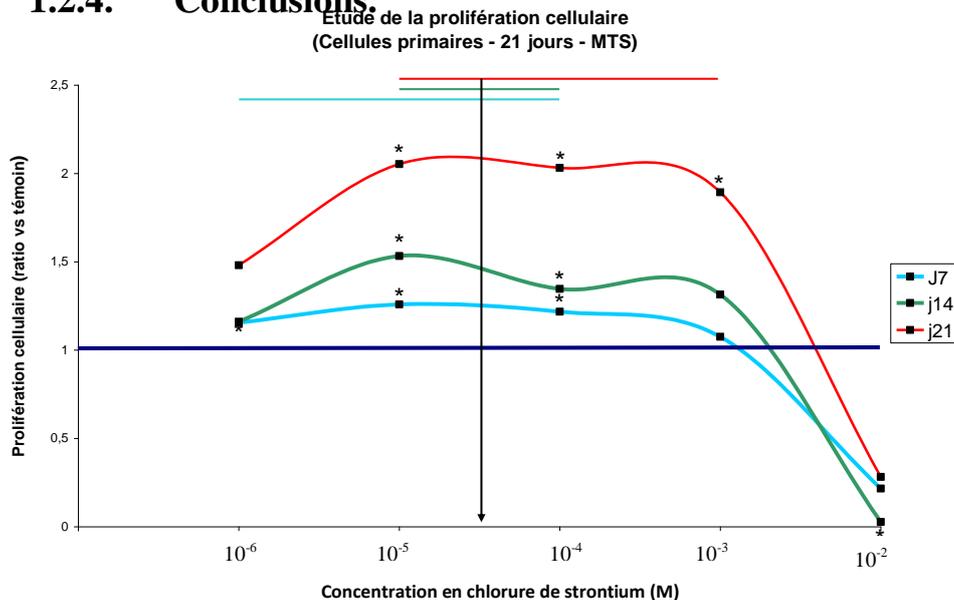


Figure 52 : Etude de la prolifération cellulaire induite à 7, 14 et 21 jours par différentes concentrations de chlorure de strontium incluses dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques primaires.

Les plages d'activité optimales du chlorure de strontium se recourent une nouvelle fois au niveau de la concentration de  $5.10^{-5}M$ . Cette concentration a donc été choisie pour la poursuite de l'étude. La concentration de  $10^{-2}M$  a présenté également une toxicité pour l'ensemble des échantillons. Un relargage de  $5.10^{-5}M$  est donc recherché.

### 1.3. Spectrométrie d'émission atomique à source plasma (Inductively-Coupled-plasma/ Atomic-Emission –Spectrometry - ICP-AES) : Validation de l'indice de substitution du substitut osseux

#### 1.3.1. Etude du strontium

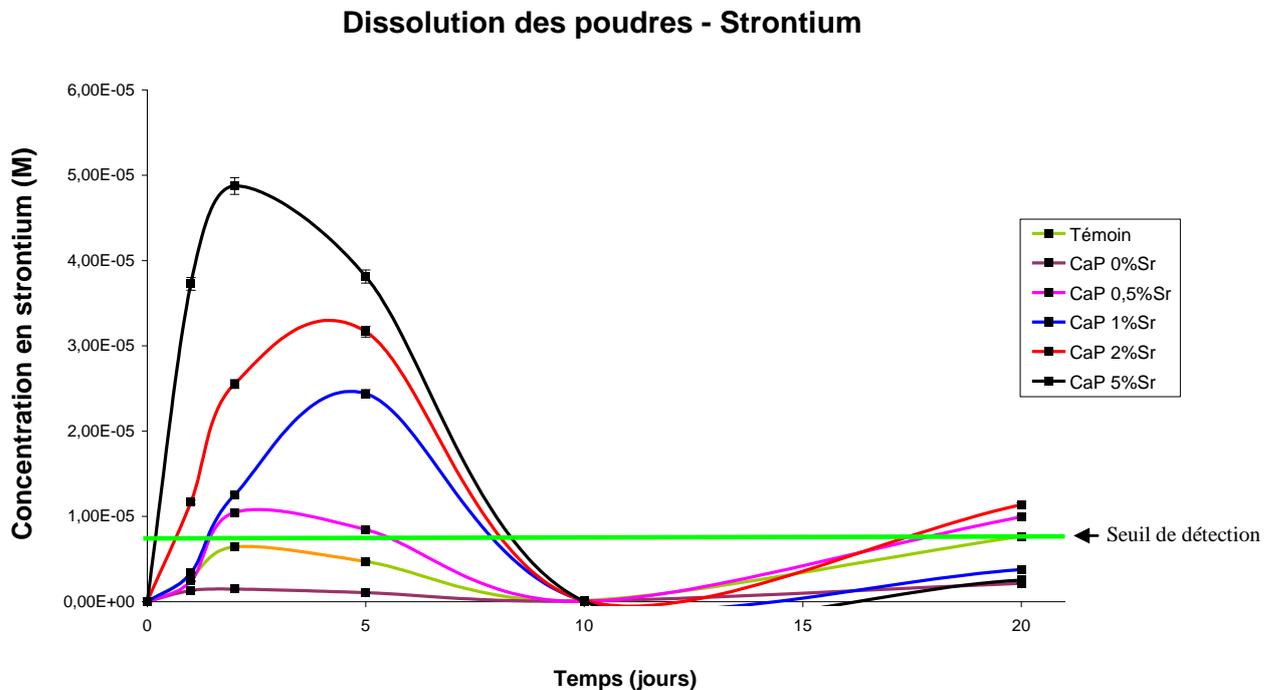


Figure 53 : Etude par ICP-AES du relargage de strontium par les poudres.

Les 5 poudres en notre possession ont révélé des profils de dissociation relativement semblables. Conformément aux résultats attendus, les poudres ayant été dopées au strontium ont révélé des capacités de dissolution leur permettant une libération d'ions strontium. La concentration maximale atteinte lors de cette étude de dissociation s'est révélée être  $4.9 \cdot 10^{-5}M$  pour la poudre la plus fortement substituée (HA5). Par ailleurs, une décroissance de ces concentrations a été retrouvée, elle laisse présumer une incorporation du strontium relargué lors de la reprécipitation du phosphate de calcium.

### 1.3.2. Etude du calcium

#### Dissolution des poudres : calcium

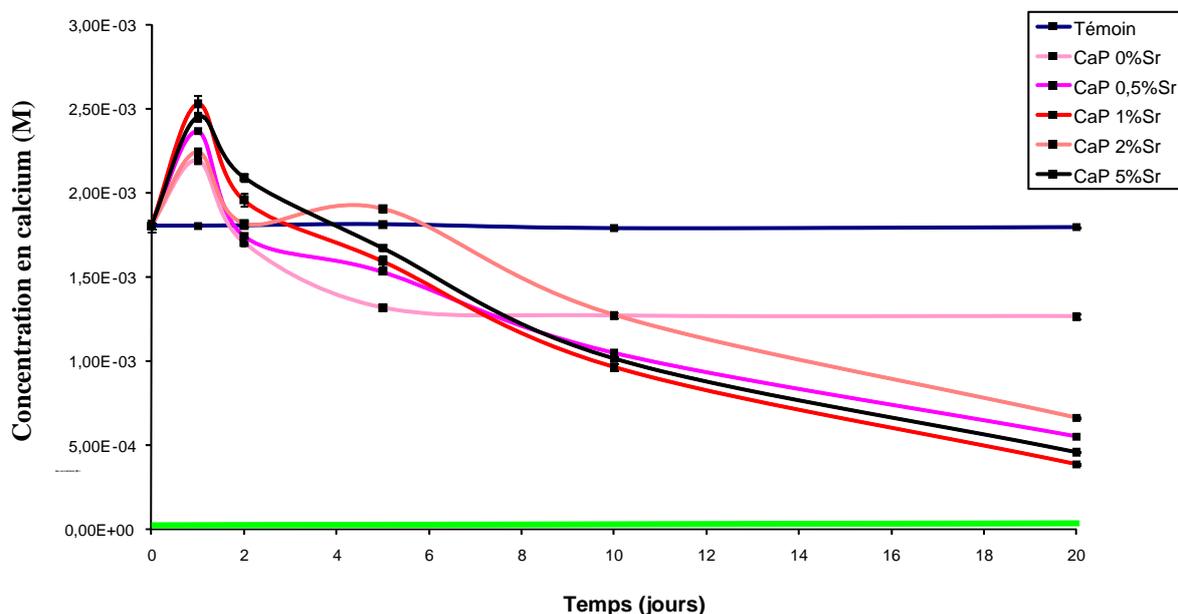


Figure 54 : Etude par ICP-AES du relargage de calcium par les poudres.

Les poudres ont montré des capacités de libération de calcium relativement proches les unes aux autres. Ici encore, une décroissance de la teneur en calcium des milieux a été retrouvée ici encore très vraisemblablement liée à une réaction de précipitation.

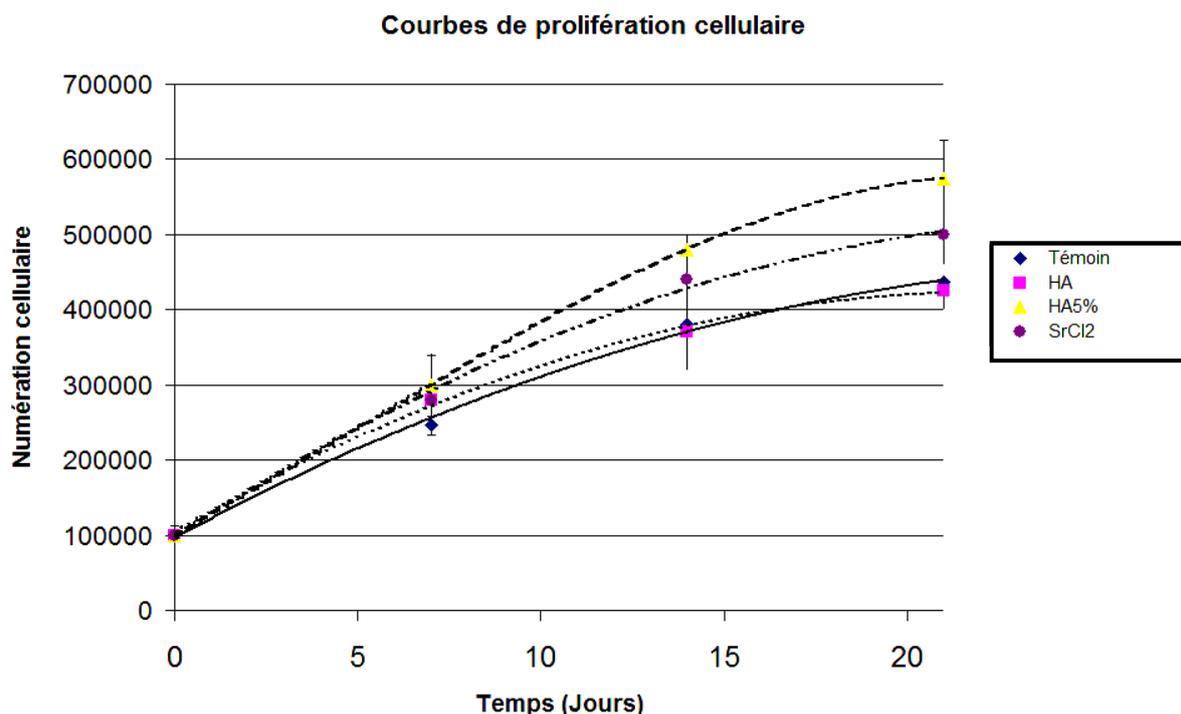
### 1.3.3. Conclusions

Les poudres ont montré des capacités de libération de calcium similaires les unes des autres et des capacités de libération de strontium ( $4,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) du même ordre de la concentration déterminée comme la plus efficace par nos études précédentes ( $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ). Cette concentration reste distante des concentrations toxiques ( $10^{-2} \text{M}$ ). Néanmoins, la dissolution ayant lieu au niveau même du matériau, il est important de noter que les concentrations au contact de ce dernier sont très certainement plus importantes que les concentrations retrouvées au final dans l'intégralité des boîtes de culture.

Devant ces résultats, nous avons sélectionné la poudre substituée à 5% pour poursuivre nos études.

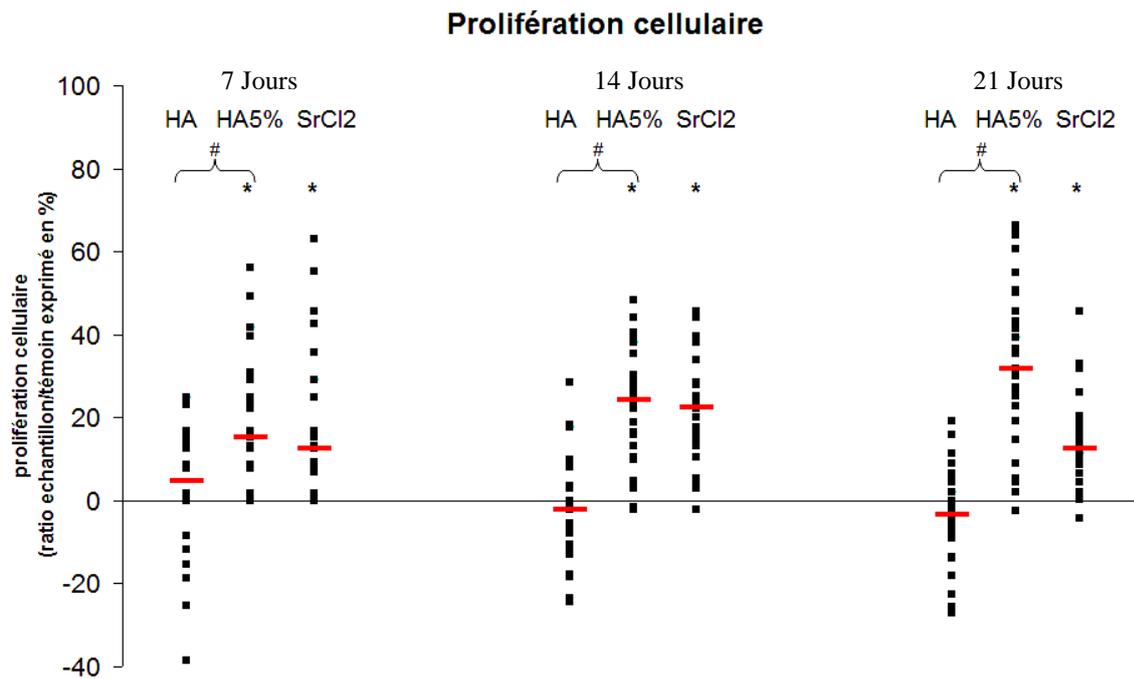
## 2. Prolifération induite par le strontium: Effets des poudres HA et HA<sub>5%</sub> sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec la concentration d'effet maximal.

Afin de valider l'efficacité de la substitution strontique des poudres, une étude comparant les proliférations cellulaires de culture de cellules contenant des poudres HA et HA<sub>5%</sub> avec une culture témoin (sans poudre – milieu seul) et milieu enrichi en chlorure de strontium à la concentration d'efficacité maximale a été réalisée.



**Figure 55 : Etude des courbes de prolifération cellulaire induites à 7, 14 et 21 jours par les différents effecteurs inclus dans les milieux de cultures de cellules ostéoblastiques primaires.**

Les courbes de prolifération cellulaire révèlent de nouveau une capacité du strontium à induire une augmentation de ce paramètre. En effet, les courbes obtenues après traitement par les effecteurs strontiés (HA<sub>5%</sub> et SrCl<sub>2</sub>) se situent à des niveaux supérieurs aux courbes révélées par les échantillons témoins et traités par les poudres HA.



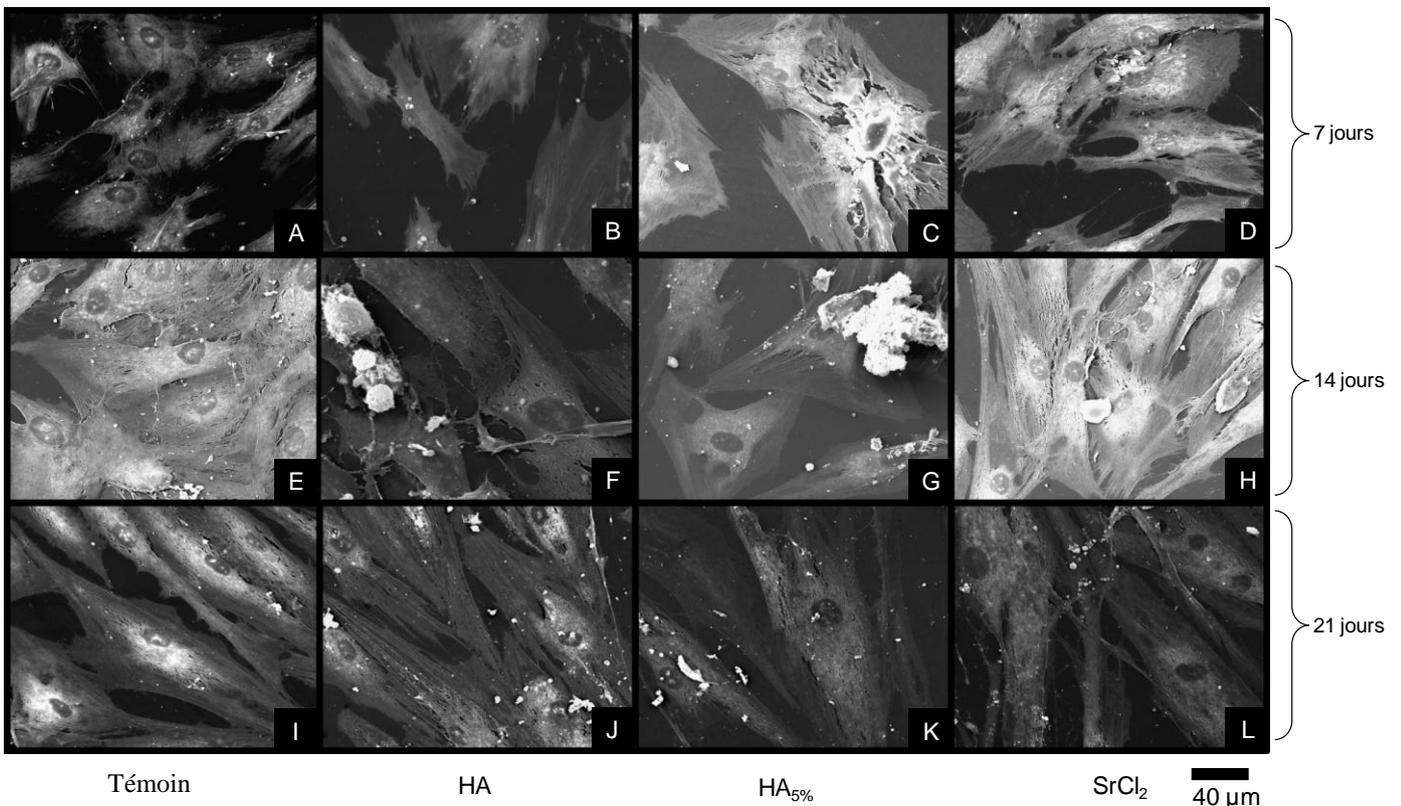
**Figure 56 : Représentation comparative de la prolifération cellulaire induite à 7, 14 et 21 jours par les différents effecteurs inclus dans les milieux de cultures de cellules ostéoblastiques primaires.**

Les études statistiques ont montré des différences significatives entre les échantillons HA<sub>5%</sub> et SrCl<sub>2</sub> d'une part et les échantillons témoins d'autre part. L'HA<sub>5%</sub> et l'ajout de SrCl<sub>2</sub> dans le milieu de culture de cellules ostéoblastiques primaires permettent une augmentation de la prolifération de ces cellules. Par ailleurs, il est important de stipuler que la viabilité cellulaire est restée comprise entre 95 et 97% tout au long de l'étude.

### **3. Microscopie électronique à balayage - Etude de la morphologie cellulaire et des rapports cellules/biomatériaux.**

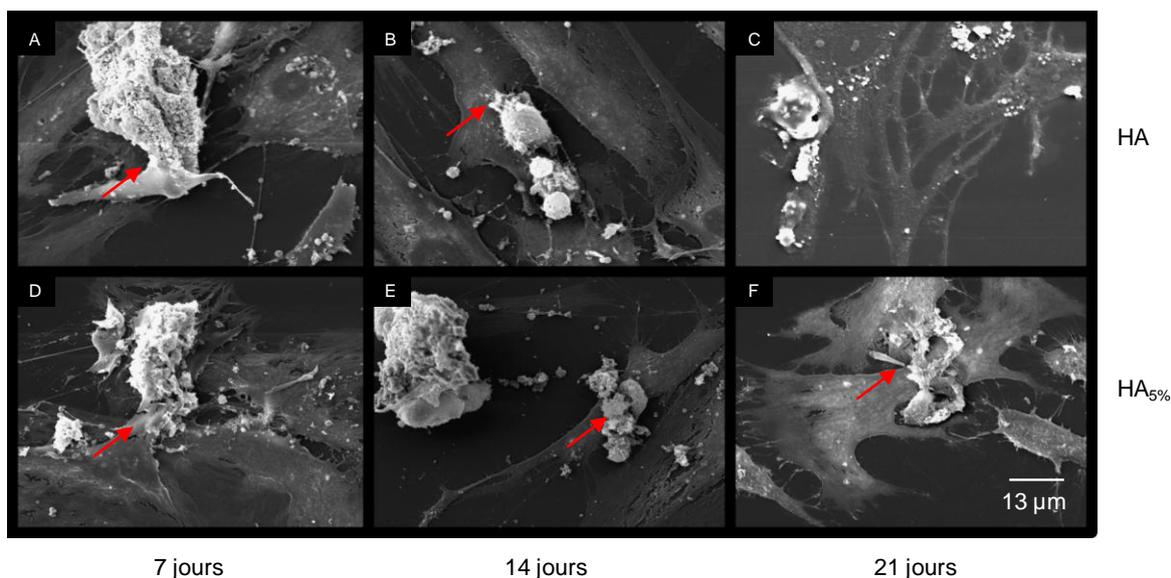
Afin de caractériser la morphologie cellulaire dans les différentes conditions de notre étude, une étude par microscopie électronique à balayage a été menée.

Les cellules se sont fortement étalées sur la lamelle de culture (figure 57). Toutes présentent en leur centre un important noyau laissant souvent apparaître des nucléoles. Elles présentent une morphologie polygonale agrémentée de nombreuses extensions cytoplasmiques. Aux temps les plus courts (figure 57, A-D), les cellules n'ont pas révélé d'orientation particulière et sont apparues relativement éparpillées. Avec l'augmentation du temps de culture (figure 57, E-L), les cellules se sont organisées pour former des travées de plus en plus parallèles. Elles ont également développé de nombreux contacts cellulaires. Aucune modification de la morphologie cellulaire n'a pu être retrouvée entre les différentes conditions de traitement.



**Figure 57 : Morphologie des cellules traitées par les 3 conditions d'études (HA, HA5% et SrCl<sub>2</sub>) comparées à la condition témoin aux 3 temps de l'étude.**

Les cellules ont développé d'importants contacts avec les biomatériaux employés. De nombreuses extensions cytoplasmiques fusent en direction des matériaux et entrent en contact avec ces derniers (figure 58, ). Aucune morphologie d'évitement n'a pu être constatée. Les cellules cherchent à établir un contact avec les matériaux employés.



**Figure 58 : Contacts cellules biomatériaux aux 3 temps de l'étude.**

En conclusion, l'adjonction des biomatériaux ou la supplémentation par le chlorure de strontium n'ont pas engendré de modification de la morphologie des cellules ostéoblastiques primaires. Aucun signe de toxicité n'a pu être observé. Au contraire, de nombreuses extensions cytoplasmiques ont pu être observées entre les cellules et les biomatériaux. Devant ces résultats encourageants et devant ce comportement cellulaire intéressant, l'étude de l'expression génique de nos cellules a été réalisée.

## 4. Ostéogénèse : étude de l'expression génique par PCR Arrays

### 4.1. Ostéogénèse – phénotype des témoins

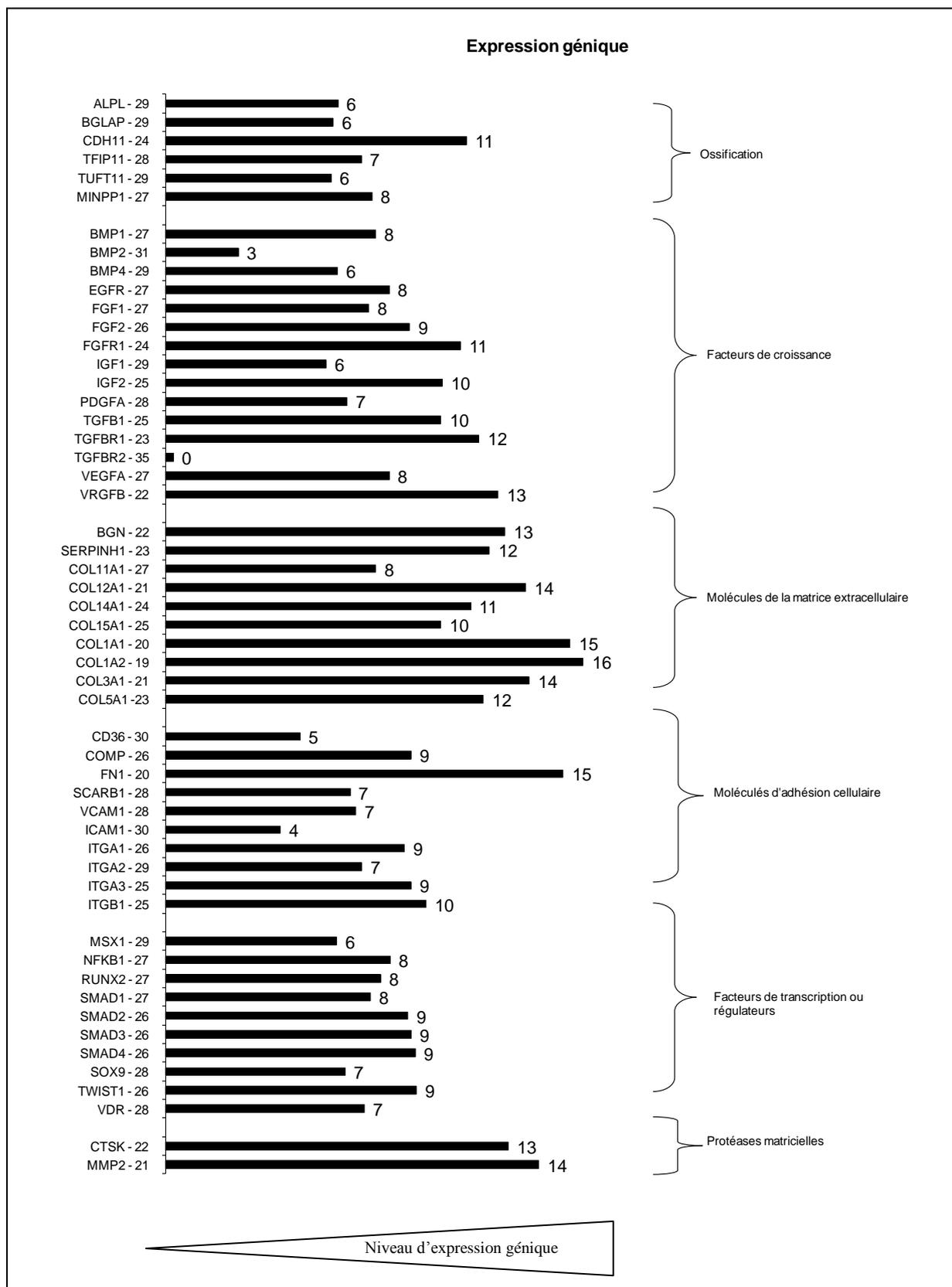
#### 4.1.1. Gènes non exploitables

Une première approche des modifications de l'expression génique a été réalisée sur culture de cellules seules par l'intermédiaire des PCR Arrays : 89 gènes potentiellement exprimés par les cellules osseuses ont pu ainsi être étudiés. Parmi ces 89 gènes, 5 étaient des gènes de contrôle interne (Gènes de ménage : B2M, HPRT1, RPL13A, GADPH, et ACTB), 31 gènes se sont révélés inexploitables par cette technique en raison d'une amplification non spécifique ou d'une expression en dehors des seuils de détection de la technique (figures 59) et 53 nous ont donnés des résultats exploitables (figure 60).

Ossification	Facteurs de croissance et de prolifération cellulaire		Molécules de la matrice	Molécules d'adhésion cellulaire
AMB1	ANXA5	FGFR2	AMELY	ITGAM
AHSG	BMP3	FGF3	ENAM	TNF
CALCR	BMP5	FLT1	DSPP	
PHEX	BMP6	GDF10	COL2A1	Protéases
STATH	CSF2	IGF1R	COL4A1	MMP-8
DMP1	CSF3	TGFB2	COL10A1	MMP-9
	EGF	TGFB3		MMP-10

**Figure 59 : Tableau présentant les gènes inexploitables par PCR Arrays en raison de courbes de dissociation anormales ou de Ct en dehors du seuil de détection.**

## 4.1.2. Gènes exploitables

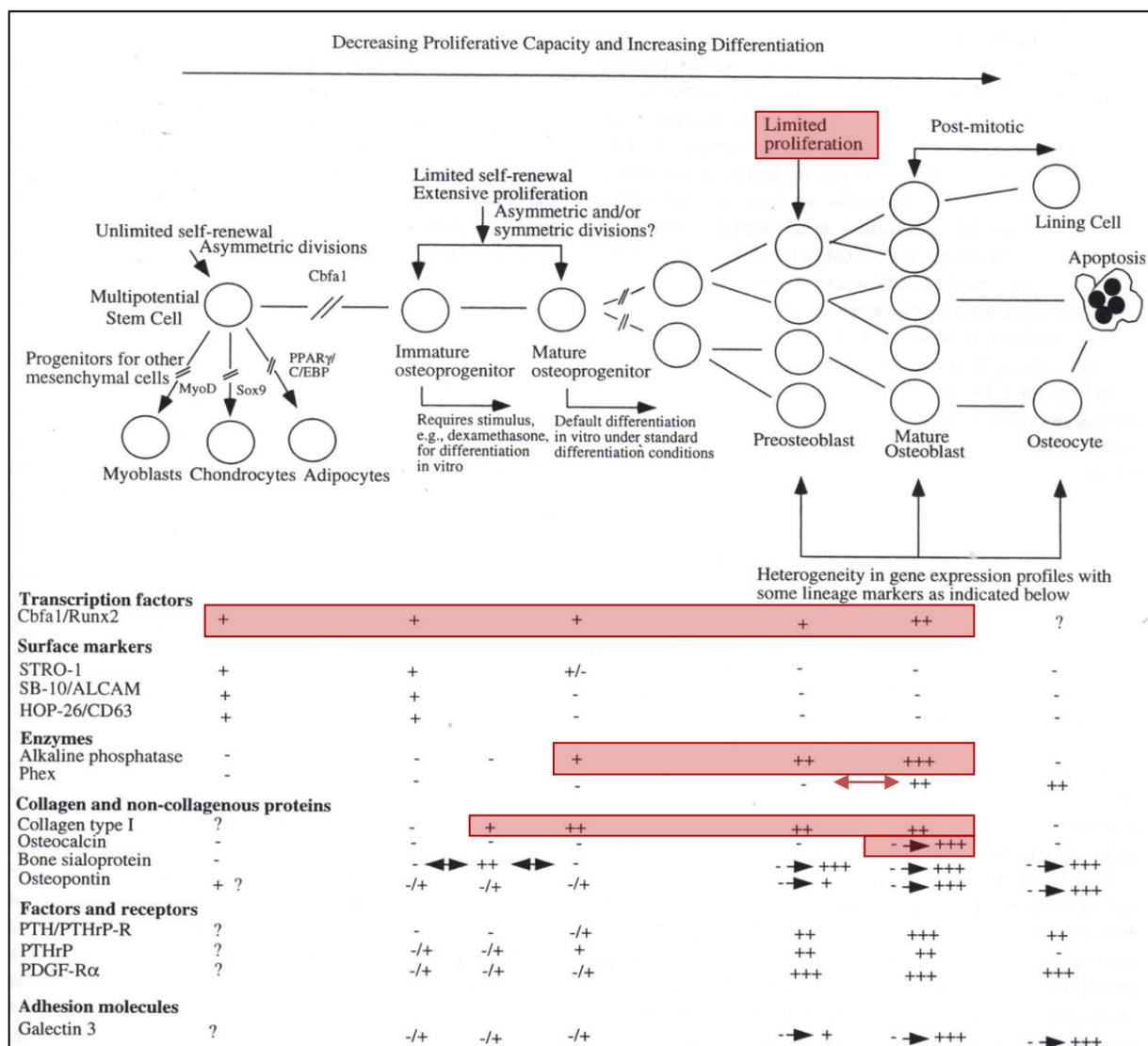


**Figure 60 : Gènes exprimés et exploitables par PCR Arrays.**

(Représentés sous la forme : Nom du gène – Ct moyen. Les barres représentent le niveau moyen d'expression du gène et la valeur située à l'extrémité est le résultat de la formule  $Ct_{moyen} - 35$  (35 étant le seuil de détection de la technique).

Les gènes retrouvés exploitables sont conformes au phénotype des cellules de la lignée ostéoblastique cultivées dans un milieu exempt de facteurs nécessaires à la différenciation terminale des ostéoblastes ou à la minéralisation. Ainsi, des marqueurs relativement spécifiques des ostéoblastes ont été détectés (RUNX2 ou COL1A1 et COL1A2). Les BMP-2 et -4, principales BMPs décelables chez les ostéoblastes selon Canalis (2003) ont bien été détectées. D'autres marqueurs, décrits comme plus spécifiques des ostéoblastes arrivant à maturation ont également pu être détectés tels que l'ostéocalcine (BGLAP) et la phosphatase alcaline (ALPL). Néanmoins, nos cellules conservant une capacité proliférative, il est possible de situer le stade de différenciation comme étant compris entre les stades de préostéoblastes et d'ostéoblastes matures, tout en gardant à l'esprit qu'une hétérogénéité, qui existe physiologiquement au sein du tissu osseux, est présente au sein de notre modèle d'étude.

**Figure 61 : Représentation schématique des étapes présumées de différenciation des ostéoprogéniteurs et**



de l'expression des gènes marqueurs des cellules ostéoblastiques selon Aubin (1998). (- signifie non détectable, +/- à +++ échelle allant de détectable à très fortement exprimé, => expression hétérogène). Les zones rouges représentent les données acquises après l'étude par PCR Arrays.

## 4.2. Effet de la poudre d'HA sur les cellules primaires issues d'explants

### 4.2.1. Ossification

Les gènes codant la phosphatase alcaline (ALPL), l'ostéocalcine (BGLAP) et le CDH11 n'ont pas montré de variation significative lors de l'ajout dans le milieu de culture de la poudre d'HA. MINPP1, gène codant une phosphatase permettant la métabolisation de l'inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate et de l'inositol hexakisphosphate (Chi 2000) est légèrement augmentée à 7 jours. TFIP11 est un gène codant une protéine faisant partie du spliceosome qui permet la libération de l'intron. Cette protéine est essentielle à la survie cellulaire et est directement liée à l'augmentation de l'expression génique de la cellule. L'HA exerce sur cette expression une action biphasique : la réduisant à 7 jours puis l'augmentant à 14 et 21 jours (figure 62).

Gènes			ALPL	BGLAP	CDH11	MINPP1	TFIP11					
J7	HA	os398	0,16		1,11		1,10		1,14		0,70	
		os401	3,53	NS	0,46	NS	0,80	NS	1,00	S	0,85	S
		os405	0,71		0,81		0,93		1,19		0,66	
		médiane		0,71		0,81		0,93		1,14		0,70
J14	HA	os398	2,48		1,07		1,76		0,85		1,39	
		os401	0,44	NS	0,49	NS	1,17	NS	0,82	NS	0,99	S
		os405	0,52		1,86		0,61		3,19		1,12	
		médiane		0,52		1,07		1,17		0,85		1,12
J21	HA	os398	1,42		0,95		0,90		0,93		1,41	
		os401	0,87	NS	1,57	NS	1,03	NS	0,85	NS	1,07	S
		os405	0,85		1,05		0,98		1,32		1,11	
		médiane		0,87		1,05		0,98		0,93		1,11

Figure 62 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes marquant l'ossification. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.

### 4.2.2. Facteurs de croissance

L'expression des BMP1, EGFR, FGF2, PDGFA, TGFBR1 et TGFBR2 n'ont pas montré de variation significative lors de l'ajout dans le milieu de culture de la poudre d'HA. N'ayant aucune attente vis-à-vis de FGFR1, ce dernier sera considéré comme non significatif. Les expressions BMP se sont vues transitoirement augmentées à 14 jours pour la BMP4 et à 21 jours pour la BMP2. Les expressions du FGF1 et de l'IGF2 ont été légèrement diminuées lors du temps le plus court (7 jours). L'IGF1 et le TGFBR1 ont connu une expression biphasique avec une diminution d'expression respectivement au 7<sup>ème</sup> jour et au 14<sup>ème</sup> jour qui a été suivie d'une augmentation respectivement aux 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. L'expression de VEGFA a été diminuée aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours alors que celle de VEGFB a connu une augmentation au 14<sup>ème</sup> jour (figure 63).

Gènes			BMP1	BMP2	BMP4	EGFR	FGF1	FGF2	FGFR1	IGF1	IGF2	PDGFA								
J7	HA	os398	0,95	4,32	1,07	1,21	0,61	0,23	1,25	0,90	0,34	1,38								
		os401	1,01	NS	0,44	NS	0,57	NS	0,76	NS	0,09	S	0,61	S	0,84	NS				
		os405	0,92	1,64	0,83	0,99	0,97	1,13	1,16	0,39	0,72	1,14								
		0,95	1,64	1,07	0,99	0,76	1,07	1,16	0,39	0,61	1,14									
J14	HA	os398	1,75	0,59	3,56	1,30	2,17	1,19	1,39	2,26	11,2	1,00								
		os401	0,71	NS	0,98	NS	0,91	NS	0,87	NS	0,46	NS	0,74	NS	9,55	S	3,92	NS	0,39	NS
		os405	0,26	23,4	1,76	1,15	0,06	0,63	0,47	8,51	0,20	1,44								
		0,71	0,98	2,52	1,15	0,87	0,63	0,74	8,51	0,20	3,92	1,00								
J21	HA	os398	1,12	2,69	1,14	1,09	0,81	1,18	0,99	0,78	1,35	1,71								
		os401	0,98	NS	2,18	S	0,47	NS	0,75	NS	1,03	NS	0,98	NS	1,05	NS	0,82	NS		
		os405	0,90	1,37	1,20	0,67	1,45	0,99	1,16	0,58	1,08	0,66	1,08							
		0,98	2,18	1,14	0,75	1,03	0,99	1,08	0,78	1,05	1,08									

Gènes			TGFB1	TGFB1	TGFB2	VEGFA	VEGFB					
J7	HA	os398	0,77	0,73	8,02	0,90	0,97					
		os401	0,76	NS	0,86	NS	0,84	NS	0,55	S	1,12	NS
		os405	1,14	1,26	0,63	0,81	0,81	1,05				
		0,77	0,86	0,84	0,81	1,05						
J14	HA	os398	0,85	2,01	2,09	0,39	1,72					
		os401	0,33	S	1,56	NS	0,18	NS	0,35	S	1,68	S
		os405	0,40	0,32	1,56	1,56	0,33	1,86				
		0,40	1,56	1,56	0,35	1,72						
J21	HA	os398	1,39	0,95	0,85	1,26	0,81					
		os401	1,25	S	0,92	NS	0,40	NS	0,95	NS	1,09	NS
		os405	1,81	1,36	36,7	1,19	1,05					
		1,39	0,95	0,85	1,19	1,05						

**Figure 63 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des facteurs de croissance. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».**

### 4.2.3. Molécules de la matrice extracellulaire

Peu de molécules de la matrice extracellulaire ont été modifiées par l'incorporation des poudres d'HA au sein des milieux de culture. Seule l'expression du Biglycan codé par BGN a été modifiée : une diminution de l'expression de ce gène a pu être constatée au 7<sup>ème</sup> jour alors qu'une augmentation a eu lieu au 21<sup>ème</sup> jour (figure 64).

Gènes			BGN	SERPINH1	COL11A1	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL1A1	COL1A2	COL3A1	COL5A1							
J7	HA	os398	0,98	0,46	0,52	0,63	1,88	0,16	0,66	0,39	1,16	0,35							
		os401	0,44	S	1,12	NS	1,06	NS	0,94	NS	0,72	NS	0,99	NS	0,92	0,70	NS		
		os405	0,87	0,88	0,86	1,33	1,06	1,22	1,12	0,87	0,86	1,14							
		0,87	0,88	0,86	0,63	1,06	0,72	0,99	0,87	0,92	0,70								
J14	HA	os398	1,82	2,15	4,17	NS	2,16	1,01	4,35	1,82	1,80	1,92							
		os401	0,45	NS	0,90	NS	1,98	3,01	NS	0,80	NS	0,61	NS	1,00	NS	1,80	0,76	NS	
		os405	0,61	0,61	0,62	0,37	2,16	0,13	0,22	0,28	0,14	0,05	0,21						
		0,61	0,90	1,98	2,16	0,80	0,61	0,61	0,84	1,00	1,80	0,76							
J21	HA	os398	1,05	1,21	0,87	0,68	0,91	0,59	0,95	0,95	0,81	0,96							
		os401	2,64	S	0,89	NS	2,35	NS	2,30	NS	0,96	S	1,25	NS	1,20	NS	1,19	1,71	NS
		os405	1,60	0,75	1,45	0,97	0,89	1,71	1,12	0,78	0,72	1,22							
		1,60	0,89	1,45	0,97	0,91	1,25	1,12	0,95	0,81	1,22								

**Figure 64 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.**

### 4.2.4. Molécules d'adhésion cellulaire

CD36 et les gènes codant les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  (ITGA1, ITGA2, ITGA3) n'ont pas vu leur expression modifiée par les poudres d'HA. Le gène codant la fibronectine 1 a montré une diminution de synthèse à 14 jours alors que SCARB1 était surexprimée au 7<sup>ème</sup> jour. L'expression de COMP a été biphasique : son expression a diminué au 7<sup>ème</sup> jour et a

augmenté au 21<sup>ème</sup>. L'expression du gène ITGB1 codant l'intégrine  $\beta$ 1 a augmenté aux 7<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours alors qu'elle était diminuée au 14<sup>ème</sup> (figure 65).

Gènes			CD36	COMP	FN1	SCARB1	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGB1								
J7	HA	os398	0,46	0,49	0,83	1,32	1,04	2,63	0,90	1,11								
		os401	2,98	NS	0,87	0,96	1,07	S	1,25	NS	1,32	NS	1,07	S				
		os405	0,77	0,77	0,90	1,81	1,08	0,95	0,81	1,19	1,02	1,07						
			0,77	0,87	0,96	1,08	1,04	0,81	1,19	1,07								
J14	HA	os398	1,15	8,71	0,74	2,32	1,54	0,80	1,17	0,89								
		os401	2,19	NS	1,14	NS	0,40	S	0,71	NS	1,24	NS	0,28	S	0,50	NS	0,70	S
		os405	0,51	0,29	0,16	6,40	0,88	1,20	0,20	0,33								
			1,15	1,14	0,40	2,32	1,24	0,80	0,50	0,70								
J21	HA	os398	0,20	1,09	1,72	1,10	1,01	1,86	1,18	1,14								
		os401	1,34	NS	3,78	S	0,91	NS	0,81	NS	0,81	NS	0,75	NS	1,04	S		
		os405	0,78	1,87	1,11	1,71	0,68	1,59	1,26	1,15								
			0,78	1,87	1,11	1,10	0,92	1,59	1,18	1,14								

**Figure 65 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.**

#### 4.2.5. Facteurs de transcription et régulateurs

Aucune modification d'expression n'a pu être constatée pour RUNX2, SMAD2, SMAD3, SOX9 ou TWIST1. SMAD1 et SMAD 4 ont montré une diminution de leur expression respectivement aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours. MSX1 a vu son expression diminuer au 7<sup>ème</sup> jour puis augmenter au 14<sup>ème</sup> (figure 66).

Gènes			MSX1	NFKB1	RUNX2	SMAD1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SOX9	TWIST1	VDR				
J7	HA	os398	0,45	1,08	1,13	1,00	0,99	0,95	0,99	1,06	0,35	1,44				
		os401	0,92	S	1,19	0,66	NS	0,88	S	1,19	NS	1,09	NS	0,90	NS	
		os405	0,76	1,16	0,93	0,70	1,07	1,10	0,94	1,08	0,92	0,92	0,99			
			0,76	1,16	0,93	0,88	1,02	1,10	0,94	1,06	0,92	0,99				
J14	HA	os398	1,31	1,14	1,72	1,59	1,22	1,67	1,23	1,40	1,55	0,94				
		os401	1,01	S	0,81	NS	1,70	NS	0,90	NS	0,66	NS	1,23	NS	0,32	S
		os405	1,16	1,01	0,74	0,15	0,22	0,97	1,38	0,28	0,61	0,93				
			1,16	1,01	0,74	1,15	0,90	0,97	1,23	0,66	1,23	0,93				
J21	HA	os398	0,97	0,46	0,97	1,10	1,17	1,23	0,98	1,22	1,32	1,40				
		os401	0,97	NS	0,78	S	1,42	NS	0,77	NS	0,89	NS	0,81	NS	0,89	NS
		os405	1,84	0,83	0,81	0,83	1,30	1,27	0,91	1,84	0,97	1,33				
			0,97	0,78	0,97	0,83	1,17	1,23	0,92	1,22	0,97	1,33				

**Figure 66 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.**

#### 4.2.6. Protéases matricielles

L'expression des gènes codant les protéases matricielles CTSK et MMP2 a augmenté à tous les temps de l'étude (figure 67).

Gènes			CTSK		MMP2	
J7	HA	os398	10,4		2,88	
		os401	2,42	S	1,05	S
		os405	1,24		1,67	
				2,42		1,67
J14	HA	os398	1,08		1,36	
		os401	1,23	S	1,79	S
		os405	1,77		1,21	
				1,23		1,36
J21	HA	os398	1,17		1,01	
		os401	1,01	S	1,04	S
		os405	1,24		1,08	
				1,17		1,04

Figure 67 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistiques avec les témoins.

### 4.3. Effet du chlorure de strontium sur les cellules primaires issues d'explants

#### 4.3.1. Ossification

Les gènes codant la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine n'ont pas montré de variation d'expression lors de l'incorporation du chlorure de strontium à une concentration de  $5.10^{-5}M$ . Il en est de même pour MINPP dont le test de permutation a validé la significativité statistique uniquement dans le cas d'une hypothèse «one sided». CDH11 a été moins exprimé au 7<sup>ème</sup> jour et TFIP11 a encore ici connu une expression biphasique consistant en une diminution d'expression au 7<sup>ème</sup> jour suivie d'une augmentation au 21<sup>ème</sup> jour (figure 68).

Gènes			ALPL		BGLAP		CDH11		MINPP1		TFIP11	
J7	SrcI2	os398	0,41		1,28		0,83		1,25		0,69	
		os401	2,57	NS	0,36	NS	0,77	S	0,94	NS	0,96	S
		os405	1,55		0,97		0,93		0,98		0,75	
		médiane		1,55		0,97		0,83		0,98		0,75
J14	SrcI2	os398	6,30		1,24		1,33		0,93		1,37	
		os401	0,22	NS	0,86	NS	0,87	NS	0,88	NS	0,99	S
		os405	1,38		2,11		1,70		2,86		3,74	
		médiane		1,38		1,24		1,33		0,93		1,37
J21	SrcI2	os398	1,28		1,39		0,97		0,76		1,24	
		os401	#####	NS	0,71	NS	0,81	NS	0,74	S*	1,12	S
		os405	1,55		1,33		1,13		1,01		1,49	
		médiane		1,55		1,33		0,97		0,76		1,24

Figure 68 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes marquant l'ossification. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

#### 4.3.2. Facteurs de croissance

Les gènes BMP2, BMP4, FGF2, FGFR1 et PDGFA n'ont pas vu leurs expressions modifiées par la supplémentation des milieux de culture en strontium. Les expressions de FGF1 et TGFβ1 ont diminué au 7<sup>ème</sup> jour. Il en est de même pour VEGFA au 21<sup>ème</sup> jour alors que les expressions d'EGFR, IGF2, TGFβR1 et TGFβR2 ont été augmentées au 14<sup>ème</sup> jour et BMP1 au 21<sup>ème</sup>. IGF1 et VEGFB ont été augmentés à tous les temps de l'étude mais ce dernier n'a

montré qu'une différence statistiquement significative que pour un test «one sided» au 7<sup>ème</sup> jour (figure 69).

Gènes			BMP1		BMP2		BMP4		EGFR		FGF1		FGF2		FGFR1		IGF1		IGF2		PDGFA		
J7	Src12	os398	1,21		2,27		1,01		1,13		0,83		0,19		1,30		1,67		0,38		1,06		
		os401	1,44	NS	0,24	NS	1,76	NS	0,92	NS	0,51	S	1,31	NS	0,82	NS	1,07	S	1,61	NS	0,85	NS	
		os405	0,65		5,79		0,27		1,00		0,52		1,20		1,10		1,34		0,44		1,25		
		médiane		1,21		2,27		1,01		1,00		0,52		1,20		1,10		1,34		0,44		1,25	
J14	Src12	os398	2,23		0,31		3,35		1,21		2,93		0,96		1,44		4,16		12,5		0,77		
		os401	1,37	NS	1,25	NS	2,31	NS	1,21	S	0,89	NS	0,64	NS	0,69	NS	2,25	S	4,14	S	0,64	NS	
		os405	0,84		48,9		0,76		1,01		0,85		2,41		1,33		3,18		1,56		1,37		
		médiane		1,37		1,25		2,31		1,21		0,89		0,96		1,33		3,18		4,14		1,37	
J21	Src12	os398	0,97		1,32		0,88		0,88		0,81		0,92		0,79		1,16		0,92		0,83		
		os401	1,31	S	0,29	NS	1,83	NS	1,29	NS	0,72	NS	1,00	NS	0,61	NS	2,82	S	24,2	NS	0,95	NS	
		os405	1,20		1,03		1,42		1,22		1,25		1,10		1,22		1,19		1,80		1,47		
		médiane		1,20		1,03		1,42		1,22		0,81		1,00		0,79		1,19		1,80		1,47	

Gènes			TGFB1		TGFBR1		TGFBR2		VEGFA		VEGFB	
J7	Src12	os398	0,68		0,95		5,54		1,89		1,01	
		os401	0,67	S	1,16	NS	2,07	NS	0,51	NS	0,95	S*
		os405	0,79		1,08		0,79		0,25		1,14	
		médiane		0,68		1,08		2,07		0,51		1,01
J14	Src12	os398	0,75		2,63		1,44		0,81		1,79	
		os401	0,61	NS	1,54	S	1,62	S	0,78	NS	1,77	S
		os405	1,41		1,25		3,21		1,31		2,11	
		médiane		0,75		1,54		1,62		0,81		1,79
J21	Src12	os398	1,01		0,73		1,09		1,00		1,37	
		os401	0,45	NS	2,38	NS	0,27		0,78	S	1,74	S
		os405	1,57		1,83		10,0		0,99		1,07	
		médiane		1,01		1,83		1,09		0,99		1,37

Figure 69 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des facteurs de croissance. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

### 4.3.3. Molécules de la matrice extracellulaire

Aucun gène codant des molécules de la matrice extracellulaire n'a été modifié par l'incorporation de chlorure de strontium dans le milieu de culture au 7<sup>ème</sup> jour. SERPINH1, COL1A1, COL1A2 et COL5A1 ont vu leur expression augmentée par le traitement à 14 jours. BGN a été également surexprimé au 21<sup>ème</sup> jour (figure 70).

Gènes			BGN		SERPINH1		COL11A1		COL12A1		COL14A1		COL15A1		COL1A1		COL1A2		COL3A1		COL5A1		
J7	Src12	os398	0,77		0,45		0,70		0,97		0,85		0,13		0,47		0,45		1,49		0,35		
		os401	0,80	NS	1,29	NS	0,73	NS	1,01	NS	0,81	NS	0,91	NS	1,20	NS	1,25	NS	1,16		0,84	NS	
		os405	1,35		1,32		2,56		1,84		1,13		2,23		1,42		0,92		0,63		1,49		
		médiane		0,80		1,29		0,73		1,01		0,85		0,91		1,20		0,92		1,16		1,49	
J14	Src12	os398	1,42		2,11		5,62		3,30		0,46		3,41		1,31		2,10		2,33		1,90		
		os401	0,74	NS	1,40	S	1,00	NS	3,19	NS	0,99	NS	0,89	NS	1,50	S	1,64	S	1,83		1,24	S	
		os405	1,48		2,37		1,88		1,48		1,71		1,34		1,27		1,37		0,88		1,34		
		médiane		1,42		2,11		1,88		3,19		0,99		1,34		1,31		1,64		1,83		1,34	
J21	Src12	os398	0,85		0,97		0,86		0,72		0,80		0,88		0,81		0,84		0,70		0,91		
		os401	2,97	S	0,47	S*	6,74	NS	10,2	NS	1,72	NS	1,32	NS	11,8	NS	6,01	NS	6,39		4,50	NS	
		os405	1,47		1,01		1,13		0,99		1,01		0,92		1,22		1,24		0,80		1,14		
		médiane		1,47		0,97		1,13		0,99		1,01		0,92		1,22		1,24		0,80		1,14	

Figure 70 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

### 4.3.4. Molécules d'adhésion cellulaire

SCARB1 et COMP ont montré une augmentation d'expression respectivement au 7<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jour (figure 71).

Gènes			CD36	COMP	FN1	SCARB1	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGB1								
J7	Src12	os398	1,40	0,42	0,52	1,69	0,62	1,93	1,27	0,99								
		os401	1,02	NS	0,89	NS	1,73	S	1,40	NS	1,08							
		os405	0,58		2,89		1,61		3,94	1,03	0,50	0,79	0,90					
		médiane		1,02		0,89		0,63		1,73	1,03	0,50	1,09	0,99				
J14	Src12	os398	3,46	7,53	0,47	2,98	0,91	0,59	1,65	0,80								
		os401	0,90	NS	1,44	S	0,84	NS	0,81	NS	1,26	NS	0,67	NS	1,05	NS	1,02	NS
		os405	0,99		1,54		2,15		16,3		1,00		1,20		0,86		1,25	
		médiane		0,99		1,54		0,84		2,98		1,00		0,67		1,05		1,02
J21	Src12	os398	0,06	0,72	0,91	0,86	0,95	0,84	0,81	0,95								
		os401	7,23	NS	14,4	NS	0,91	NS	0,86	NS	1,42	NS	0,47	NS	0,95	NS	0,93	S*
		os405	0,90		1,25		1,26		2,68		1,09		1,44		1,90		1,00	
		médiane		0,90		1,25		0,91		0,86		1,09		1,09		0,84		0,95

Figure 71 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules d'adhésion cellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

### 4.3.5. Facteurs de transcription et régulateurs

Au 7<sup>ème</sup> jour, les expressions de SOX9 et MSX1 ont diminuer. Au contraire, au même temps, NFKAB1 a été légèrement surexprimé. Au 14<sup>ème</sup> jour, RUNX2, SMAD3, SMAD4 et TWIST1 ont également été surexprimés. Enfin, au 21<sup>ème</sup> jour, les expressions de MSX1, RUNX2 et TWIST1 ont augmenté (figure 72).

Gènes			MSX1	NFKB1	RUNX2	SMAD1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SOX9	TWIST1	VDR											
J7	Src12	os398	0,42	1,01	1,21	1,17	0,98	1,14	0,98	0,92	0,61	0,89											
		os401	0,61	S	1,27	S	1,10	NS	1,21	NS	1,01	NS	0,96	0,64	S	1,80	NS	0,86	NS				
		os405	0,85		1,05		0,93		0,66		1,00		0,90		1,20		0,96		0,93	1,35			
		médiane		0,61		1,05		1,10		1,17		1,00		1,07		0,98		0,92		0,93	0,89		
J14	Src12	os398	1,22	1,07	1,85	1,87	1,20	2,00	1,21	1,22	2,71	0,58											
		os401	0,87	NS	1,01	NS	1,67	S	1,12	NS	0,95	NS	1,09	S	1,07	S	0,76	NS	1,86	S	0,53	NS	
		os405	0,79		0,94		1,27		0,92		1,21		1,60		1,08		1,19		1,03		1,19		
		médiane		0,87		1,01		1,67		1,12		1,20		1,60		1,08		1,19		1,86		0,58	
J21	Src12	os398	1,00	0,28	1,14	0,87	0,98	1,04	0,81	1,01	1,16	0,93											
		os401	1,07	S*	0,97	NS	2,51	S	1,17	NS	0,98	NS	0,53	NS	1,08	NS	0,13	NS	1,52	S	0,72	NS	
		os405	1,62		1,04		1,22		1,07		1,19		1,19		1,49		1,31		1,39		1,48		1,12
		médiane		1,07		0,97		1,22		1,07		0,98		1,04		1,08		1,01		1,48		1,12	0,93

Figure 72 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des facteurs de transcription et leurs régulateurs. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

### 4.3.6. Protéases matricielles

Aucune modification d'expression des protéases matricielles n'a pu être constatée lors de cette étude (figure 73).

Gènes			CTSK		MMP2	
J7	Src12	os398	10,8		2,57	
		os401	0,50	NS	0,70	NS
		os405	0,95		1,12	
		médiane		0,95		1,12
J14	Src12	os398	1,12		1,22	
		os401	0,15	NS	0,70	NS
		os405	1,52		1,59	
		médiane		1,12		1,22
J21	Src12	os398	1,16		0,91	
		os401	0,80	NS	1,15	NS
		os405	1,23		0,65	
		médiane		1,16		0,91

**Figure 73 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des protéases matricielles. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.**

Aucune modification d'expression des protéases matricielles n'a pu être constatée lors de cette étude.

#### 4.4. Effet de la poudre HA5% sur les cellules primaires issues d'explants

##### 4.4.1. Ossification

L'incorporation de la poudre enrichie en strontium (HA5%) a conduit à une modification biphasique de l'expression de TFIP11 qui est diminuée au 7<sup>ème</sup> jour puis augmentée aux 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. Une diminution de l'expression du gène codant l'ostéocalcine peut également être décrite malgré une significativité statistique réduite au test « 1-sided ».

Gènes			ALPL		BGLAP		CDH11		MINPP1		TFIP11	
J7	HA5	os398	1,04		0,81		1,10		0,96		0,99	
		os401	1,39	NS	0,54	S*	0,90	NS	0,87	NS	0,85	S
		os405	0,90		1,04		0,74		1,32		0,66	
		médiane		1,04		0,81		0,90		0,96		0,85
J14	HA5	os398	4,96		1,06		1,36		0,85		1,29	
		os401	0,73	NS	0,68	NS	0,89	NS	1,05	NS	1,08	S
		os405	0,51		1,22		0,64		2,25		1,24	
		médiane		0,73		1,06		0,89		1,05		1,24
J21	HA5	os398	0,96		1,36		1,05		0,77		1,47	
		os401	15,3	NS	1,20	NS	0,91	NS	0,88	NS	1,17	S
		os405	0,98		0,72		0,88		1,29		1,00	
		médiane		0,98		1,20		0,91		0,88		1,17

**Figure 74 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules intervenant dans l'ossification. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».**

##### 4.4.2. Facteurs de croissance.

Les expressions de EGFR, FGF1 et IGF2 ont été diminuées par l'incorporation de la poudre HA5% dans le milieu de culture au 7<sup>ème</sup> jour. Il en est de même pour TGFB1 et VEGFA au 14<sup>ème</sup> jour. L'expression de BMP1 a été augmentée au 21<sup>ème</sup> jour, BMP2 et FGF2 ont également été retrouvés augmentés aux 7<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours, TGFBR au 14<sup>ème</sup> jour, TGFBR2

aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours et VEGFB aux 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. IGF1 a été modifié de façon biphasique avec une diminution au 7<sup>ème</sup> jour puis une augmentation au 14<sup>ème</sup> jour (figure 75).

Gènes			BMP1	BMP2	BMP4	EGFR	FGF1	FGF2	FGFR1	IGF1	IGF2	PDGFA	
J7	HAS	os398	0,99	1,19	0,84	0,91	1,00	1,16	1,09	0,77	0,73	0,92	
		os401	1,09	NS	S	2,27	NS	0,94	S	0,92	S	1,10	NS
		os405	0,73	3,00	0,38	0,58	0,90	1,25	0,90	0,37	0,35	0,94	
			0,99	1,19	0,84	0,91	0,92	1,16	1,09	0,37	0,73	0,94	
J14	HAS	os398	1,79	0,29	3,02	1,28	3,14	1,08	1,50	3,74	10,6	0,94	
		os401	0,87	NS	1,55	NS	0,54	NS	0,72	NS	0,75	NS	NS
		os405	0,26	10,0	0,61	0,33	0,49	1,22	0,52	5,49	0,19	1,13	
			0,87	1,55	1,66	0,54	2,11	1,08	0,75	3,74	1,08	0,94	
J21	HAS	os398	1,22	2,48	1,02	1,28	0,83	1,20	1,01	0,97	1,18	1,44	
		os401	1,29	S	3,13	S	1,66	NS	1,63	NS	2,98	SN	0,73
		os405	0,99	4,19	0,27	0,68	1,06	2,90	1,21	0,32	0,23	1,57	
			1,22	3,13	1,02	1,16	0,83	1,63	1,01	0,97	1,18	1,44	

Gènes			TGFB1	TGFBR1	TGFBR2	VEGFA	VEGFB
J7	HAS	os398	1,04	0,90	4,21	0,96	0,94
		os401	0,81	NS	1,18	NS	1,09
		os405	1,18	0,79	1,67	1,12	0,94
			1,04	0,90	1,67	0,96	
J14	HAS	os398	0,81	2,93	1,60	0,48	1,50
		os401	0,66	S	1,10	S	0,72
		os405	1,07	1,53	14,2	0,84	1,54
			0,81	1,53	1,60	0,72	
J21	HAS	os398	1,45	0,85	0,29	1,12	1,06
		os401	0,55	NS	2,20	NS	0,47
		os405	2,56	1,17	15,4	2,05	1,29
			1,45	1,17	0,47	1,12	

Figure 75 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des facteurs de croissance. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.

#### 4.4.3. Molécules de la matrice extracellulaire

Les gènes codant les molécules de la matrice extracellulaire ont été globalement augmentés lors de l'incorporation de la poudre HA5% : BGN au 21<sup>ème</sup> jour, COL1A1, COL1A2, COL5A1 et SERPINH1 au 14<sup>ème</sup> jour, COL11A1 aux 7<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. Seul COL14A1 a montré une réduction de son expression (figure 76).

Gènes			BGN	SERPINH1	COL11A1	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL1A1	COL1A2	COL3A1	COL5A1
J7	HAS	os398	0,89	0,94	1,03	0,83	1,04	1,12	0,97	0,90	0,95	0,85
		os401	0,51	NS	1,20	NS	1,39	NS	1,58	NS	1,13	NS
		os405	1,12	0,88	1,51	1,02	0,71	2,21	1,04	1,04	0,32	0,60
			0,89	0,94	1,39	0,92	1,04	1,12	1,04	0,90	0,95	
J14	HAS	os398	1,84	2,42	5,94	3,68	0,64	4,86	2,09	2,43	2,96	2,86
		os401	0,52	NS	1,02	S	2,51	NS	1,23	NS	1,00	S
		os405	0,96	1,07	0,51	0,47	0,31	0,94	1,61	1,34	0,08	1,49
			0,96	1,07	1,07	2,51	1,23	0,64	0,94	1,61	1,34	
J21	HAS	os398	1,61	1,10	1,02	0,67	1,13	0,94	0,96	0,86	0,65	0,90
		os401	2,63	S	2,50	NS	6,60	S	8,67	NS	1,87	NS
		os405	1,87	0,83	1,39	0,69	0,93	3,60	1,15	1,15	0,71	0,43
			1,87	1,10	1,39	0,69	1,13	1,29	1,15	0,86	0,65	

Figure 76 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules de la matrice extracellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.

#### 4.4.4. Molécules d'adhésion cellulaire

COMP a vu une augmentation de son expression aux 7<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de culture en présence de la poudre d'HA5%. Il en est de même pour FN1 au 7<sup>ème</sup> jour ainsi que pour ITGB1 au 7<sup>ème</sup> jour (test 1-sided) (figure 77).

Gènes			CD36		COMP		FN1		SCARB1		ITGA1		ITGA2		ITGA3		ITGB1	
J7	HA5	os398	0,91		0,96		1,23		0,94		0,83		1,99		0,96		1,20	
		os401	4,17	NS	1,37	S	1,45	S	1,78	NS	1,36	NS	1,85	NS	1,82	NS	1,47	S*
		os405	0,49		1,71		1,55		0,59		0,75		0,68		0,72		0,93	
				0,91		1,37		1,45		0,94		0,83		1,85		0,96		1,20
J14	HA5	os398	1,43		10,0		0,83		2,60		1,41		0,93		1,73		1,08	
		os401	3,29	NS	1,16	NS	1,20	NS	0,56	NS	1,28	NS	1,20	NS	1,35	NS	1,05	NS
		os405	0,61		0,85		0,51		4,93		0,49		0,12		0,35		0,57	
				1,43		1,16		0,83		2,60		1,28		0,93		1,35		1,05
J21	HA5	os398	0,18		1,55		1,46		1,33		1,13		1,15		1,07		0,81	
		os401	5,49	NS	11,2	S	0,88	NS	0,84	NS	1,48	NS	0,35	NS	0,65	NS	1,05	NS
		os405	0,44		5,51		2,07		13,0		0,72		0,92		1,05		1,10	
				0,44		5,51		1,46		1,33		1,13		0,92		1,05		1,05

Figure 77 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des molécules intervenant dans l'adhésion cellulaire. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

#### 4.4.5. Facteurs de transcription et leurs régulateurs

La poudre HA5% a produit une diminution de l'expression de SOX9, RUNX2 et MSX1 au 7<sup>ème</sup> jour. L'expression de ce dernier a ensuite été retrouvée augmentée. L'expression de SMAD3 a augmenté au 14<sup>ème</sup> jour alors que celle de SMAD4 a été diminuée au 7<sup>ème</sup> jour puis augmentée au 21<sup>ème</sup> jour. Le gène codant le récepteur à la vitamine D a été au contraire surexprimé au 7<sup>ème</sup> jour puis diminué au 14<sup>ème</sup> jour (figure 78).

Gènes			MSX1		NFKB1		RUNX2		SMAD1		SMAD2		SMAD3		SMAD4		SOX9		TWIST1		VDR	
J7	HA5	os398	0,97		0,97		0,79		0,92		0,96		0,85		0,96		0,92		0,92		1,03	
		os401	0,74	S	1,53	NS	0,98	S	1,06	NS	1,10	NS	1,10	NS	0,82	S	0,91	S	1,25	NS	1,14	S
		os405	0,88		0,84		0,64		0,66		0,98		0,85		0,93		0,85		0,64		1,17	
				0,88		0,97		0,79		0,92		0,98		0,85		0,93		0,91		0,92		1,14
J14	HA5	os398	1,24		1,24		1,81		1,69		1,32		1,94		1,40		1,36		2,18		0,60	
		os401	1,32	S	0,89	NS	0,78	NS	0,73	NS	1,05	NS	1,22	S	0,88	NS	0,61	NS	0,70	NS	0,52	S
		os405	1,97		0,19		0,44		0,83		0,76		1,22		0,79		0,42		0,34		0,71	
				1,32		0,89		0,78		0,83		1,05		1,22		0,88		0,61		0,70		0,60
J21	HA5	os398	0,86		1,11		0,83		0,86		1,14		1,20		1,04		1,81		0,97		1,48	
		os401	1,58	NS	0,94	NS	2,31	NS	1,25	NS	0,95	NS	0,51	NS	0,98	S*	0,11	NS	1,54	NS	0,52	NS
		os405	2,87		0,97		0,83		0,68		1,23		0,92		1,36		1,26		0,84		2,46	
				1,58		0,97		0,83		0,86		1,14		0,92		1,04		1,26		0,97		1,48

Figure 78 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des facteurs de transcription ou leurs régulateurs. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins. S\* signifie des valeurs statistiquement différentes du témoin avec un test « 1-sided ».

#### 4.4.6. Protéases matricielles.

L'expression de CTSK a augmenté au 7<sup>ème</sup> jour alors que celle de MMP2 a, au contraire, été diminuée au 14<sup>ème</sup> jour (figure 79).

Gènes			CTSK		MMP2	
J7	HA5	os398	1,13		0,89	
		os401	3,92	S	1,42	NS
		os405	1,11		0,84	
				1,13		0,89
J14	HA5	os398	1,05		0,64	
		os401	0,67	NS	0,69	S
		os405	1,23		0,29	
				1,05		0,64
J21	HA5	os398	1,34		1,03	
		os401	0,74	NS	0,85	NS
		os405	0,97		1,10	
				0,97		1,03

**Figure 79 : Résultats de PCR arrays concernant les gènes codant des protéases matricielles. Les valeurs en rouge sont des valeurs significativement augmentées par rapport aux témoins, les valeurs en bleu sont des valeurs significativement diminuées par rapport aux témoins. NS signifie des valeurs sans significativité statistique avec les témoins.**

## 4.5. Conclusions.

### 4.5.1. Ossification.

Quel que soit le traitement réalisé sur les cellules, l'expression de TFIP11 a été diminuée au 7<sup>ème</sup> jour puis augmentée aux 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours. L'expression de la protéine codée par ce gène intervenant dans le spliceosome a été décrite comme liée à l'intensité de l'expression génique générale de la cellule, nous pouvons en déduire une relative diminution de cette expression aux temps courts de l'étude pour les 3 traitements. Les gènes codant la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine n'ont pas connu de modification significative.

### 4.5.2. Facteurs de croissance.

Parmi tous les facteurs exprimés et étudiés, seule l'expression de PDGFA n'a pas montré de variation significative tout au long de l'étude. Au contraire, l'expression de IGF1 a montré des modifications semblables (diminution au 7<sup>ème</sup> jour et augmentation au 14<sup>ème</sup> jour) lors des traitements par les poudres HA et HA5. Le traitement par le chlorure de strontium ayant amené une surexpression aux 3 temps de l'étude, il est possible d'émettre l'hypothèse d'un effet des poudres sur cette expression. Le VEGFB a également été surexprimé lors des 3 traitements alors que le VEGFA a plutôt été réprimé. Enfin, il est apparu que les gènes codant les récepteurs au TGF $\beta$  (TGFBR1 et TGFBR2) ont été surexprimés au 14<sup>ème</sup> jour lors des traitements mettant en œuvre du strontium.

### 4.5.3. Molécules de la matrice extracellulaire.

Les échantillons traités par les poudres d'HA n'ont pas induit de fortes modifications au sein de l'expression des molécules de la matrice extracellulaire. Seule l'expression du gène codant le biglycane a été modifiée (diminution d'expression au 7<sup>ème</sup> jour et augmentation au 21<sup>ème</sup> jour). Le gène codant le collagène de type XIV a également été réprimé au sein des

échantillons traités par les poudres (au 21<sup>ème</sup> jour pour la poudre HA et au 14<sup>ème</sup> jour pour la poudre HA<sub>5%</sub>). Les échantillons strontiés ont montré un profil comparable et intéressant au 14<sup>ème</sup> jour : les gènes codant les 2 chaînes du collagène de type I (COL1A1 et COL1A2) ont été surexprimés en parallèle du gène codant la chaperonne du collagène de type I (SERPINH1).

#### **4.5.4. Molécules d'adhésion cellulaire**

L'expression des gènes codant des molécules d'adhésion cellulaire a été peu modifiée par les traitements réalisés. L'expression de COMP n'a été diminuée qu'au 7<sup>ème</sup> jour par les échantillons traités par la poudre HA alors qu'il a été surexprimé par l'emploi de la poudre HA<sub>5%</sub> mais également par l'incorporation du chlorure de strontium au 14<sup>ème</sup> jour et par les 2 traitements particuliers au 21<sup>ème</sup> jour. Le gène codant la fibronectine (FN1) a vu son expression diminuer au 14<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités par la poudre HA alors qu'il a été surexprimé lors du traitement par la poudre HA<sub>5%</sub> au 7<sup>ème</sup> jour. SCARB 1 a été surexprimé au 7<sup>ème</sup> jour lors des traitements par le chlorure de strontium ou la poudre HA et ITGB1 a vu son expression augmenter au 7<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités par les poudres mais diminuer au 14<sup>ème</sup> jour lors du traitement par la poudre HA. Une surexpression a ensuite été de nouveau constatée pour cette même poudre.

#### **4.5.5. Facteurs de transcription et régulateurs**

L'expression de MSX1 a été modifiée de façon biphasique lors des trois traitements : une diminution d'expression est constatée au 7<sup>ème</sup> jour puis une augmentation intervient (au 14<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités par les poudres et au 21<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités par le chlorure de strontium). NFKB1 a été retrouvé surexprimé au 7<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités au chlorure de strontium et par la poudre HA. RUNX2 n'a pas montré de modification d'expression pour les échantillons traités par la poudre HA alors qu'il a montré une surexpression lors de l'emploi du chlorure de strontium à partir du 14<sup>ème</sup> jour. La poudre HA<sub>5%</sub> a engendré une diminution d'expression de ce gène au 7<sup>ème</sup> jour. SMAD3 a été surexprimée au sein des 2 échantillons strontiés au 14<sup>ème</sup> jour là où l'expression de SOX9 a été retrouvée diminuée au 7<sup>ème</sup> jour. TWIST1 a montré une surexpression aux 14 et 21<sup>èmes</sup> jours lors du traitement par le chlorure de strontium.

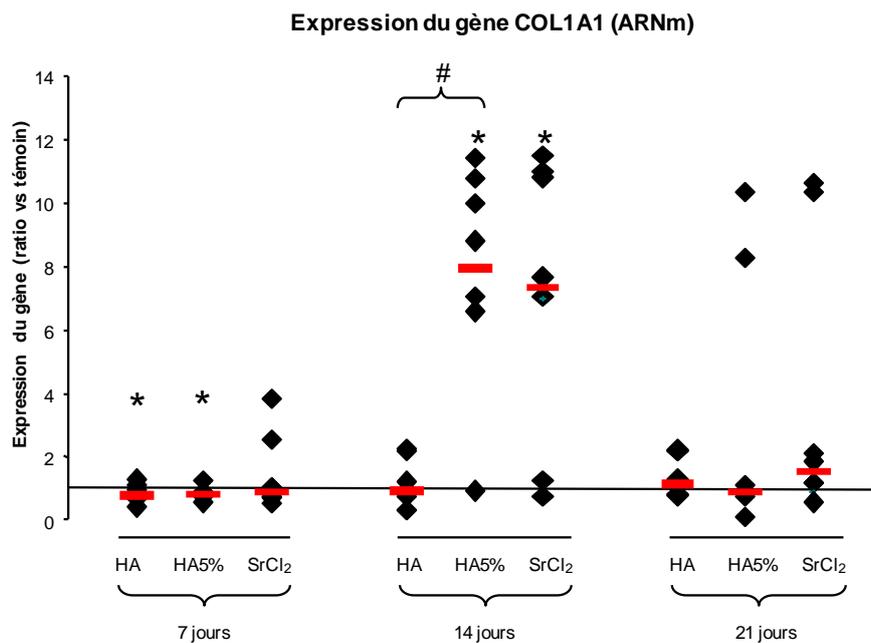
#### **4.5.6. Protéinases matricielles**

Le traitement par le chlorure de strontium n'a pas révélé de modification de l'expression de protéases matricielles. Au contraire, l'utilisation de la poudre HA a entraîné une surexpression

de ces protéases à tous les temps de l'étude. La poudre HA5% montre un profil beaucoup moins tranché avec une augmentation de l'expression de CTSK au 7<sup>ème</sup> jour qui n'est plus retrouvée ensuite et montre même une diminution de l'expression de MMP2 au 14<sup>ème</sup> jour. Afin de vérifier ces résultats, une nouvelle étude par RT-PCR en temps réel a été menée de façon à augmenter le nombre de donneurs et le nombre de réplicats techniques (passage de 3 donneurs en duplicats à 5 donneurs en triplicats). Puis, la synthèse protéique de ces molécules a été recherchée afin de tenter de corroborer ces résultats au niveau protéique. De plus, nous avons étudiés l'expression et la synthèse des TIMPs suite à leur absence des PCR Arrays.

## 5. Ostéogénèse : étude de l'expression génique par RT-PCR semi-quantitative en temps réel et ELISA

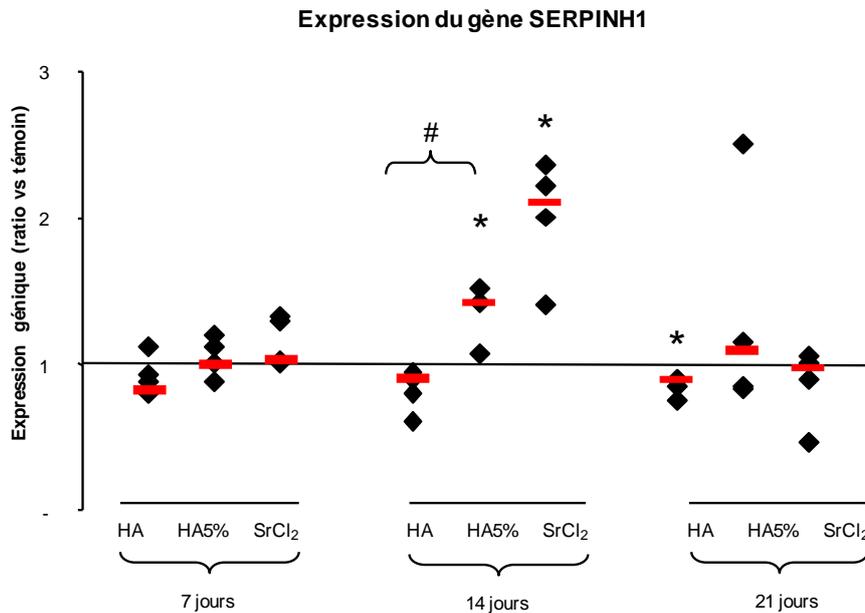
### 5.1. Etude de l'expression de COL1A1.



**Figure 80 : Résultats de l'étude de l'expression du gène COL1A1 par RT-PCR en temps réel. \* signifie statistiquement différent du témoin et # signifie une différence statistiquement significative entre échantillons.**

Cette étude a révélé une diminution d'expression du gène codant pour la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type I au 7<sup>ème</sup> jour pour les échantillons traités par les poudres de phosphates de calcium. Au 14<sup>ème</sup> jour, les échantillons strontiés ont révélé une forte augmentation de cette expression alors que les poudres HA n'ont pas amené de modifications de cette expression. Au 21<sup>ème</sup> jour, aucune différence n'a été retrouvée.

## 5.2. Etude de l'expression de SERPINH1.



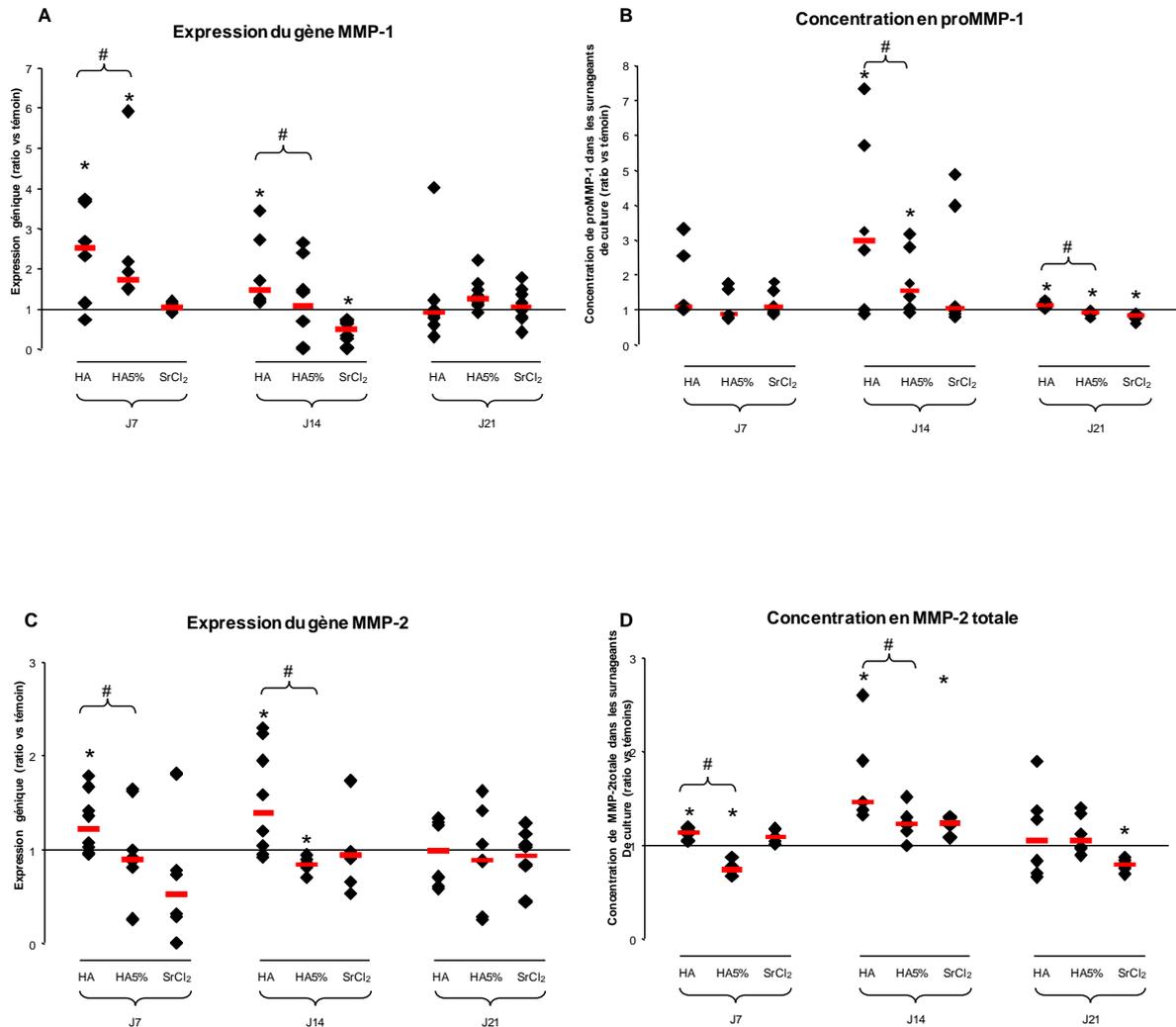
**Figure 81 : Résultats de l'étude de l'expression du gène SERPINH1 par RT-PCR en temps réel. \* signifie statistiquement différent du témoin et # signifie une différence statistiquement significative entre échantillons.**

Au 7<sup>ème</sup> jour, aucune modification de l'expression de la serpine H1 n'a pu être mise en évidence. Au 14<sup>ème</sup> jour, les échantillons strontiés ont montré une forte augmentation d'expression de SERPINH1 alors que les échantillons traités par la poudre HA montraient un niveau comparable au témoin. Au 21<sup>ème</sup> jour, la poudre HA a induit une faible diminution de l'expression du gène alors que les échantillons strontiés montraient des niveaux comparables au témoin.

Les résultats obtenus par l'étude de l'expression du gène SERPINH1 se révèlent très proches de ceux obtenus lors de l'étude de l'expression du gène COL1A1.

Il apparaît donc que les échantillons strontiés ont la capacité à induire une augmentation de l'expression des gènes codant le collagène de type I ainsi que sa chaperonne. Afin de vérifier la position de la balance osseuse, une étude de l'expression des principales métalloprotéases synthétisées par notre modèle de culture (MMP-1 MMP-2) a été menée au niveau génique mais également au niveau protéique.

### 5.3. Etude de l'expression des gènes codant les MMP-1 et MMP-2 et étude de leurs synthèses protéiques.



**Figure 82 : Résultats de l'étude de l'expression des gènes codant les MMP-1 et -2 par RT-PCR en temps réel et dosages ELISA. \* signifie statistiquement différent du témoin et # signifie une différence statistiquement significative entre échantillons.**

#### Etude de l'expression et de la production de proMMP-1.

Au 7<sup>ème</sup> jour, les poudres ont toutes deux induit une augmentation de l'expression du gène codant la MMP-1. Néanmoins, la poudre strontiée a induit une augmentation plus faible que la poudre non strontiée. Les cellules traitées par le chlorure de strontium n'ont pas montré de variations de l'expression de ce gène. Au niveau protéique, aucune différence significative n'a été retrouvée concernant la synthèse de proMMP-1.

Au 14<sup>ème</sup> jour, la poudre HA a induit une élévation de l'expression du gène MMP-1 qui n'a pas été retrouvée à ce temps de l'étude pour les échantillons traités par la poudre HA<sub>5%</sub>. Le chlorure de strontium a, lui, induit une diminution de cette expression. Au niveau protéique,

les résultats obtenus sont tout à fait comparables aux résultats décrits pour l'expression génique au 7<sup>ème</sup> jour.

Au 21<sup>ème</sup> jour, plus aucune différence d'expression génique n'a pu être mise en évidence. Au niveau protéique, la poudre HA a entraîné une augmentation de la concentration de MMP-1 alors que les échantillons strontiés ont montré une baisse de cette dernière.

En conclusion, l'adjonction de strontium au sein du biomatériau a permis de lui conférer des capacités à limiter les augmentations de synthèse de proMMP-1 induite par l'utilisation de la poudre non strontiée. Le chlorure de strontium a montré des capacités de diminution de la concentration en proMMP-1 des milieux de culture. Ce constat est également réalisé au niveau de l'expression génique avec un décalage temporel.

#### Etude de l'expression et de la production de la MMP-2 totale.

Au 7<sup>ème</sup> jour, la poudre HA a entraîné une augmentation de l'expression du gène codant la MMP-2 alors qu'aucune modification de cette expression n'a été constatée pour les deux autres échantillons. Au niveau protéique, les mêmes constats peuvent être réalisés : la poudre HA augmente la concentration en MMP-2 totale retrouvée au sein des surnageants de culture alors que la poudre HA<sub>5%</sub> entraîne une diminution de cette dernière.

Au 14<sup>ème</sup> jour, la poudre HA entraîne une augmentation de l'expression de MMP-2, là où la poudre HA<sub>5%</sub> entraîne une diminution. Ici encore, les échantillons traités au chlorure de strontium ne montrent pas de modification par rapport au témoin. Au niveau protéique, la MMP-2 totale a été retrouvée en plus forte concentration dans les échantillons traités par la poudre HA et par le chlorure de strontium alors qu'elle a été détectée au niveau du témoin pour la poudre HA<sub>5%</sub>.

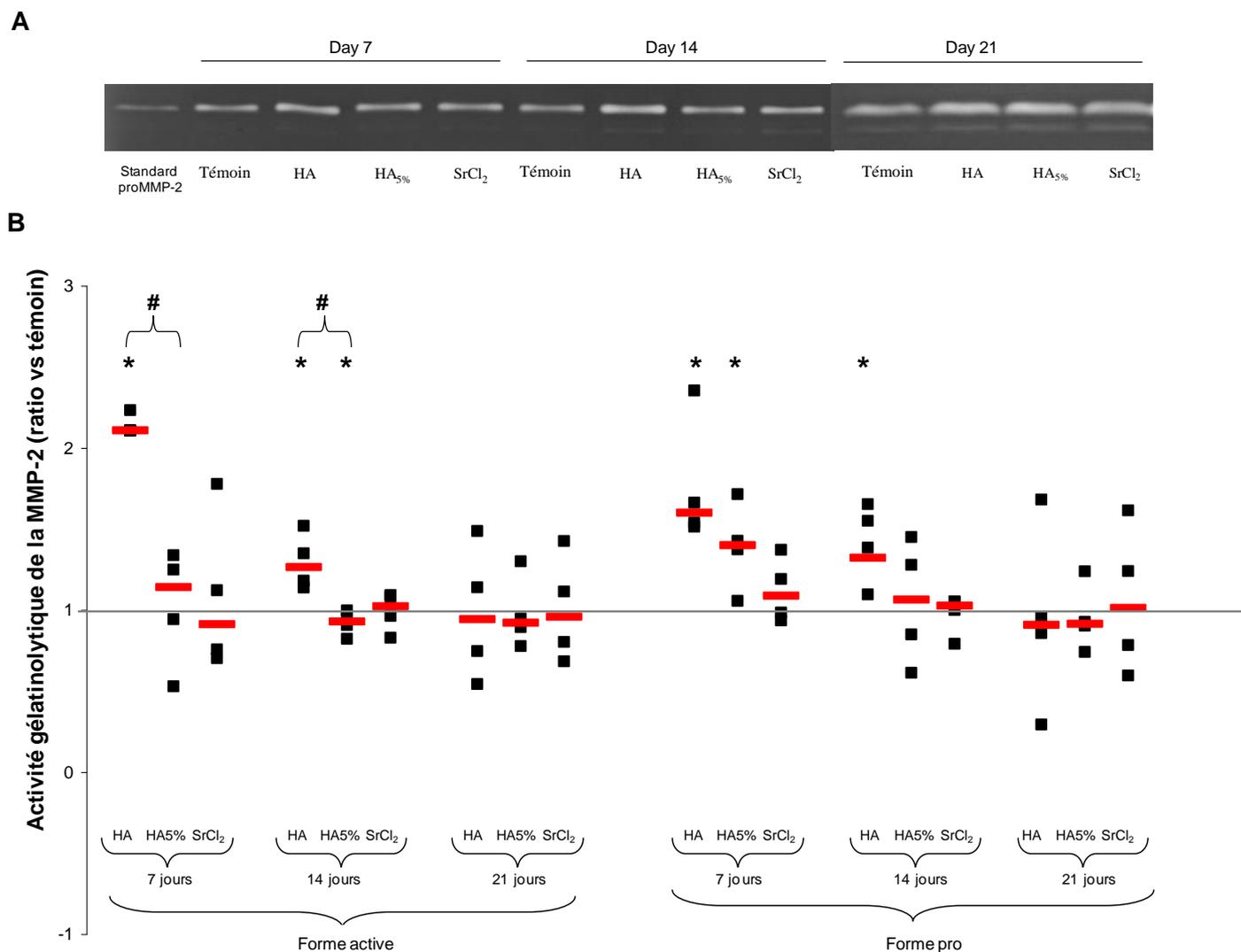
Au 21<sup>ème</sup> jour, aucune modification significative n'a pu être observée au niveau de l'expression génique. Au niveau protéique, le traitement par le chlorure de strontium a permis de diminuer la concentration des surnageants en MMP-2 totale.

En conclusion, la poudre d'HA présente une capacité à augmenter l'expression du gène codant pour la MMP-2 qui n'a pas été retrouvée pour la poudre strontiée (HA<sub>5%</sub>). Bien au contraire, cette dernière a présenté des capacités à réduire cette expression pour la mener au niveau du témoin voire en deçà. A nouveau, les niveaux protéiques des surnageants de culture ont montré un profil similaire.

Afin de compléter ces résultats, une étude par zymographie a été réalisée.

## 5.4. Étude des concentrations protéiques en proMMP-2 et en MMP-2 totale par zymographie.

### Zymographie : MMP-2



**Figure 83 : A – Exemple de zymogramme. B - Résultats de l'étude de mesure des concentrations de proMMP-2 et de MMP-2 totale au sein des surnageants de culture par zymographie. \* signifie statistiquement différent du témoin et # signifie une différence statistiquement significative entre échantillons.**

Les résultats de zymographies ont permis de confirmer les résultats précédemment acquis. Les résultats concernant la forme active de la MMP-2 sont semblables à ceux décrits pour la forme totale lors de l'étude par ELISA. Au 7<sup>ème</sup> jour, la poudre HA a entraîné une augmentation de la forme active de la MMP-2 qui n'a pas été retrouvée pour les échantillons traités par la poudre HA<sub>5%</sub>. Cette dernière a, par ailleurs, permis une diminution de cette forme au 14<sup>ème</sup> jour. Au 21<sup>ème</sup> jour, aucune modification n'a été retrouvée. Les résultats de la forme pro sont encore une fois très semblables aux résultats de la forme totale. La poudre HA a entraîné une augmentation de la concentration en proMMP-2 des milieux de culture au 7<sup>ème</sup>

et au 14<sup>ème</sup> jour qui n'a pas été retrouvée à ce dernier temps d'étude pour les échantillons traités par la poudre HA<sub>5%</sub>.

Cette étude confirme les résultats décrits précédemment par cette technique complémentaire. Il semble qu'un déséquilibre de la balance osseuse vers l'ostéoformation soit induit par l'apport de la poudre HA<sub>5%</sub> aux deux premiers temps de notre étude. Afin de vérifier que ce déséquilibre n'est pas contre-balançé par une augmentation de la synthèse d'inhibiteurs spécifiques, l'expression et la synthèse des 2 principaux inhibiteurs des MMP-1 et MMP-2 ont été étudiés.

## 5.5. Etude de l'expression des gènes codant les TIMP1 et TIMP2 et étude de leurs synthèses protéiques.

### 5.5.1. Expression de TIMP-1 et dosage de la protéine codée.

Aucune modification statistiquement significative n'a pu être discernée lors de cette étude aussi bien au niveau de l'expression génique (figure 84) que lors du dosage de la protéine dans les surnageants de culture (Figure 85).

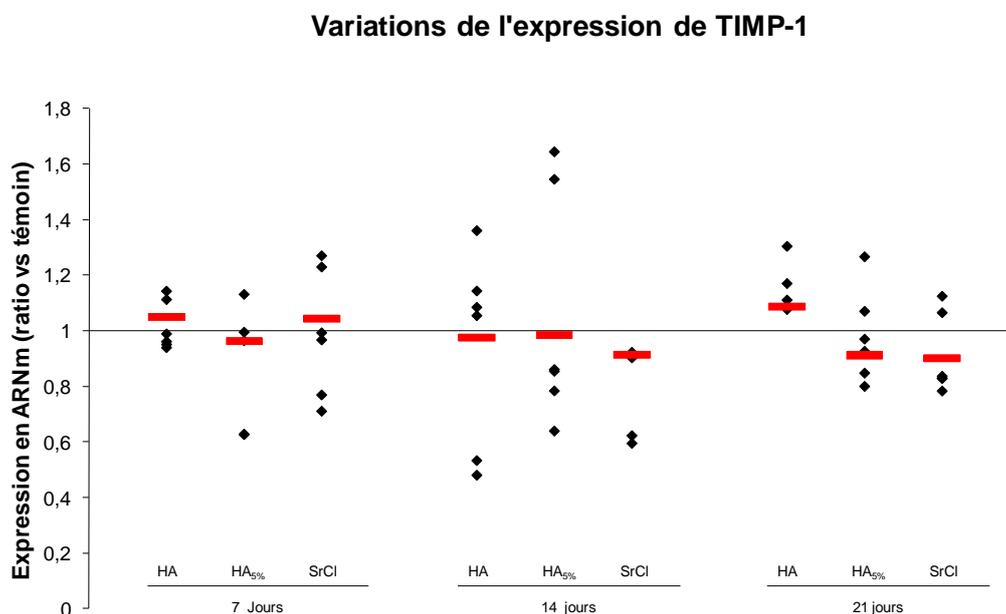


Figure 84 : Résultats de l'étude de mesure de l'expression de TIMP-1 par PCR en temps réel.

### Variations de la concentration en TIMP-1

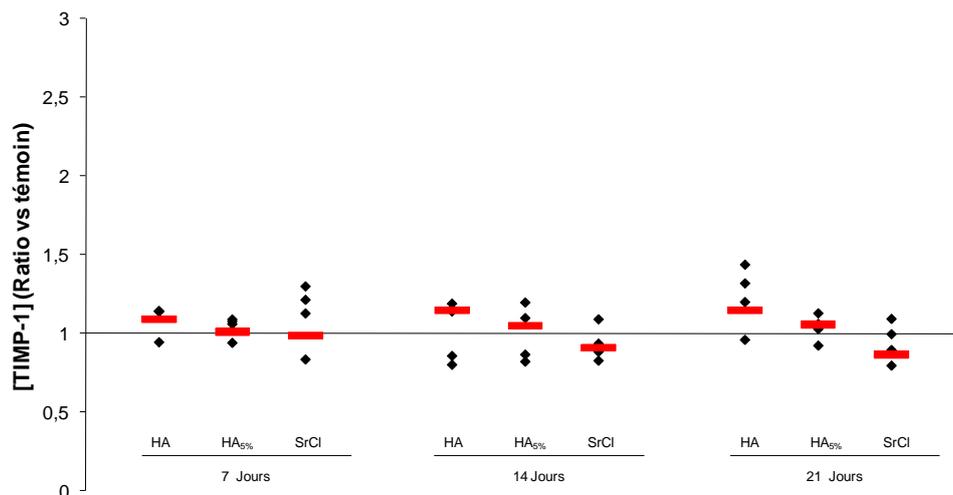


Figure 85 : Résultats de l'étude de mesure des concentrations de TIMP-1 au sein des surnageants de culture par ELISA.

### 5.5.2. Expression de TIMP-2 et dosage de la protéine codée.

Ici encore aucune modification d'expression n'a été constatée concernant l'expression de TIMP2 (figure 86) mais quelques différences ont pu être constatées dans la synthèse de la protéine. Ainsi, à 7 jours, les milieux de culture des échantillons stromtiés ont montré une augmentation de leur concentration en TIMP2. Pour autant, aucune différence statistiquement significative n'a pu être décelée entre les échantillons. A 14 jours, une augmentation globale par rapport au témoin a été observée pour les 3 traitements mais, de nouveau, aucune différence statistiquement significative n'a pu être décelée entre les échantillons. Enfin, au 21<sup>ème</sup> jour, une légère diminution de cette concentration a pu être notée pour les échantillons traités par la poudre HA5 (figure 87).

### Variations de l'expression de TIMP2

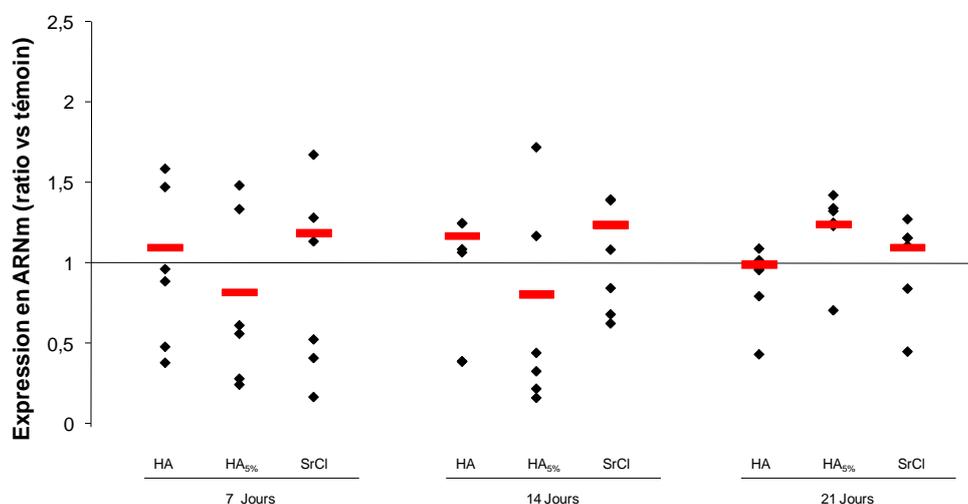
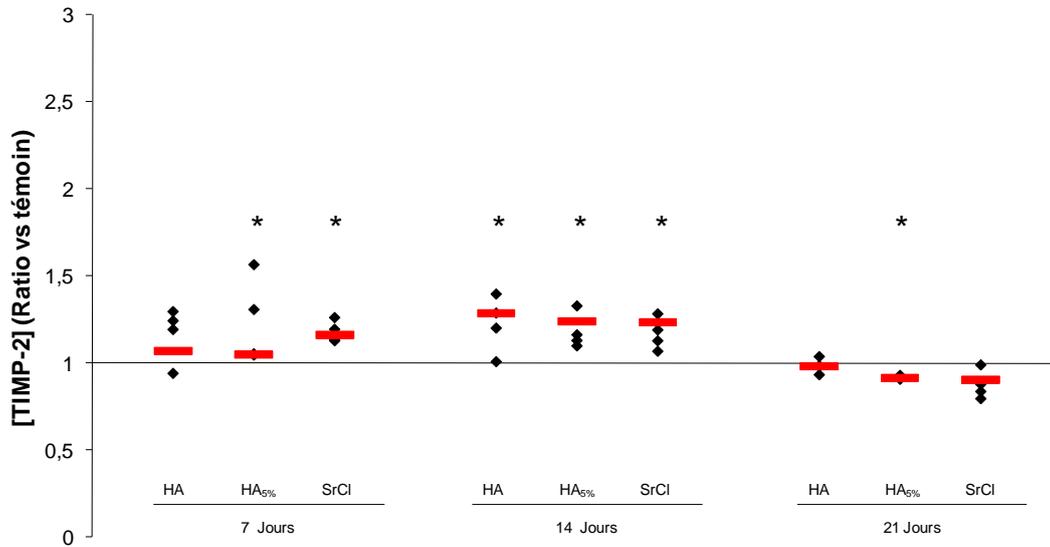


Figure 86 : Résultats de l'étude de mesure de l'expression de TIMP2 par PCR en temps réel.

## Variations de la concentration en TIMP-2



**Figure 87 : Résultats de l'étude de mesure des concentrations de TIMP1 au sein des surnageants de culture par ELISA. \* signifie statistiquement différent du témoin et # signifie une différence statistiquement significative entre échantillons.**

En conclusion, l'expression et la synthèse de ces inhibiteurs n'ont pas montré de différence significative entre les échantillons et les témoins en dehors de la concentration en TIMP2 qui varie globalement dans une voie ostéogénique. Seuls les milieux des échantillons traités par la poudre HA5 ont montré une diminution de concentration en TIMP2 au 21<sup>ème</sup> jour. La modification globale de l'équilibre de la balance osseuse constatée au cours de l'étude précédente n'est donc pas contre-balançée par une modification de la présence des TIMPs 1 et 2 au sein des milieux de culture.

Les poudres strontiées et le strontium apporté sous forme de chlorure de strontium ont donc permis d'augmenter la synthèse de collagène de type I et de sa chaperonne, de diminuer l'expression de 2 enzymes ayant la capacité de dégrader ce principal constituant de la matrice osseuse sans modifier de façon trop importante la synthèse de 2 de leurs principaux inhibiteurs. La balance osseuse apparaît donc déséquilibrer vers l'ostéof ormation.

Afin d'augmenter les preuves de ce déplacement d'équilibre de la balance osseuse, une étude a été menée sur les bases de l'immuno-ostéologie. En effet, les rapports entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire pouvant faire appel également à d'autres molécules plus axées vers le déclenchement de phénomènes inflammatoires et le chimiotactisme des cellules clastiques, nous avons focalisé notre étude sur ces phénomènes.

## 6. Ostéoimmunologie.

### 6.1. Phénotype des témoins – PCR Arrays.

Après étude de la littérature, n'ayant pas trouvé de données concernant notre modèle de culture, il nous a été impossible de déterminer le phénotype porté par les ostéoblastes humains. La première partie de notre étude a donc porté sur la description des capacités productive et réceptrice des cultures d'ostéoblastes humains primaires issus d'explants. L'étude des résultats obtenus sur les témoins utilisés pour l'étude en PCR Array nous a permis d'obtenir les résultats suivants : Les ostéoblastes humains ont la capacité d'exprimer 6 des 11 chimiokines à motif CXCL présents sur les plaques de PCR Array : une expression de CXCL1 (Gro- $\alpha$ ), CXCL 2 (Gro- $\beta$ ), CXCL 5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL12 (SDF10) et CXCL13 (BCA-1) a été montrée. Au contraire, CXCL3 (Gro- $\gamma$ ), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL (I-TAC), CXCL14 (BRAK) n'ont pas donné de résultats concluants suite à une absence ou à une trop faible expression des gènes ou à une amplification non spécifique (figure 88).

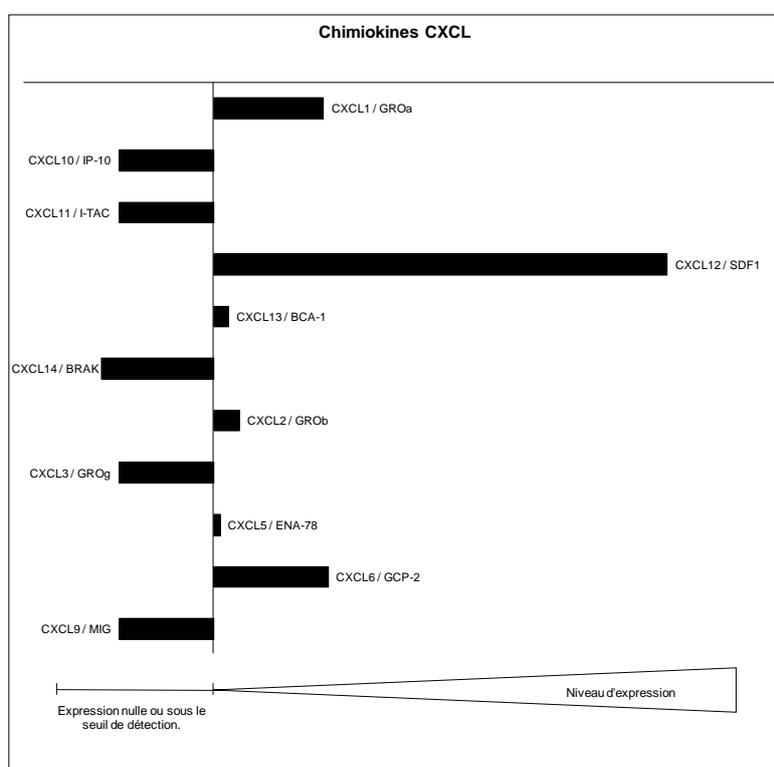
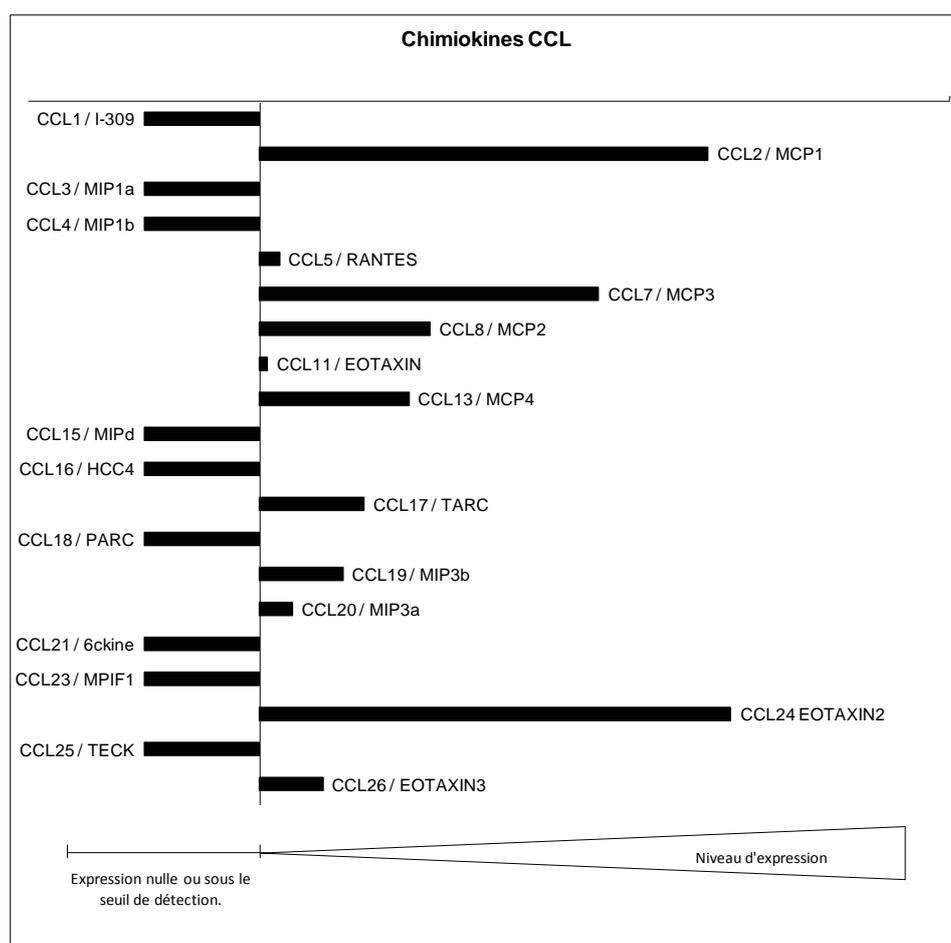


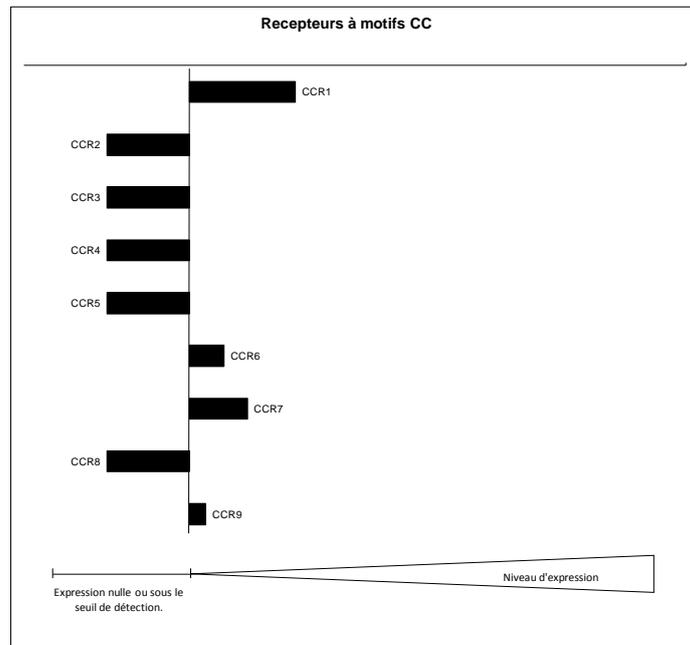
Figure 88 : Résultats de l'étude des chimiokines CXCL par PCR Array : phénotype des témoins.

Les ostéoblastes humains ont la capacité d'exprimer 11 des 20 chimiokines à motif CCL présents sur les plaques de PCR Array. CCL2 (MCP1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), CCL8 (MCP2), CCL11 (EOTAXIN), CCL13 (MCP4), CCL17 (TARC), CCL19 (MIP3 $\beta$ ), CCL20 (MIP3 $\alpha$ ), CCL24 (EOTAXIN2) et CCL26 (EOTAXIN3) ont montré une expression dans la gamme de l'étude. Au contraire, CCL1 (I-308), CCL3 (MIP1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP1 $\beta$ ), CCL15 (MIP $\delta$ ), CCL16 (HCC4), CCL18 (PARC), CCL21 (6ckine), CCL23 (MPIF1 et CCL25 (TECK) n'ont pas donné de résultats concluants suite à une absence ou à une trop faible expression des gènes ou à une amplification non spécifique (figure 89).



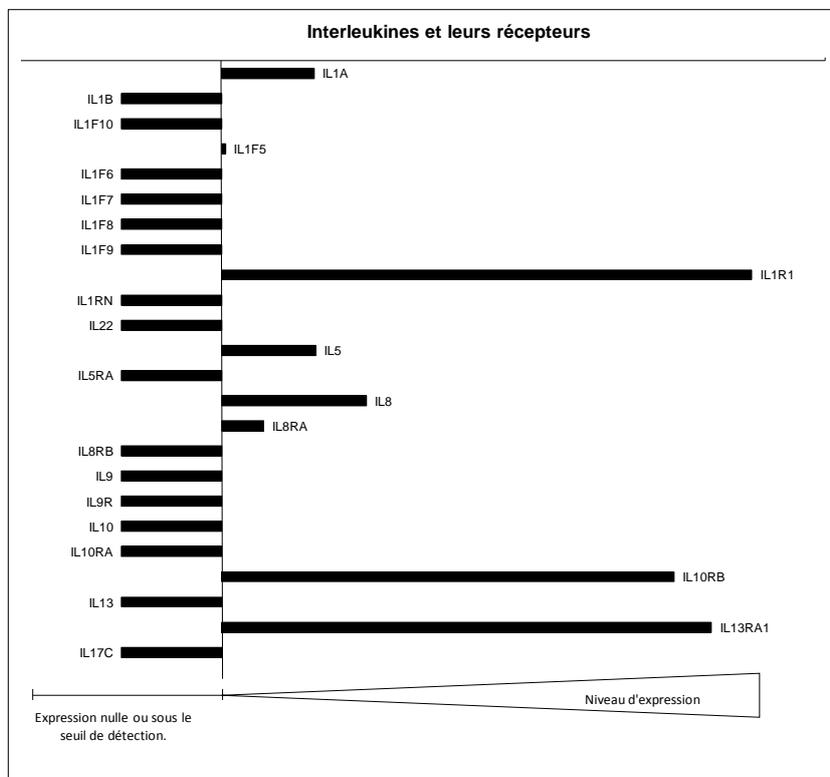
**Figure 89 : Résultats de l'étude des chimiokines CCL par PCR Array : phénotype des témoins.**

Les expressions de 4 récepteurs aux chimiokines à motif CC (CCR1, CCR6, CCR7 et CCR9) ont été retrouvées parmi les 9 récepteurs étudiés. CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 et CCR8 n'ont pas été retrouvés lors de cette étude (figure 90).



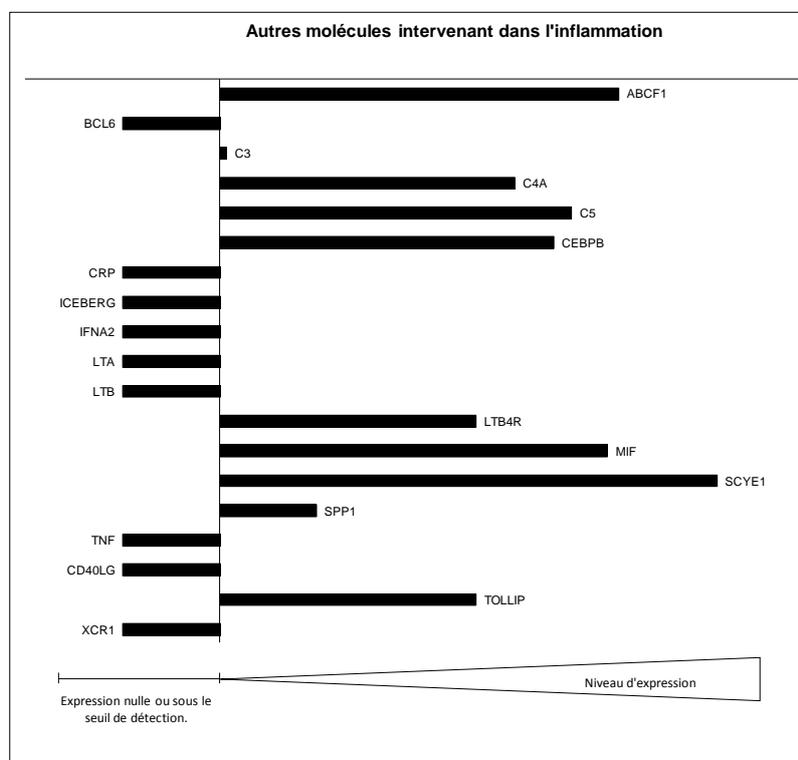
**Figure 90 : Résultats de l'étude des récepteurs aux chimiokines CCL par PCR Array.**

Parmi les 9 interleukines étudiées et leurs 9 récepteurs, respectivement 3 (IL1 $\alpha$ , IL5 et IL8) et 4 (IL1R1, IL8RA, IL10RB et IL13RA1) ont été détectés (figure 91).



**Figure 91 : Résultats de l'étude des Interleukines et de leurs récepteurs par PCR Array : phénotype des témoins.**

Parmi les 19 gènes codant des protéines intervenant dans l'inflammation étudiés, 10 (ABCF1, C3, C4, C5, CEBPB, LTB4R, MIF, SCYE1, SPP1 et TOLLIP) ont été retrouvés exprimés (figure 92).



**Figure 92 : Résultats de l'étude des Interleukines et de leurs récepteurs par PCR Array : phénotype des témoins.**

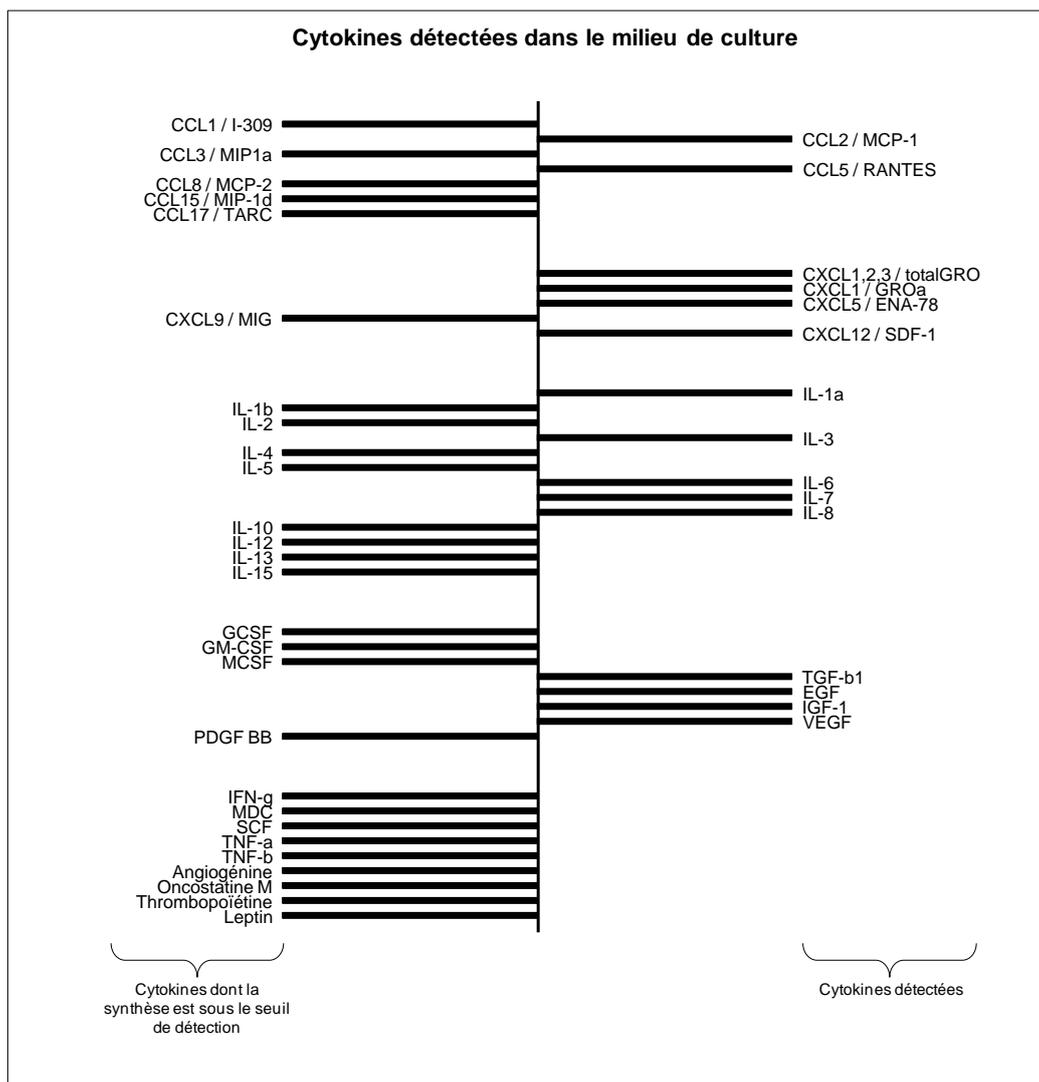
Le gène ABCF1 (ATP-binding cassette F1) a été exprimé par les ostéoblastes. Il code une protéine régulée par le TNF $\alpha$  capable de jouer un rôle dans l'augmentation de la synthèse protéique et des processus inflammatoires (Klein *et al.*, 1999). Les fractions C3, C4A et C5 du complément ont également été détectées. CEBPB est un gène codant une protéine impliquée dans la régulation des gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Cette protéine est capable de se lier à l'élément de réponse à l'IL-1 du gène de l'IL-6 et possède ainsi des capacités de régulation de la phase aiguë de l'inflammation ainsi que de l'expression des cytokines. Elle possède également une capacité à stimuler la synthèse du collagène de type I par liaison directe à son promoteur (Pereira *et al.*, 2006). Ce gène est fortement exprimé au sein de notre modèle de culture. La protéine codée par MIF (« Macrophage migration inhibitory factor ») joue un rôle dans la régulation de la fonction macrophagique de la défense de l'hôte en supprimant les effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sur les macrophages. Elle a démontré ses effets lors des phases de cicatritions endothéliales (Shimizu *et al.*, 2004). Le gène SCYE1 code la « Small inducible CYtokine E1 » qui a des fonctions d'activation des cellules des lignées endothéliales et

monocytaires. SPP1 est le gène codant la « secreted phosphoprotéin 1 » aussi connue comme l'ostéopontine et TOLLIP code la « toll interacting protein » qui est une protéine connue pour interagir avec la cascade induite par les TLRs (« Toll Like Receptors »).

*Conclusion :*

Les cellules de la lignée ostéoblastique expriment un grand nombre de gènes codant des protéines clés de l'inflammation. Par ailleurs, ces cellules expriment également des récepteurs aux chimiokines qui leur permettent également de capter et de répondre à l'état inflammatoire local présent au niveau des sites inflammatoires. Afin de tester si une synthèse protéique était possible et rechercher un effet des matériaux sur la régulation de l'inflammation locale médiée par les cellules ostéoclastiques, les surnageants de nos cultures traitées avec les différents effecteurs décrits précédemment ont été étudiés sur un système de cytokines arrays.

**6.2. Phénotype des témoins – Cytokines Arrays.**



**Figure 93 : Résultats des cytokines arrays : phénotype de notre modèle de culture.**

Les résultats obtenus par cytokines arrays confirment la grande majorité des résultats obtenus par PCR arrays. Les CCL2, CCL5, les CXCL1, CXCL5, CXCL12, les IL-1 $\alpha$ , IL-8, le TGF $\beta$ 1, l'IGF-1 et le VEGF ont bien été exprimés et synthétisés par notre modèle de culture. Au contraire, les CCL1, CCL3, CCL15, le CXCL9, les IL-1 $\beta$ , IL-10 et IL-13 n'ont été ni retrouvés exprimés, ni détectés synthétisés. Des doutes apparaissent quant à CCL8, CCL17 et à l'IL-5 retrouvés exprimés mais non détectés comme synthétisés dans cette étude. Devant ces capacités de synthèse de molécules inflammatoires, nous nous sommes attelés à l'étude de l'effet des effecteurs sur ces molécules (figure 93).

### 6.3. Effet des traitements – Cytokines Arrays

#### 6.3.1. 7 jours

Au 7<sup>ème</sup> jour, l'adjonction des poudres a induit une forte sécrétion de cytokines au sein des milieux de cultures. Les taux de MCP-1, RANTES, SDF-1, IGF-1 et de VEGF mesurés dans les milieux de culture ont été augmentés. Peu de différences ont été détectées entre les 2 biomatériaux. La poudre HA5 a permis d'obtenir une synthèse de MCP-1 moins importante, Gro- $\alpha$  a été moins synthétisé et le VEGF a été plus synthétisé. L'échantillon traité au chlorure de strontium a montré une diminution de la synthèse d'ENA-78 (figure 94).

7 Jours	HA				HA5%				SrCl2			
	médiane	Q1	Q3	p	médiane	Q1	Q3	p	médiane	Q1	Q3	p
ENA-78	96	93	100		110	100	116	#	74	54	92	X
GRO-a	151	119	189	X	89	89	93	X#	91	59	161	
GRO	98	93	103		98	95	101		95	75	111	
IL-1a	118	112	122		102	96	108		77	74	81	
IL-8	116	105	127		366	101	704		310	67	656	
MCP-1	141	127	172	X	123	110	125	X#	92	82	111	
RANTES	135	115	147	X	136	130	140	X	97	51	142	
SDF-1	128	119	137	X	130	126	137	X	92	55	131	
TGF-b1	107	98	123		105	97	112		105	87	108	
IGF-1	129	109	152	X	148	138	152	X	107	56	159	
VEGF	135	130	138	X	145	135	154	X#	108	83	134	

**Figure 94 : Effet des traitements à 7 jours.** Les encadrés en rose surlignent les résultats ayant connus une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins, les résultats encadrés en bleu sont les résultats statistiquement diminués par rapport aux témoins. X représente un résultat significativement différent du témoin et # représente un résultat significativement différent de l'échantillon HA.

#### 6.3.2. 14 jours

A 14 jours, les échantillons traités par la poudre HA ont connu une augmentation de la concentration des milieux de culture en GRO- $\alpha$ , MCP-1 et IGF-1. En revanche, les cellules

traitées par la poudre HA5 n'ont montré qu'une augmentation de la concentration de l'IGF-1. Les milieux ayant subi ce traitement ont été retrouvés statistiquement différents des milieux des échantillons traités par la poudre HA concernant leurs teneurs en GRO- $\alpha$  et MCP-1. Les échantillons traités par le chlorure de strontium ont montré une diminution significative de la présence d'ENA-78, de GRO- $\alpha$  et de VEGF dans leurs milieux (figure 95).

14 Jours	HA				HA5%				SrCl2			
	médiane	Q1	Q3	p	médiane	Q1	Q3	p	médiane	Q1	Q3	p
ENA-78	103	87	115		105	82	126		71	67	73	X
GRO- $\alpha$	125	101	141	X	115	85	143	#	95	88	97	X
GRO	90	84	113		85	84	125		88	83	102	
IL-1a	96	83	111		89	78	132		87	82	105	
IL-8	118	97	141		108	95	128		112	98	122	
MCP-1	179	126	190	X	131	62	151	#	99	95	110	
RANTES	126	116	132		123	114	138		113	99	128	
SDF-1	101	97	132		97	95	157		95	92	119	
TGF- $\beta$ 1	107	95	108		101	98	110		107	95	112	
IGF-1	130	120	139	X	123	117	127	X	115	91	143	
VEGF	101	95	109		106	97	131		96	93	98	X

**Figure 95 : Effet des traitements à 14 jours.** Les encadrés en rose surlignent les résultats ayant connu une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins, les résultats encadrés en bleu sont les résultats statistiquement diminués par rapport aux témoins. X représente un résultat significativement différent du témoin et # représente un résultat significativement différent de l'échantillon HA.

### 6.3.3. 21 jours

A 21 jours, les échantillons traités par les poudres ont révélé une diminution des concentrations en IL-1 $\alpha$ , IL-8 et en TGF $\beta$ -1. Au contraire, GRO- $\alpha$  a été augmentée uniquement dans l'échantillon traité par la poudre HA même si la concentration en GRO totale s'est vu légèrement diminuer. RANTES a été augmentés dans toutes les conditions mais cette augmentation a été plus faible avec la poudre HA5 qu'avec la poudre HA. SDF-1 s'est vu diminuée pour l'échantillon traité par la poudre HA et le VEGF a été augmenté pour les échantillons traités par la poudre HA et le chlorure de strontium.

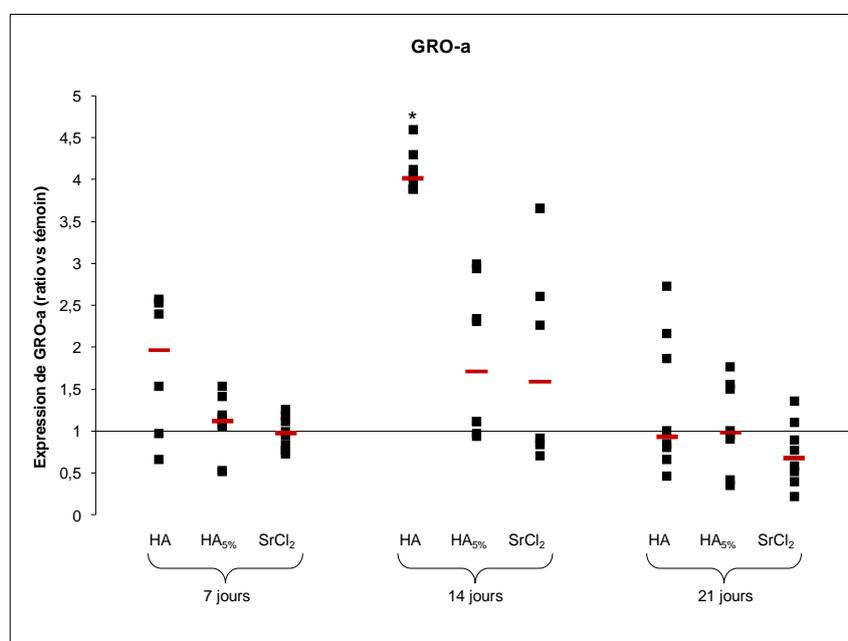
21 Jours	HA				HA5%				SrCl2			
	médiane	Q1	Q3	p/T	médiane	Q1	Q3	p	médiane	Q1	Q3	p
ENA-78	83	66	107		88	58	107		112	89	122	
GRO- $\alpha$	135	165	108	X	110	70	146		114	96	138	
GRO	94	91	96	X	89	85	110		116	102	137	
IL-1a	83	76	92	X	87	83	93	X	124	108	129	
IL-8	67	64	81	X	81	60	94	X	96	88	98	
MCP-1	100	55	130		101	61	144		100	99	113	
RANTES	140	133	143	X	118	117	120	#	166	154	167	X
SDF-1	86	77	94	X	94	72	112		124	101	136	
TGF- $\beta$ 1	90	82	93	X	86	85	94	X	113	111	118	
IGF-1	108	102	118		97	84	105		109	89	127	
VEGF	106	100	109	X	107	99	121		130	113	140	X

**Figure 96 : Effet des traitements à 21 jours.** Les encadrés en rose surlignent les résultats ayant connu une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins, les résultats encadrés en bleu sont les résultats statistiquement diminués par rapport aux témoins. X représente un résultat significativement différent du témoin et # représente un résultat significativement différent de l'échantillon HA.

Dans le but de rechercher un effet du strontium sur notre modèle, seules ont été conservées les cytokines ayant présenté une modification statistiquement significative entre les échantillons HA et HA5 dont le sens de variation était identique au sens de variation constaté entre le témoin et les échantillons traités par le chlorure de strontium. Il en résulte que seuls les GRO- $\alpha$  et MCP-1 répondent à ces critères. Ces molécules ayant un effet sur le chimiotactisme des cellules clastiques, il a donc été décidé d'approfondir ces résultats par l'utilisation de techniques plus reproductibles et plus quantitatives (PCR Arrays et ELISA).

#### 6.4. Effet des traitements sur GRO- $\alpha$ .

Cette étude a révélé une hausse des expressions de GRO- $\alpha$  à 7 et 14 jours ainsi qu'une augmentation statistiquement significative de cette expression à 14 jours (figure 97).



**Figure 97 : Résultat de RT-PCR en temps réel concernant l'expression du gène codant GRO- $\alpha$ . \* représente un résultat statistiquement différent des témoins.**

A 7 jours, les dosages par ELISA ont montré une diminution de concentration en GRO- $\alpha$  des surnageants des cultures ayant été traitées par les effecteurs strontiés. A 14 et 21 jours, les échantillons traités par la poudre HA ont montré une hausse significative de cette concentration. Les autres échantillons n'ont pas montré de différences significatives avec les témoins (figure 98).

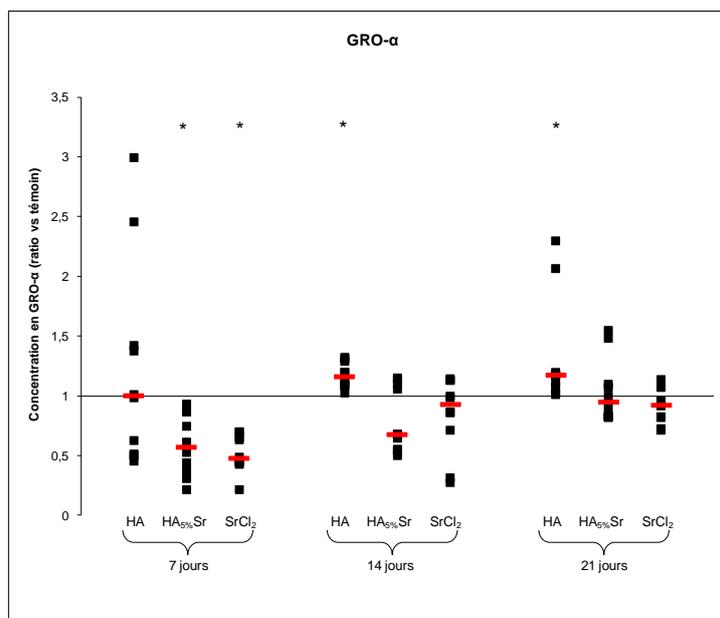


Figure 98 : Résultat des dosages ELISA de la concentration en GRO- $\alpha$  des surnageants de culture. Les \* représentent les résultats statistiquement différents des témoins.

### 6.5. Effet des traitements sur MCP-1.

Au 7<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jours, les échantillons traités par la poudre HA ont montré une hausse significative de l'expression de MCP-1 alors que les autres échantillons n'ont pas montré de différences significatives avec les témoins. Au 21<sup>ème</sup> jour, l'échantillon traité par le chlorure de strontium a montré une expression de ce gène statistiquement diminuée (figure 99).

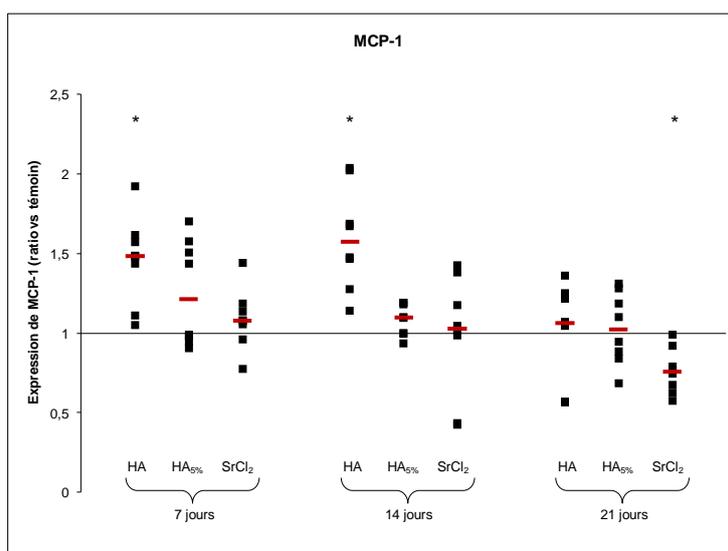
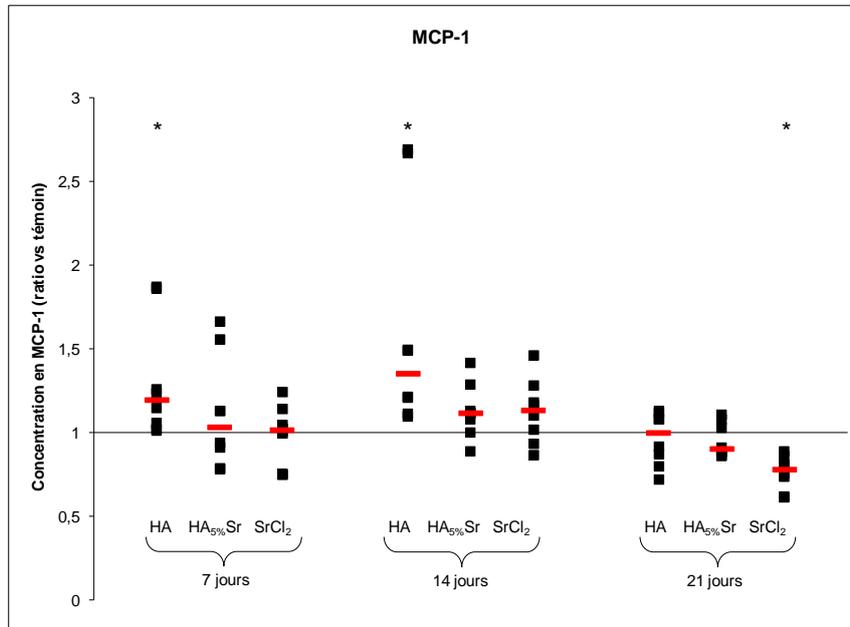


Figure 99 : Résultat de RT-PCR en temps réel concernant l'expression du gène codant le MCP-1. Les \* représentent les résultats statistiquement différents des témoins.

Au 7<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jours, les échantillons traités par la poudre HA ont montré une hausse significative de la concentration de MCP-1 dans les surnageants de culture. Les autres échantillons n'ont pas été retrouvés statistiquement différents des témoins. Au 21<sup>ème</sup> jour, l'échantillon traité par le chlorure de strontium a montré une expression de ce gène statistiquement diminuée (figure 100).



**Figure 100 : Résultat des dosages ELISA de la concentration en GRO- $\alpha$  des surnageants de culture. Les \* représentent les résultats statistiquement différents des témoins.**

En conclusion, la poudre HA a entraîné une augmentation de l'expression des gènes codant MCP-1 et GRO- $\alpha$ . La synthèse de ces protéines a évolué parallèlement. La poudre HA5 n'a pas montré un effet comparable. Les échantillons traités par le chlorure de strontium également montré des réductions de ces niveaux d'expression ou de synthèse.

## 7. Etude *in vivo*.

### 7.1. Constats généraux.

L'intégralité des souris a survécu à la chirurgie, aucun décès per ou post-opératoires n'a été à déplorer. L'intégralité des souris a repris rapidement une activité de vie normale. Aucune modification comportementale (prostration, agressivité...) ou physiologique (perte de poids, refus de l'alimentation..) n'a été constatée dans les temps post-opératoires.

### 7.2. Microtomographie X : étude descriptive.

A 7 jours, les échantillons présentent une lacune bien marquée, une légère néoformation osseuse peut être observée au niveau de la base de la lésion. Quelques débris peuvent être constatés dans la zone entourant la lésion (figure 101). A 14 jours, les échantillons présentent toujours une lacune cylindrique. Une néoformation osseuse existe à partir de la zone la plus profonde de la lésion, et, de façon plus discrète à partir des bords latéraux entourant cette dernière. Des débris peuvent encore être détectés dans l'espace synovial (figure 102). A 28 jours, les échantillons présentent une lacune ovoïde et peu profonde. La néoformation osseuse est importante et les débris peuvent encore être aperçus dans l'espace synovial (figure 103).

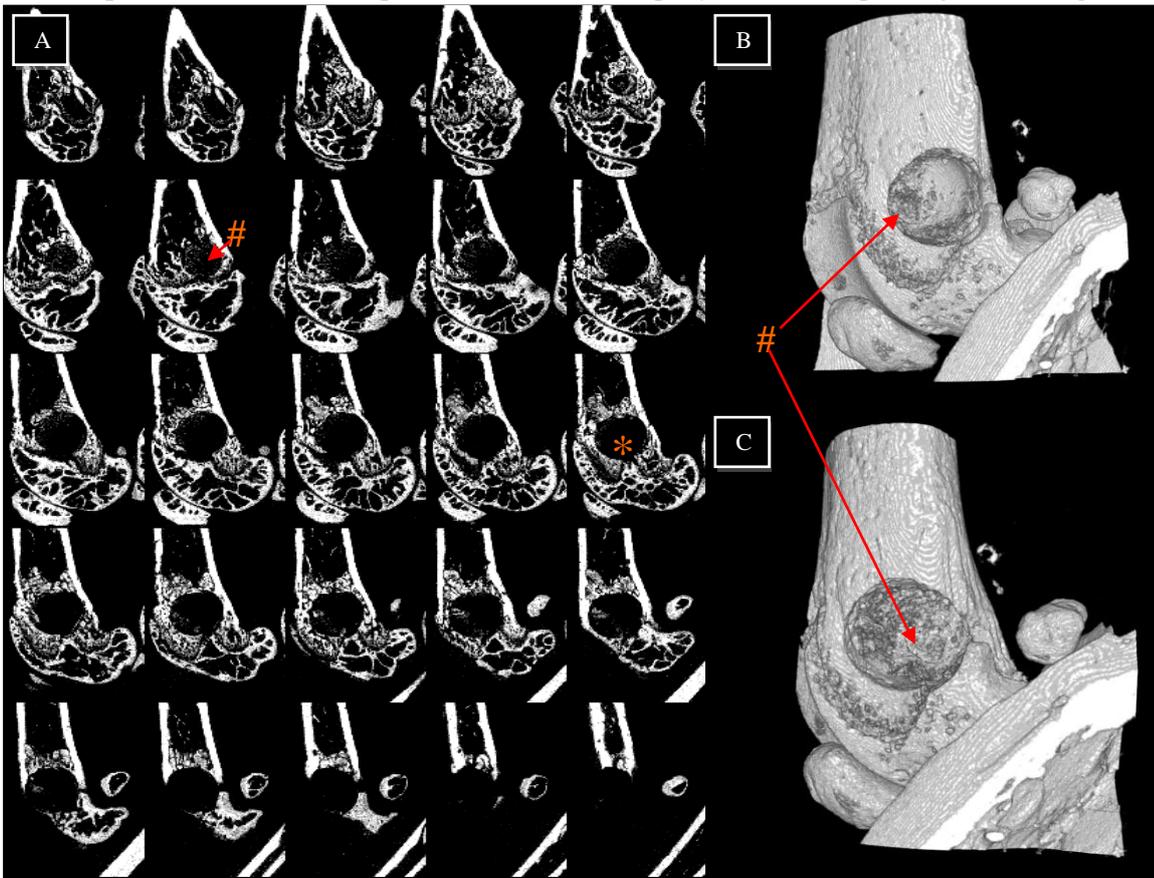


Figure 101. **A** : Galerie de microtomographies X obtenues de l'échantillon témoin au 7ème jour. \* indique la position de la lacune résiduelle et # indique la zone de reformation osseuse. **B** et **C** : reconstructions 3D de la zone lésée.

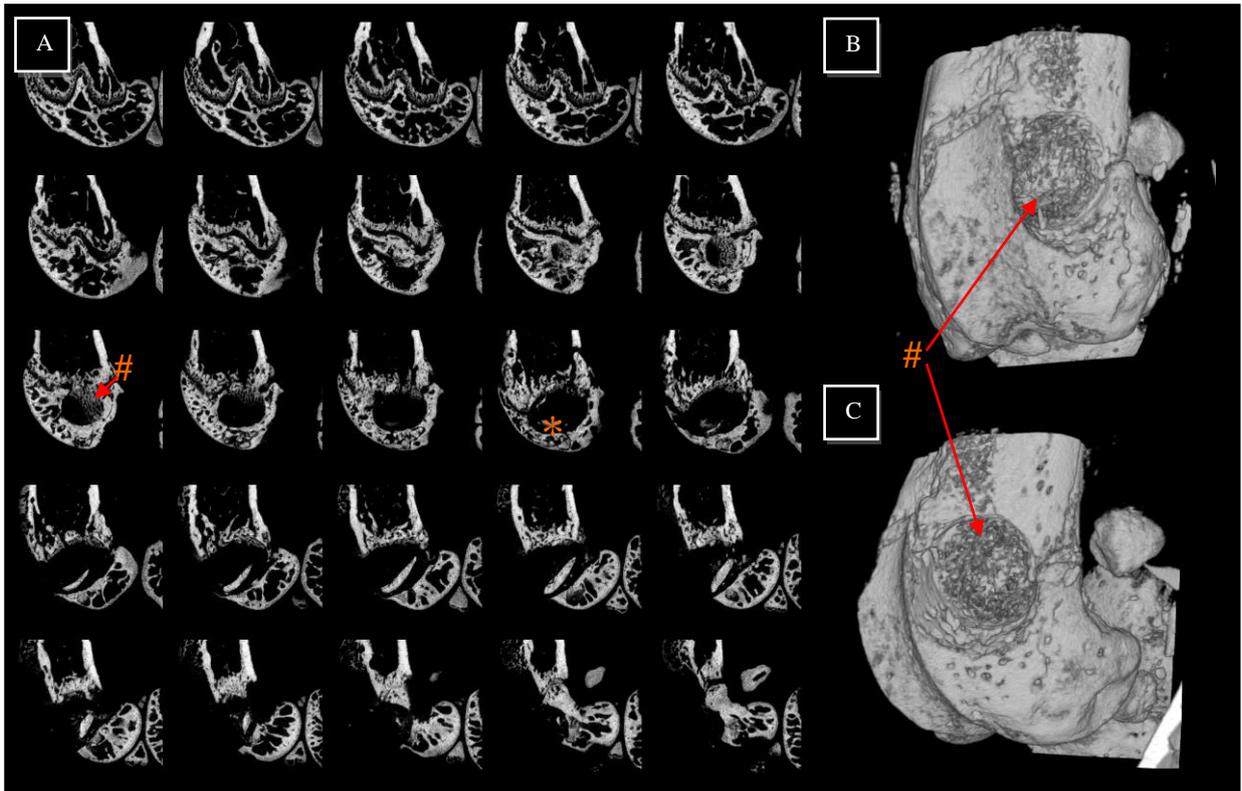


Figure 102. A : Galerie de microtomographies X obtenues de l'échantillon témoin au 14<sup>ème</sup> jour. \* indique la position de la lacune résiduelle et # indique la zone de reformation osseuse. B et C reconstructions 3D de la zone lésée.

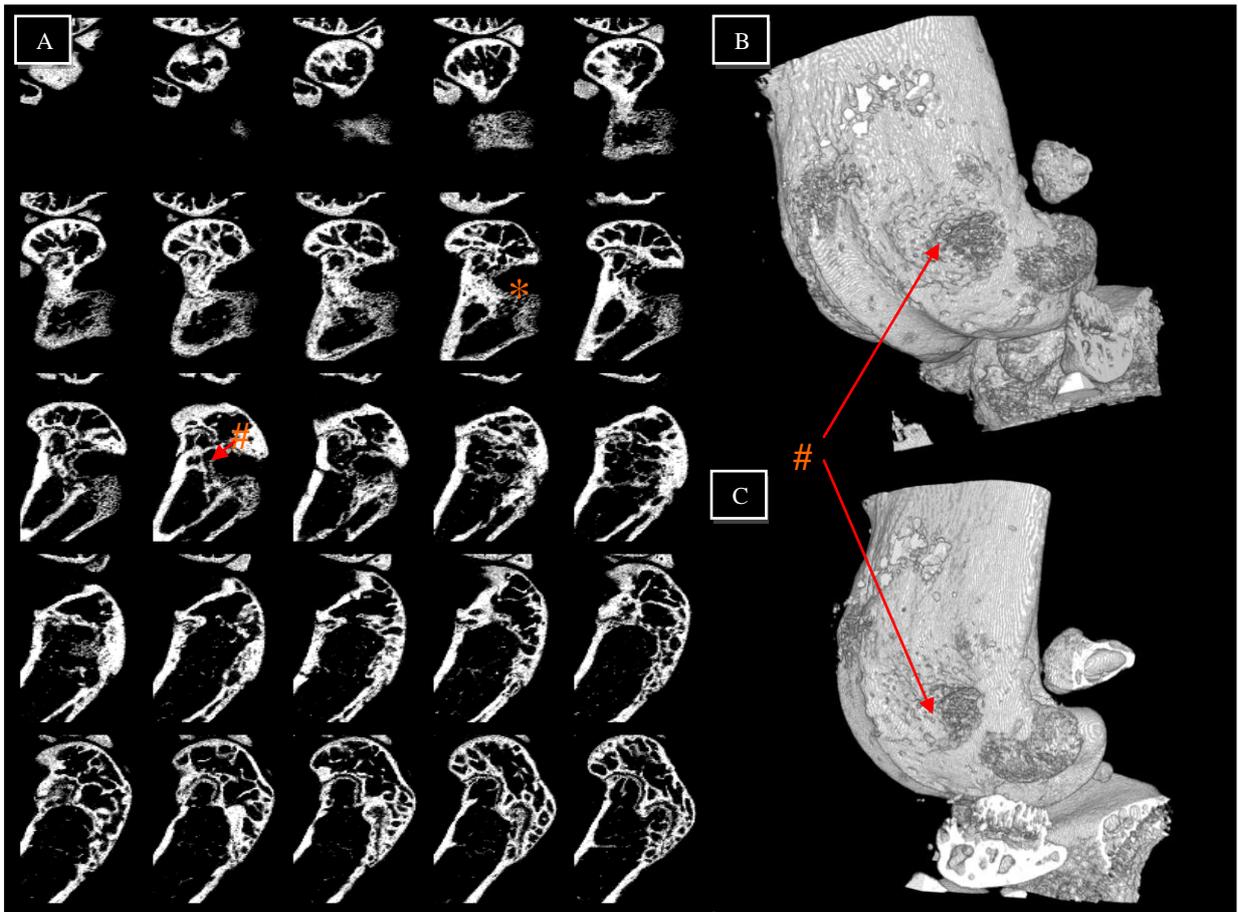


Figure 103. A : Galerie de microtomographies X obtenues de l'échantillon témoin au 28<sup>ème</sup> jour. \* indique la position de la lacune résiduelle et # indique la zone de reformation osseuse. B et C reconstructions 3D de la zone lésée.

### Poudre HA

Après hydratation, la poudre HA a montré un aspect fortement particulaire aux rayons X. Des amas mesurant une centaine de micromètres sont observables. Les lacunes également observables (figure 104 A : \*) au sein du matériau résultent très certainement d'un manque de condensation lors de la mise en place dans le tube porte échantillon.

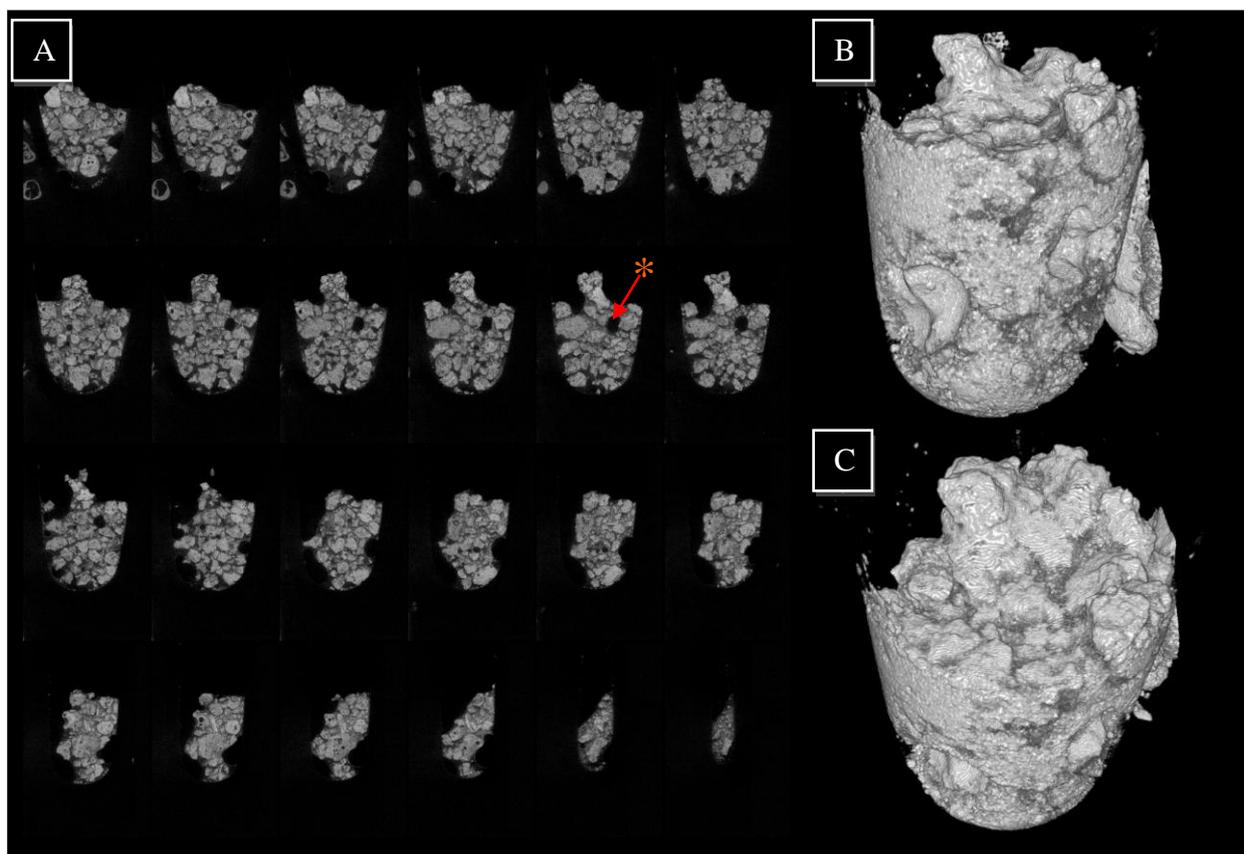


Figure 104. A : Galerie de microtomographies X de la poudre HA hydratée. B et C reconstructions 3D de la poudre.

### Poudre HA5

Une fois hydratée, la poudre HA5 a montré un aspect dense et bien différent de la poudre HA beaucoup plus particulaire aux rayons X. Des lacunes (figure 105A : \*) sont également détectées au sein du matériau.

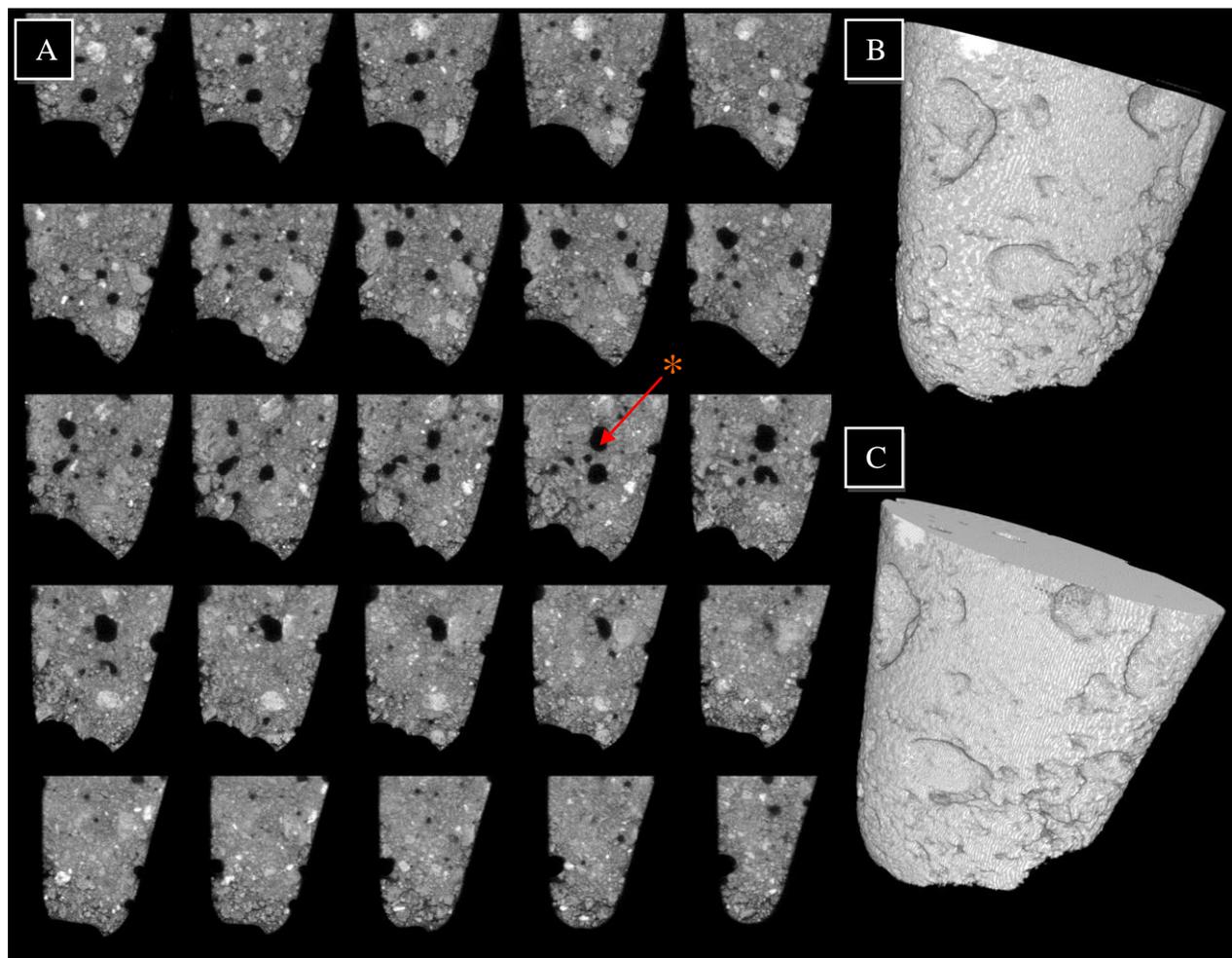


Figure 105. A : Galerie de microtomographies X de la poudre HA5 hydratée. B et C reconstructions 3D de la poudre.

### 7.2.1. Etude des échantillons traités par les poudres HA et HA5

*7 jours – poudre HA*

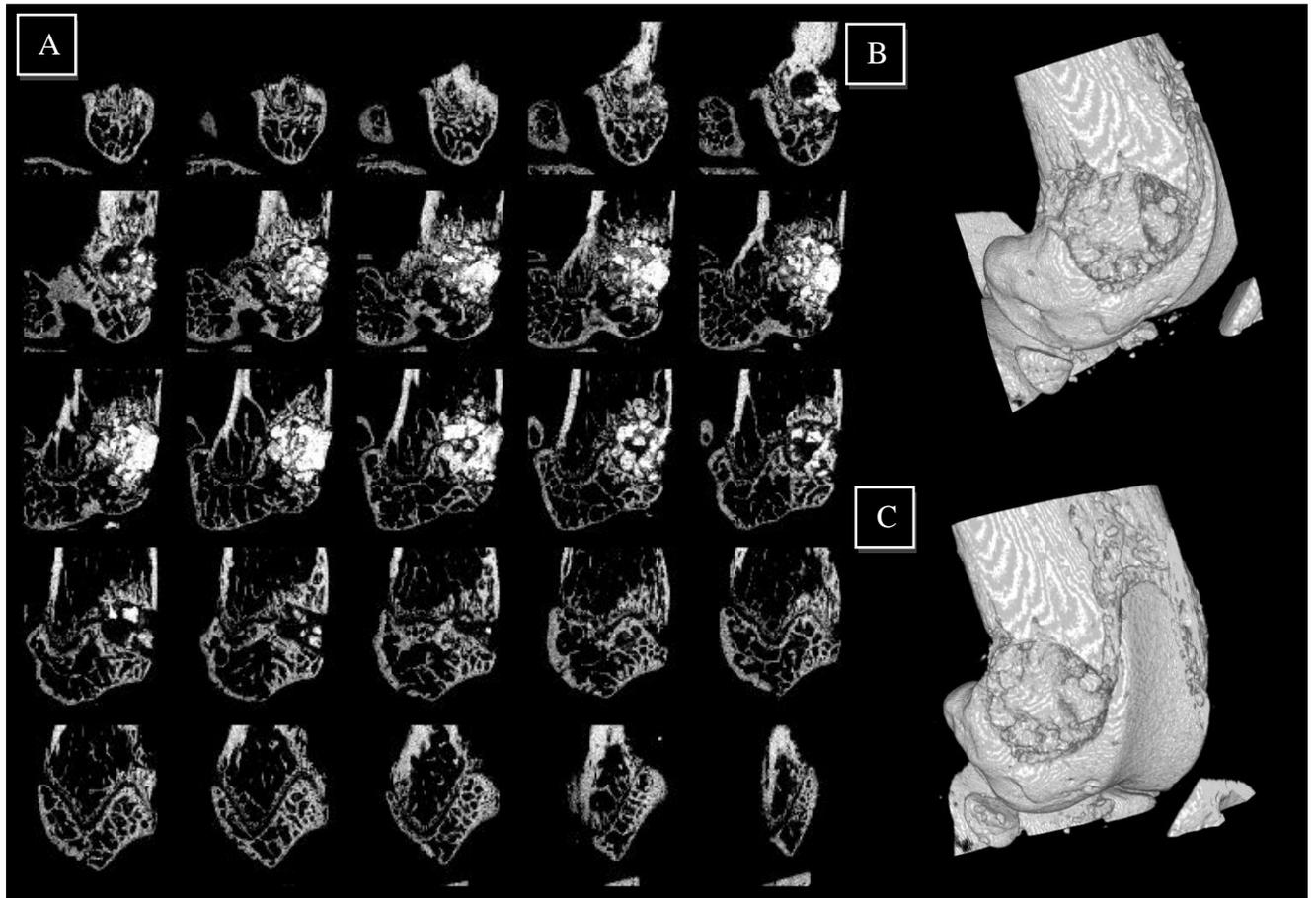
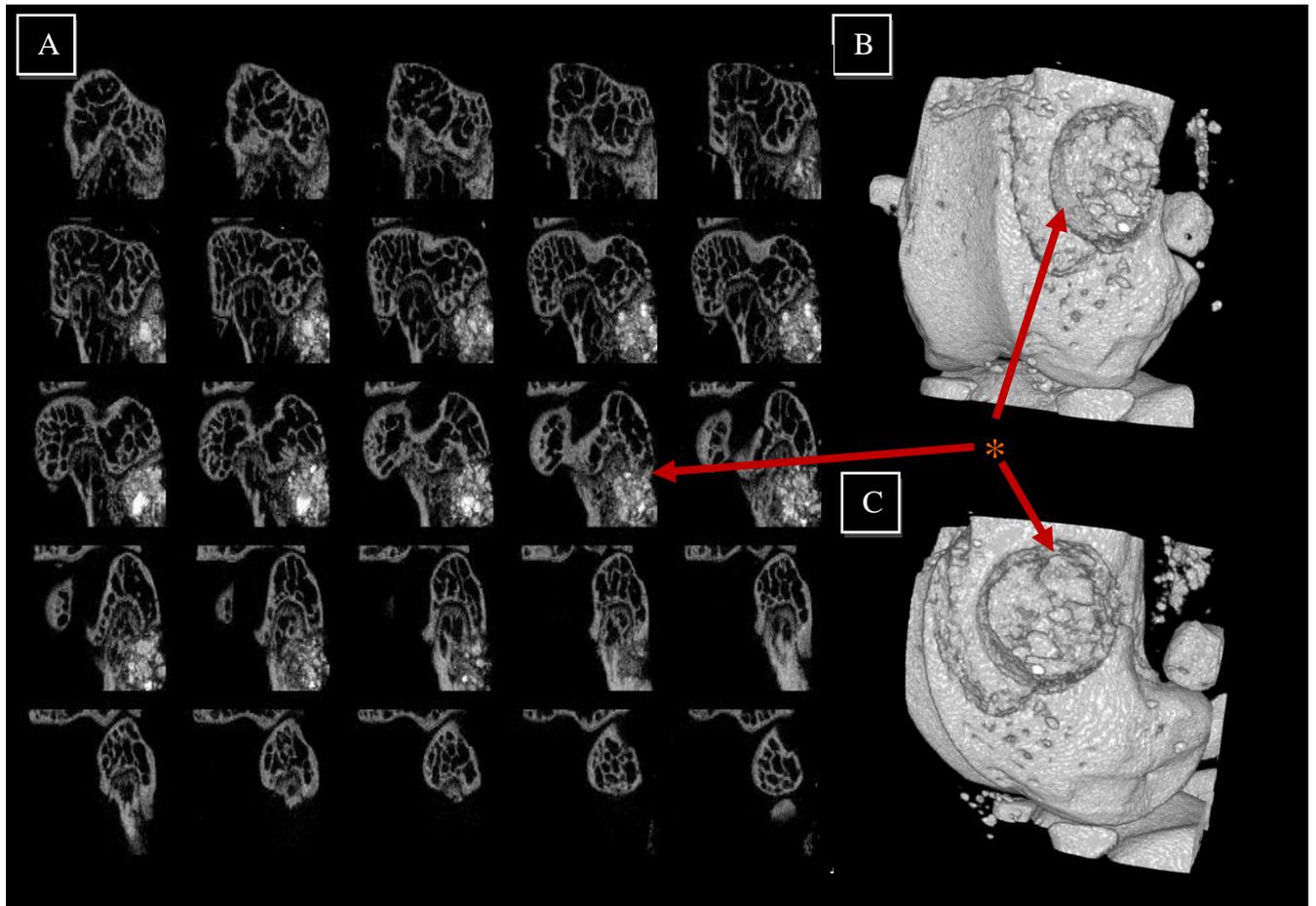


Figure 106. A : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA hydratée 7 jours après implantation. B et C reconstructions 3D.

Les échantillons présentent une lacune cylindrique comblée par la poudre HA qui révèle un aspect fortement particulaire. Il est possible de discerner la présence de débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit l'intégralité de la lacune et aucun signe de repousse osseuse n'a pu être détecté (figure 106).

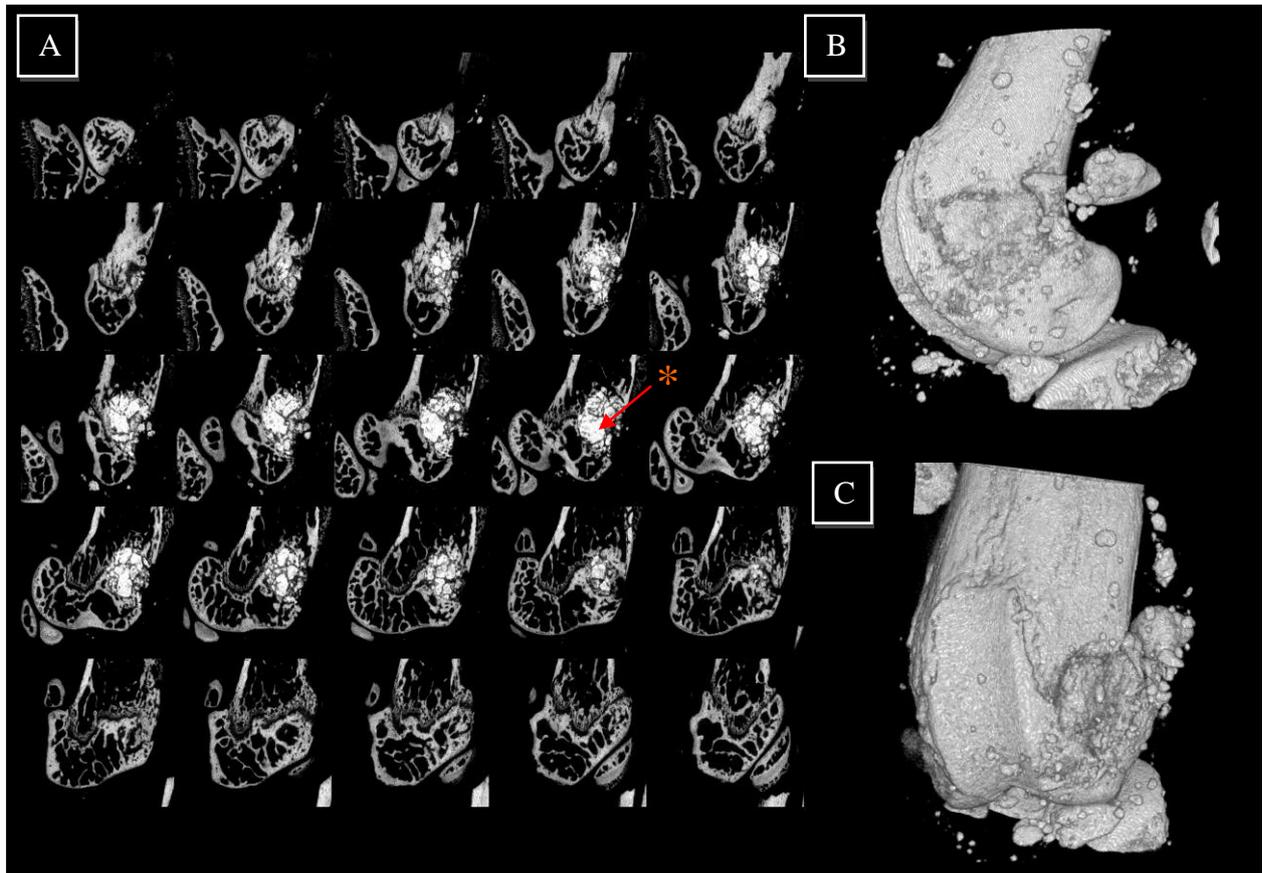
*7 jours – poudre HA5*



**Figure 107. A : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA5 hydratée 7 jours après implantation. B et C reconstructions 3D. \* représente la zone radioclaire entourant le biomatériau.**

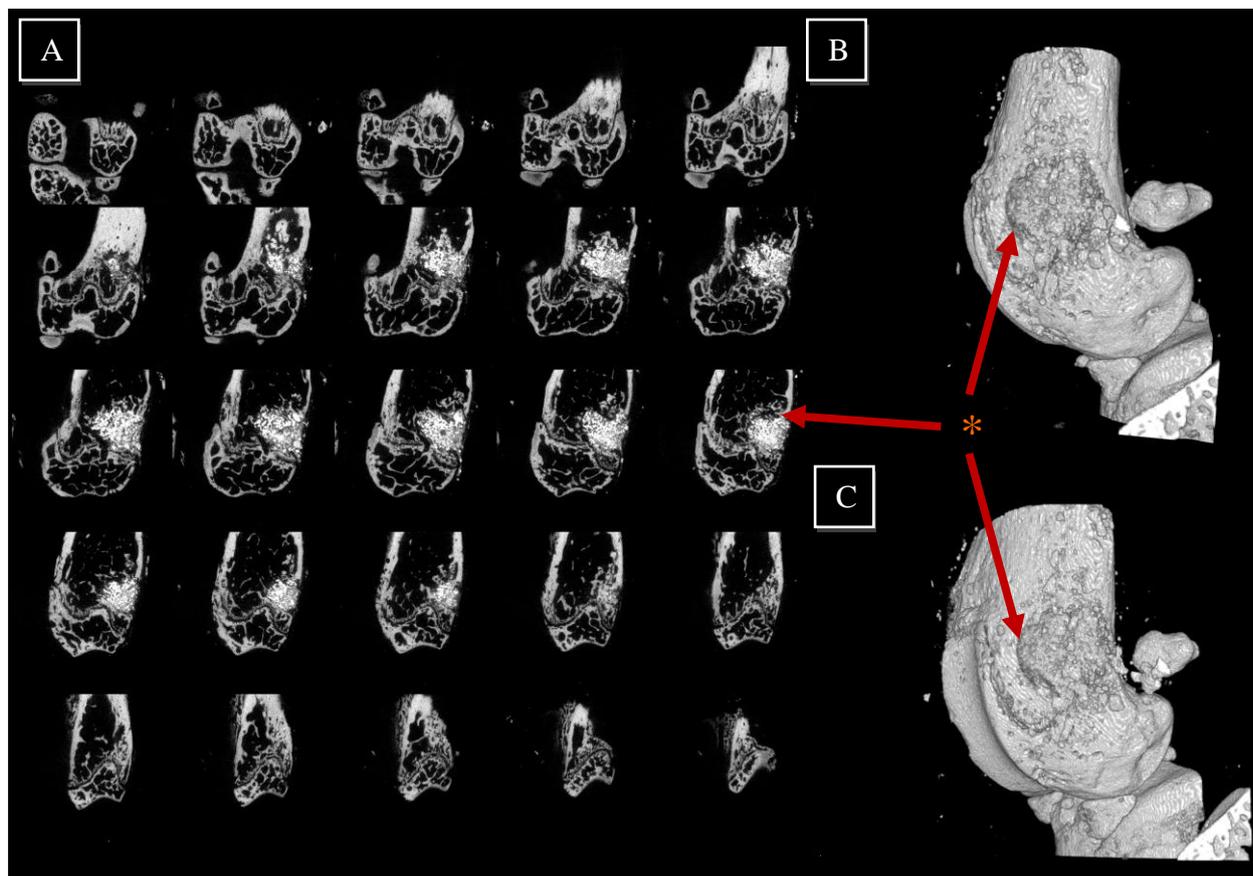
Les échantillons présentent une lacune cylindrique comblée par la poudre HA5 qui révèle un aspect faiblement particulaire. Il est possible de discerner la présence de débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit l'intégralité de la lacune même si une zone plus radioclaire (figure 102A : \*) que l'os environnant entoure le biomatériau. Cette zone a été mise en avant par le seuillage appliqué lors de la reconstruction 3D (figure 107).

*14 jours – poudre HA*



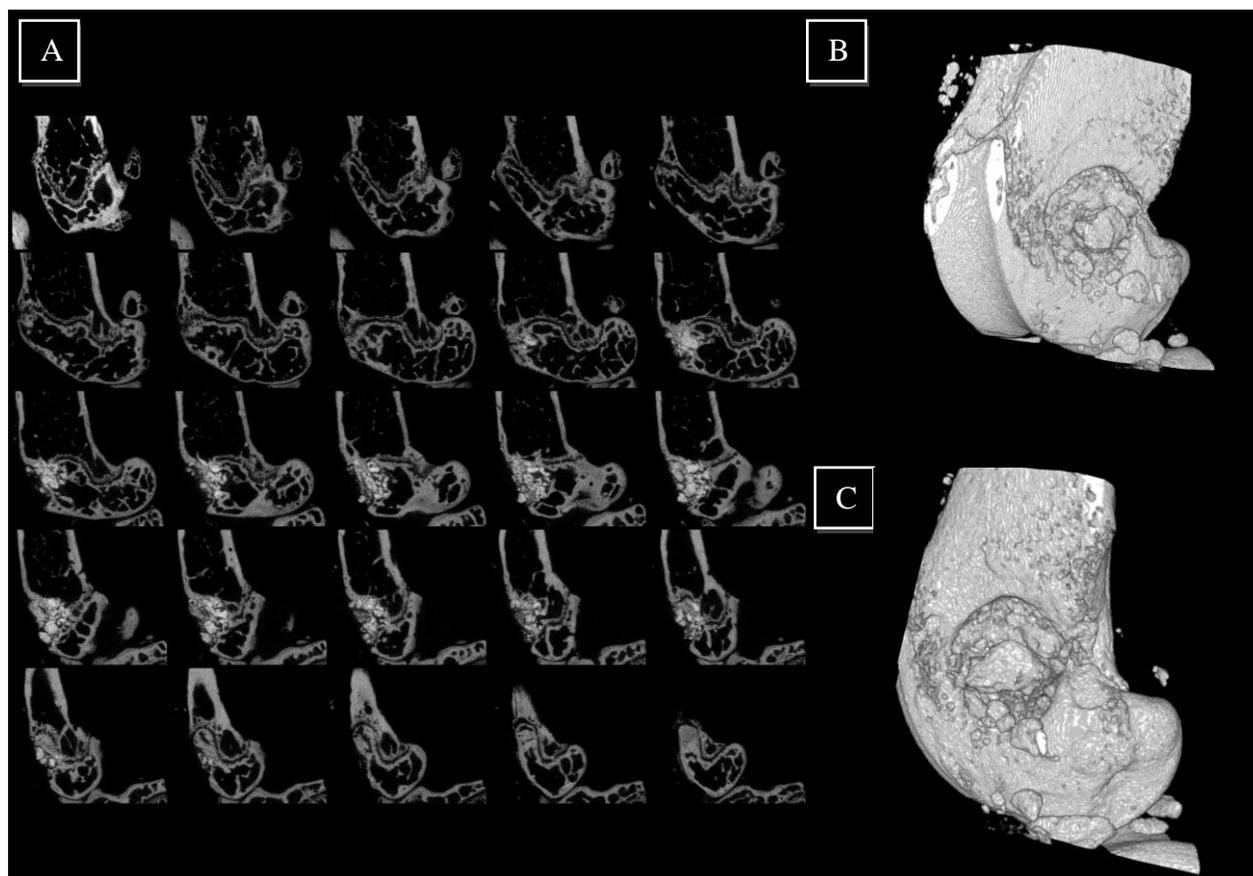
**Figure 108. A : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA hydratée 14 jours après implantation. B et C reconstructions 3D.**

Les échantillons présentent une lacune cylindrique comblée par la poudre HA qui révèle toujours un aspect fortement particulaire (figure 108A : \*) : des amas de matériaux peuvent être observés. Il est possible de discerner la présence de nombreux débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit néanmoins toujours l'intégralité de la lacune et aucune zone de repousse osseuse n'a pu être détectée (figure 108).



**Figure 109. A : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA5 hydratée 14 jours après implantation. B et C reconstructions 3D. \* représente la zone radioclaire entourant le biomatériau.**

Les échantillons présentent une lacune cylindrique comblée par la poudre HA5 qui révèle encore un aspect faiblement particulaire. Il est possible de discerner la présence de débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit l'intégralité de la lacune même si une zone radioclaire de faible épaisseur entourant le biomatériau peut être suspectée (figure 109 A, B et C : \*).



**Figure 110. A : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA hydratée 28 jours après implantation. B et C reconstructions 3D.**

Les échantillons présentent une lacune polymorphe comblée par la poudre HA qui révèle toujours un aspect fortement particulaire. Il est toujours possible de discerner la présence de débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit l'intégralité de la lacune. La profondeur résiduelle de la zone implantée est fortement diminuée par rapport aux autres temps de l'étude (figure 110).

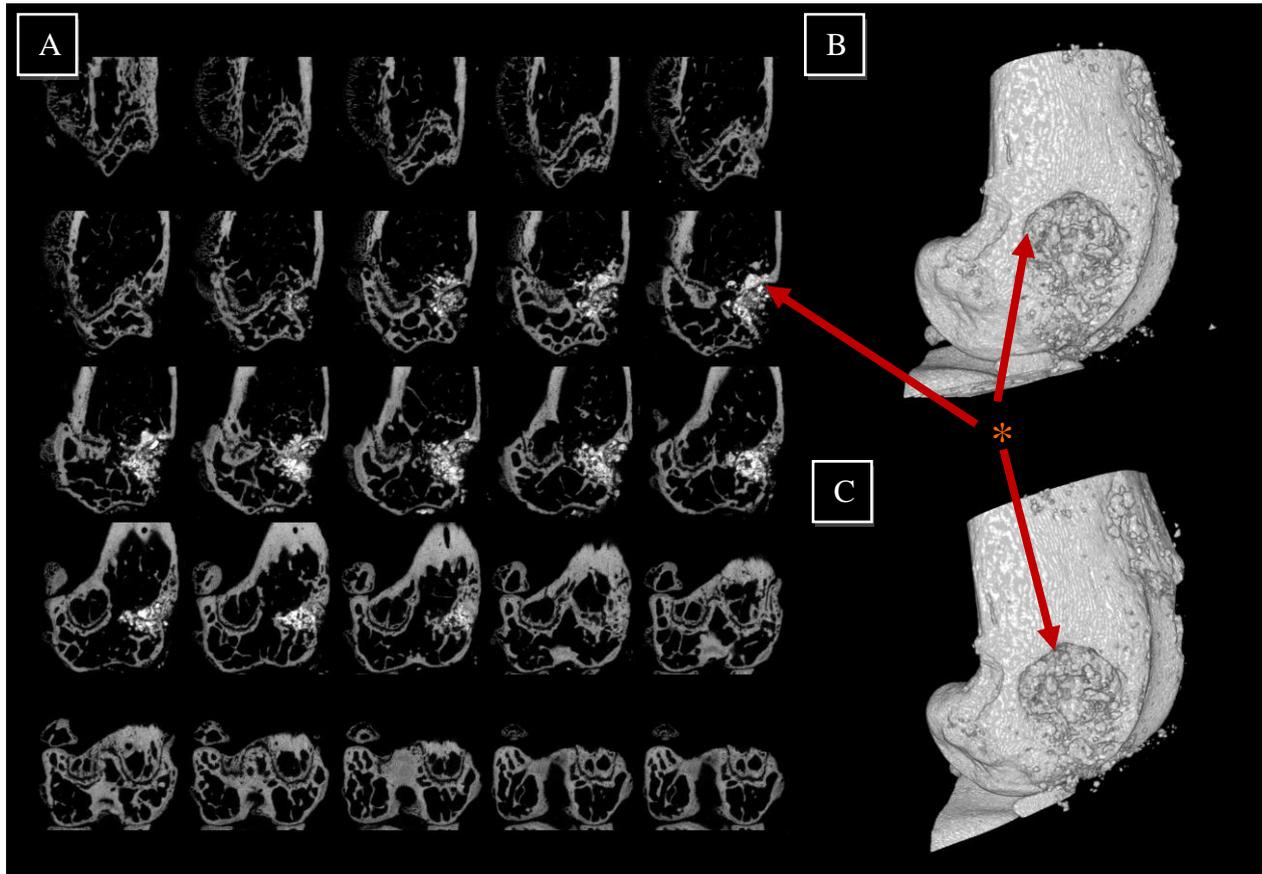


Figure 111. **A** : Galerie de microtomographies X des fémurs de souris traitées par la poudre HA5 28 jours après implantation . **B** et **C** reconstructions 3D. \* représente la zone radioclaire entourant le biomatériau.

Les échantillons présentent une lacune cylindrique comblée par la poudre HA5 qui révèle un aspect faiblement particulaire. Il est possible de discerner la présence de débris au sein de la capsule articulaire. Le matériau remplit l'intégralité de la lacune même si ici encore une zone radioclaire entourant le biomatériau peut être suspectée (figure 111 : \*). La profondeur résiduelle de la zone implantée est fortement diminuée par rapport aux autres temps de l'étude.

### 7.2.2. Conclusions

L'étude qualitative par microtomographie X des témoins a montré une importante capacité de cicatrisation des souris : ces dernières ont la capacité de réparer partiellement les lésions générées par fraisage. Les microradiographies reconstruites à partir de la matrice

tridimensionnelle montrent que cette réparation intervient du fond de la lésion vers sa périphérie. Pour autant, le défaut osseux n'apparaît toujours pas totalement comblé à 28 jours.

L'étude permet de montrer un comportement différent des matériaux vis-à-vis des rayons X aussi bien au niveau *in-vitro* qu'au niveau *in-vivo*: la poudre HA forme des amas radio-opaques mesurant environ 100 µm de diamètre alors que la poudre HA5 conserve une radio-opacité plus homogène. D'autre part, des lacunes peuvent être remarquées au sein du matériau : elles résultent très certainement d'un manque de condensation des matériaux au sein des tubes porte-échantillons ou au sein des lacunes osseuses.

*In vivo*, les deux matériaux semblent bien acceptés par les tissus osseux environnants. La poudre HA présente toujours un aspect particulière contrairement à la poudre HA5. Les deux matériaux sont bien présents au sein des lacunes osseuses et aucune destruction tissulaire à leur contact ne peut être mise en évidence. Les matériaux sont en contact étroit avec le tissu osseux environnant. Un seuillage fin a permis de mettre en évidence, pour les échantillons traités par la poudre HA5 à 7 et 14 jours, une zone de radio-opacité moins importante en périphérie du matériau.

Au 28<sup>ème</sup> jour, les microradiographies montrent une forte intégration des 2 matériaux ainsi qu'une importante reconstruction osseuse. Il semble que les lacunes résiduelles sont moins importantes au sein des échantillons traités par les poudres que pour les témoins.

Une importante dissémination des poudres au sein des espaces articulaires s'est produite: ce phénomène est lié à la technique chirurgicale employée et pourrait être limité par l'utilisation de techniques chirurgicales plus évoluées.

### 7.3. Microtomographie X : étude quantitative

#### 7.3.1. Etude des paramètres de la ROI-1

Pour mémoire, la première ROI consiste en la réalisation d'une tranche virtuelle de 400 µm d'épaisseur, perpendiculaire au grand axe fémoral, située à 2,7 mm de la partie la plus caudale du fémur (zone saine immédiatement placée sous la lésion). Cette ROI-1 a été segmentée de façon à séparer la corticale de la zone médullaire afin de pouvoir réaliser les analyses spécifiques de ces régions d'intérêt. L'objectif de cette zone d'intérêt est d'étudier les paramètres osseux d'une zone de tissu non directement impactée par la lésion mais proche de celle-ci.

#### Zones Corticales.

		Mean Thickness (mm)			Inner Perimeter (mm)			Outer Perimeter (mm)			Marrow Area (mm <sup>2</sup> )		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	Médiane	0,164	0,149	0,144	5,871	5,782	5,920	6,818	7,018	6,896	2,091	1,742	1,890
	Q1	0,151	0,146	0,137	5,241	5,524	5,685	6,292	6,775	6,737	1,744	1,691	1,734
	Q3	0,170	0,152	0,151	5,973	5,924	6,369	7,007	7,149	7,314	2,118	1,877	2,027
J14	Médiane	0,157	0,157	0,161	6,104	5,761	5,761	6,992	6,811	7,048	1,825	1,904	1,883
	Q1	0,145	0,151	0,151	5,517	5,502	5,498	6,632	6,625	6,819	1,622	1,883	1,723
	Q3	0,172	0,162	0,174	6,138	5,790	5,937	7,645	6,897	7,310	1,833	1,948	2,013
J28	Médiane	0,178	0,158	0,177	5,770	5,845	5,743	7,198	7,148	7,507	1,776	1,867	1,904
	Q1	0,175	0,157	0,166	5,529	5,622	5,653	7,071	6,802	6,865	1,771	1,742	1,649
	Q3	0,184	0,159	0,185	5,806	6,135	6,261	7,233	7,634	7,962	1,882	1,983	1,949

		Cortical Area (mm <sup>2</sup> )			Total Area (mm <sup>2</sup> )			BMD (mg/cc)			BMC (mg)		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	Médiane	0,824	0,771	0,733	2,831	2,513	2,544	955,202	1536,354	1599,813	0,007	0,012	0,013
	Q1	0,782	0,747	0,665	2,526	2,444	2,514	930,465	1105,957	1217,179	0,006	0,008	0,008
	Q3	0,877	0,785	0,780	2,953	2,657	2,612	983,182	2035,988	2101,555	0,007	0,018	0,020
J14	Médiane	0,774	0,780	0,832	2,488	2,719	2,747	1228,433	1169,272	1174,696	0,009	0,009	0,009
	Q1	0,745	0,742	0,794	2,444	2,639	2,670	1208,653	1123,545	1138,026	0,008	0,008	0,008
	Q3	0,893	0,856	0,906	2,725	2,757	2,843	1238,282	1866,607	1180,491	0,009	0,013	0,009
J28	Médiane	0,909	0,828	0,947	2,813	2,681	2,718	1061,808	1152,127	1121,712	0,011	0,009	0,010
	Q1	0,905	0,815	0,857	2,680	2,569	2,522	1034,574	1146,027	999,675	0,009	0,009	0,009
	Q3	0,984	0,850	0,976	2,857	2,805	2,859	1091,449	1176,708	1159,908	0,011	0,010	0,011

Figure 112 : Résultats des analyses quantitatives de la zone corticale de la ROI-1. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.

Peu de différences ont été retrouvées au niveau des corticales des ROI-1. Seule l'épaisseur moyenne (Mean Thickness), la densité minérale osseuse (Bone Mineral Density -BMD) et le contenu minéral osseux (Bone Mineral Content – BMC) ont été modifiés lors de l'utilisation des biomatériaux. Au 7<sup>ème</sup> jour, l'échantillon témoin montre des valeurs de BMD et BMC bien plus faibles que les valeurs constatées au sein des échantillons ayant été traités par les biomatériaux. Ces modifications sont transitoires, dès le 14<sup>ème</sup> jour, plus aucune différence statistiquement significative n'est observable. Au 28<sup>ème</sup> jour, l'épaisseur moyenne des

corticales des échantillons traités par la poudre HA a été trouvée plus faible que celle des échantillons témoins et traités par la poudre HA5. La BMD des échantillons témoins connaît une augmentation entre les 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours avant de diminuer au 28<sup>ème</sup> jour (figure 112).

### Zones médullaires

Les constats réalisés au sein de la zone corticale concernant la BMD et la BMC ont également été retrouvés au niveau des zones médullaires à 7 jours. Il a également été retrouvé des résultats proches concernant les indices TMC, TMD et BVF (figure 113).

		Volume (mm <sup>3</sup> )			Volume of Bone (mm <sup>3</sup> )			BMC (mg)			BMD (mg/cc)			TMC (mg)			TMD (mg/cc)			BVF		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	Médiane	0,722	0,628	0,710	0,040	0,058	0,056	0,092	0,136	0,208	126,980	187,540	323,164	0,024	0,044	0,061	601,372	685,369	1265,888	0,056	0,091	0,075
	Q1	0,662	0,620	0,630	0,034	0,050	0,039	0,084	0,131	0,138	126,609	186,503	198,640	0,020	0,043	0,032	598,325	678,005	741,969	0,049	0,080	0,063
	Q3	0,724	0,655	0,727	0,042	0,060	0,077	0,094	0,209	0,328	128,876	320,648	465,255	0,025	0,058	0,133	602,212	1353,207	1773,793	0,058	0,091	0,105
J14	Médiane	0,636	0,681	0,653	0,057	0,069	0,036	0,156	0,140	0,107	241,458	204,465	168,694	0,042	0,048	0,026	677,644	691,892	694,531	0,088	0,095	0,056
	Q1	0,606	0,660	0,634	0,034	0,050	0,033	0,133	0,130	0,101	191,452	189,567	160,144	0,020	0,048	0,023	610,841	680,204	679,084	0,061	0,073	0,053
	Q3	0,680	0,684	0,721	0,080	0,070	0,039	0,172	0,173	0,186	282,547	253,315	257,491	0,066	0,051	0,045	789,807	713,593	698,569	0,113	0,109	0,060
J28	Médiane	0,576	0,589	0,642	0,021	0,035	0,022	0,082	0,089	0,094	148,133	153,098	139,026	0,014	0,017	0,015	615,513	669,422	662,261	0,036	0,071	0,034
	Q1	0,502	0,492	0,588	0,019	0,025	0,016	0,078	0,075	0,078	140,905	134,046	124,573	0,013	0,016	0,011	586,141	640,717	572,048	0,032	0,038	0,028
	Q3	0,653	0,625	0,747	0,026	0,062	0,042	0,089	0,094	0,100	156,631	190,507	148,719	0,015	0,051	0,022	648,950	824,699	698,677	0,047	0,116	0,054

**Figure 113 : Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-1 : paramètres de densitométrie osseuse. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.**

### SMI :

Aucune modification des paramètres composant le SMI n'a été remarquée lors de notre étude (figure 114).

		SMI											
		SMI			Volume (mm <sup>3</sup> )			SA (mm <sup>2</sup> )			SAPrime		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	médiane	2,496	2,778	2,442	0,034	0,053	0,052	3,339	3,742	4,823	140,856	139,883	134,967
	Q1	2,466	2,580	2,181	0,023	0,040	0,035	2,447	3,416	3,623	110,264	133,151	116,743
	Q3	2,530	2,813	2,813	0,036	0,057	0,073	3,490	4,515	5,005	142,888	176,232	185,605
J14	médiane	2,797	3,106	3,755	0,050	0,060	0,031	4,464	4,971	3,002	184,605	235,517	166,199
	Q1	2,601	2,980	3,006	0,025	0,043	0,029	3,541	4,144	2,914	163,407	182,751	159,228
	Q3	2,883	3,509	3,884	0,076	0,062	0,034	5,280	5,316	3,112	209,178	240,506	169,096
J28	Médiane	2,897	3,428	3,068	0,019	0,029	0,020	1,925	2,925	2,179	100,085	158,981	139,932
	Q1	2,802	3,328	2,609	0,018	0,024	0,018	1,803	2,434	1,774	93,563	130,032	108,467
	Q3	2,992	3,754	3,466	0,020	0,049	0,033	2,046	3,161	3,959	106,608	159,750	148,804

**Figure 114 : Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-1 : paramètres composant le « Structure Model Index » (SMI). Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.**

## Anisotropie

L'étude de l'anisotropie révèle que le paramètre a1/a2 a été modifié lors de l'utilisation des biomatériaux à 7 jours (figure 115).

		ANISOTROPIE								
		a1/a3			a1/a2			a2/a3		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	Médiane	1,449	1,481	1,381	1,283	1,124	1,151	1,143	1,332	1,165
	Q1	1,399	1,416	1,277	1,220	1,118	1,140	1,097	1,252	1,110
	Q3	1,507	1,526	1,450	1,326	1,138	1,175	1,197	1,365	1,241
J14	Médiane	1,391	1,226	1,271	1,175	1,095	1,116	1,145	1,162	1,158
	Q1	1,297	1,187	1,237	1,127	1,055	1,073	1,096	1,084	1,131
	Q3	1,516	1,226	1,327	1,260	1,120	1,141	1,226	1,179	1,183
J28	Médiane	1,332	1,498	1,277	1,120	1,119	1,073	1,121	1,172	1,165
	Q1	1,294	1,246	1,184	1,082	1,096	1,059	1,101	1,156	1,108
	Q3	1,457	1,533	1,368	1,292	1,199	1,129	1,199	1,249	1,224

Figure 115 : Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-1 : paramètres d'anisotropie. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.

## Stéréologie

Les valeurs BS/BV (Bone surface/Bone volume) représentant la complexité de la structure et Tb.Th (trabecular thickness) représentant l'épaisseur moyenne des trabécules osseux ont été respectivement légèrement augmentée et diminuée au sein des échantillons comblés avec la poudre HA entre les 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jours. Par ailleurs, à 7 jours, la valeur Tb.N (Trabecular Number) représentant le nombre de trabéculations a été augmentée lors de l'emploi des biomatériaux et a augmenté entre les 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours au sein des échantillons témoins. Enfin, le Tb.Sp (Trabecular separation) représentant la distance de séparation entre les trabécules a été retrouvé diminué au sein des souris témoins au 14<sup>ème</sup> jour (figure 116).

		STEREOLOGIE														
		BV/TV			BS/BV			Tb.Th.			Tb.N.			Tb.Sp.		
		T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5	T	H	H5
J7	Médiane	0,056	0,089	0,075	106,110	116,137	106,666	0,019	0,017	0,019	2,964	4,539	4,179	0,319	0,201	0,224
	Q1	0,043	0,069	0,063	102,132	108,749	85,846	0,017	0,017	0,015	2,462	3,820	3,780	0,310	0,187	0,194
	Q3	0,060	0,090	0,104	119,271	116,797	133,571	0,020	0,018	0,023	3,035	4,670	4,637	0,407	0,268	0,245
J14	Médiane	0,088	0,095	0,055	130,779	127,595	129,651	0,016	0,016	0,015	5,132	5,750	3,680	0,172	0,157	0,256
	Q1	0,061	0,073	0,053	92,829	121,127	128,957	0,011	0,015	0,015	4,646	5,006	3,445	0,158	0,129	0,221
	Q3	0,113	0,108	0,059	179,725	137,430	134,075	0,022	0,017	0,016	5,817	6,914	4,293	0,198	0,185	0,275
J28	Médiane	0,035	0,071	0,034	159,254	136,428	159,730	0,013	0,015	0,013	2,283	4,804	2,324	0,425	0,184	0,318
	Q1	0,031	0,038	0,028	135,435	97,289	130,157	0,011	0,013	0,010	2,238	2,573	2,244	0,348	0,171	0,225
	Q3	0,047	0,116	0,054	179,399	153,712	192,010	0,015	0,021	0,015	3,513	5,421	4,647	0,434	0,374	0,432

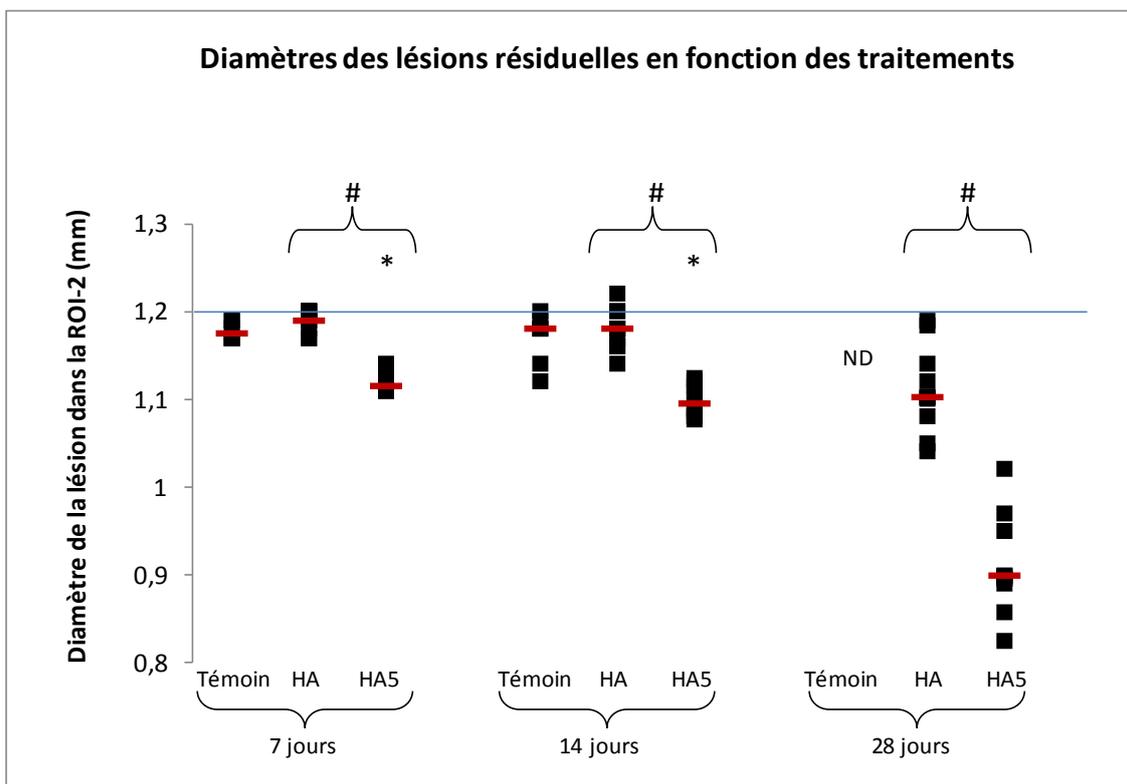
Figure 116: Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-1 : paramètres de stéréologie. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.

### **Conclusions :**

A 7 jours, une différence des paramètres BMD et BMC au niveau des zones corticales et médullaires des échantillons témoins par rapport aux échantillons traités par les matériaux a pu être constatée. Par ailleurs, au niveau médullaire, les paramètres TMC, TMD et BVF sont également inférieurs à ceux retrouvés au sein des échantillons traités. Ce phénomène est transitoire et n'apparaît plus à 14 ou 28 jours. Toujours au 7<sup>ème</sup> jour, les paramètres a1/a2 et TB/N ont été modifiés.

### **7.3.2. Etude des paramètres de la ROI-2**

Pour mémoire, la seconde étude quantitative a consisté en la mesure du diamètre d'un disque épousant la zone visible de la lésion ou du biomatériau, dont le centre de gravité est centré sur l'axe de la lésion et est situé à 400 µm sur cet axe dans un plan parallèle au plan constitué par la jonction des points d'inflexion de l'orifice de la lésion. L'intérêt de cette mesure permet de quantifier une éventuelle néoformation osseuse latérale aboutissant au comblement de la lésion et/ou à la résorption des matériaux.



**Figure 117 : Graphique représentant les diamètres de lésions mesurés au niveau de la ROI-2 en fonction des temps post-opératoires et des traitements. \* signifie une différence statistiquement significative de l'échantillon par rapport au témoin et # représente une différence statistiquement significative des biomatériaux entre eux. La ligne bleue représente le diamètre théorique de la lésion initiale. ND signifie Non déterminé.**

Les résultats révèlent aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours un comportement différent des échantillons traités par la poudre HA5. En effet, alors que les échantillons traités par la poudre HA se

révèlent proches des échantillons témoins, les échantillons HA5 montrent un diamètre de lésion résiduel statistiquement plus faible. Par ailleurs, à 28 jours, cette différence est retrouvée et semble amplifiée entre les échantillons HA et HA5. A noter, l'importance de la reconstruction osseuse autogène au sein des échantillons témoins n'a pas permis une segmentation fiable et circulaire de la lésion résiduelle. La détermination de mesures fiables du diamètre de la lésion résiduelle n'a pas pu être réalisée (absence de bords nets de lésions ou anatomies des lésions non circulaires avec présence de zones faiblement radio-opaques...).

### 7.3.3. Etude des paramètres de la ROI-3.

La dernière zone d'intérêt a consisté en la réalisation de cylindres de 1mm de diamètre pour les échantillons obtenus à 7 et 14 jours et de 0,7mm de diamètre pour les échantillons obtenus à 21 jours, d'épaisseurs de 160 µm, dont les centres de gravité ont été placés sur l'axe de la lésion à 400 µm de l'orifice de cette lésion et dont les faces latérales sont parallèles au plan d'orifice décrit ci-dessus. L'objectif de ces zones d'intérêt ROI-3 est de réaliser une étude des matériaux afin de voir si des modifications interviennent avec le temps d'implantation ou s'il existe des différences entre eux. A noter, la dénomination anglaise des paramètres a été conservée afin de conserver une terminologie connue de tous mais il faut garder à l'esprit que la segmentation a eu lieu sur les biomatériaux et non sur l'os en prenant comme référence une valeur de segmentation moyenne basée sur la radio-opacité moyenne des poudres. Par ailleurs, l'importance de la néoformation osseuse existant au sein des échantillons HA5 nous a contraint d'utiliser une zone d'intérêt de diamètre inférieur pour les échantillons du 28<sup>ème</sup> jour. Il en résulte une impossibilité de comparer les échantillons des 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours avec ceux du 28<sup>ème</sup> jour.

#### BMD

		BMD											
		Volume of Bone (mm <sup>3</sup> )		BMC (mg)		BMD (mg/cc)		TMC (mg)		TMD (mg/cc)		BVF	
		HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5
J7	médiane	0,0625	0,0696	0,2769	0,1768	2258,6352	1374,4321	0,1903	0,117	2878,4746	1539,8208	0,4918	0,5412
	Q1	0,059	0,0599	0,132	0,1748	1025,7436	1358,2361	0,0834	0,1072	1344,5428	1539,4179	0,4585	0,4654
	Q3	0,0677	0,0751	0,3217	0,3539	2500,7751	2750,397	0,1977	0,1918	3045,1718	3203,1774	0,5265	0,5836
J14	médiane	0,067	0,0673	0,1462	0,1766	1136,1595	1372,1777	0,0983	0,106	1428,6806	1561,6505	0,5204	0,5234
	Q1	0,064	0,0639	0,131	0,1599	1018,1626	1242,5247	0,0954	0,1017	1294,978	1548,6372	0,4975	0,4964
	Q3	0,0737	0,0738	0,1547	0,1789	1202,6305	1390,3844	0,1031	0,1143	1474,678	1591,0787	0,5728	0,5739
J28	Médiane	0,0716	0,03255	0,1643	0,08475	1276,5313	1344,73915	0,1045	0,0532	1499,4311	1635,47915	0,5706	0,5259
	Q1	0,0689	0,031925	0,1532	0,0792	1250,2098	1255,96008	0,0955	0,04555	1469,0451	1547,16598	0,5455	0,507875
	Q3	0,0738	0,0343	0,1731	0,087525	1345,6786	1388,18203	0,1206	0,055925	1581,5014	1694,86485	0,5734	0,5433

**Figure 118 : Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-3 : paramètres de densitométrie osseuse. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.**

Les paramètres volume of bone et BMC ont connu des diminutions significatives pour les souris traitées par la poudre HA5 au 28<sup>ème</sup> jour. Cette diminution de la minéralisation globale du biomatériau pourrait être liée à une plus grande solubilité de la poudre HA5.

### Anisotropie

Aucune différence n'a été retrouvée concernant les paramètres d'anisotropie.

		ANISOTROPIE					
		a1/a3		a1/a2		a2/a3	
		HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5
J7	médiane	1,2468	1,2243	1,1051	1,0809	1,1144	1,0969
	Q1	1,1168	1,1435	1,0929	1,0424	1,0828	1,0885
	Q3	1,3279	1,3047	1,1298	1,1673	1,1282	1,1288
J14	médiane	1,27965	1,228	1,1097	1,0844	1,1327	1,1189
	Q1	1,20185	1,2076	1,03935	1,0709	1,093825	1,0841
	Q3	1,3992	1,2705	1,151725	1,1182	1,212375	1,1566
J28	Médiane	1,1714	1,24085	1,0681	1,0852	1,0933	1,0875
	Q1	1,1338	1,09555	1,0279	1,03735	1,0526	1,0444
	Q3	1,2877	1,31925	1,114	1,147425	1,0982	1,139825

Figure 119 : Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-3 : paramètres composant l'anisotropie.

### Stéréologie

Le paramètre BV/TV est diminué pour les échantillons HA5 au 28<sup>ème</sup> jour en accord avec la diminution du paramètre « volume of bone ».

		STEREOLOGIE									
		BV/TV		BS/BV		Tb.Th.		Tb.N.		Tb.Sp.	
		HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5	HA	HA5
J7	médiane	0,492641	0,544528	57,214289	77,105039	0,034956	0,025939	14,57998	21,208458	0,033631	0,02242
	Q1	0,459199	0,465615	51,050016	73,255707	0,034728	0,025675	11,721065	14,523638	0,029463	0,021476
	Q3	0,528244	0,586527	57,58974	77,896692	0,039177	0,027302	15,62656	23,068156	0,046139	0,032599
J14	médiane	0,518791	0,525972	55,821417	70,086495	0,035829	0,028536	15,257745	20,321159	0,032627	0,024719
	Q1	0,499355	0,497677	42,159216	65,750284	0,035051	0,024291	12,152235	15,436457	0,023297	0,021671
	Q3	0,576492	0,574808	57,059443	82,334646	0,047439	0,030418	16,698389	21,592981	0,03485	0,031623
J28	Médiane	0,569604	0,29856	60,467494	70,157413	0,033076	0,028522	17,351528	16,2179905	0,025468	0,02899
	Q1	0,545472	0,4326597	59,248173	57,2146178	0,027861	0,02753025	16,88505	14,4741645	0,020936	0,025319
	Q3	0,572072	0,2438165	71,783793	72,661165	0,033756	0,03496675	19,622451	19,0688245	0,025688	0,031663

Figure 120: Résultats de l'étude des zones médullaires de la ROI-3 : paramètres de stéréologie. Les lignes bleues réunissent les échantillons ayant révélé des différences statistiquement significatives.

## **7.4. Etude histologique.**

### **7.4.1. Exploitabilité des résultats.**

#### **7.4.1.1. Histologie décalcifiée.**

Le traitement des fémurs du temps J7 n'a pas permis de mettre en évidence la zone d'implantation, et ce, pour les deux types de matériaux. Les coupes ont souvent été difficiles à réaliser compte tenu de la nature même des matériaux, ceux-ci ayant tendance à s'effriter. L'intégrité de la zone d'intérêt a donc souvent été altérée ce qui a rendu impossible l'exploitation de ces coupes par la plateforme d'histologie.

#### **7.4.1.2. Histologie calcifiée.**

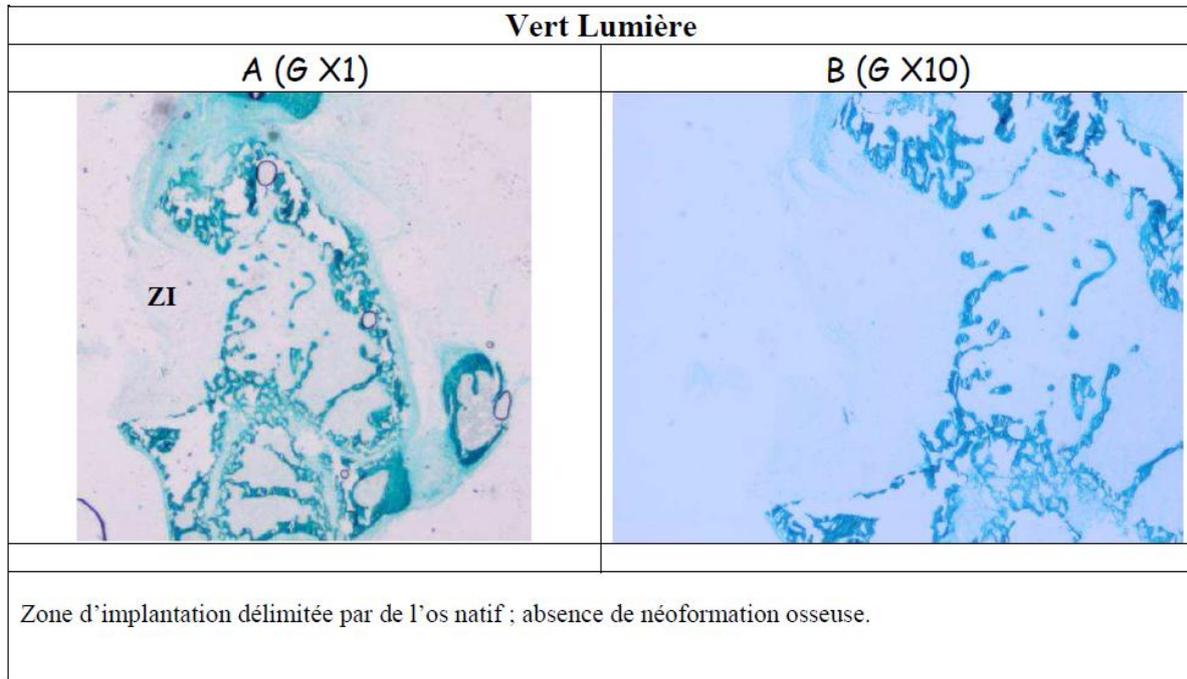
Un problème d'effritement des matériaux, et donc des coupes, a été rencontré, notamment pour les fémurs du temps J7. La coloration de Von Kossa n'apporte pas réellement d'information sur la minéralisation des matériaux compte tenu de la nature même de ceux-ci, déjà chargés en calcium. Seul l'aspect « déstructuré » de ceux-ci les différencie de l'os natif, organisé en travées. Une coloration au Trichrome de Goldner modifié, a été réalisée : elle permet de mettre en évidence l'ostéoïde, signe de la néosynthèse osseuse. Cependant l'un des solvants utilisés dans cette coloration dénature le matériau ce qui laisse apparaître des plages roses au sein de la matrice en lieu et place du matériau.

Du fait de l'absence de résultats pour les échantillons obtenus au 7<sup>ème</sup> jour, seules les études au 14<sup>ème</sup> et au 28<sup>ème</sup> jour ont pu être menées.

## 7.4.2. Histologie descriptive au 14<sup>ème</sup> jour.

### 7.4.2.1. Echantillon témoin.

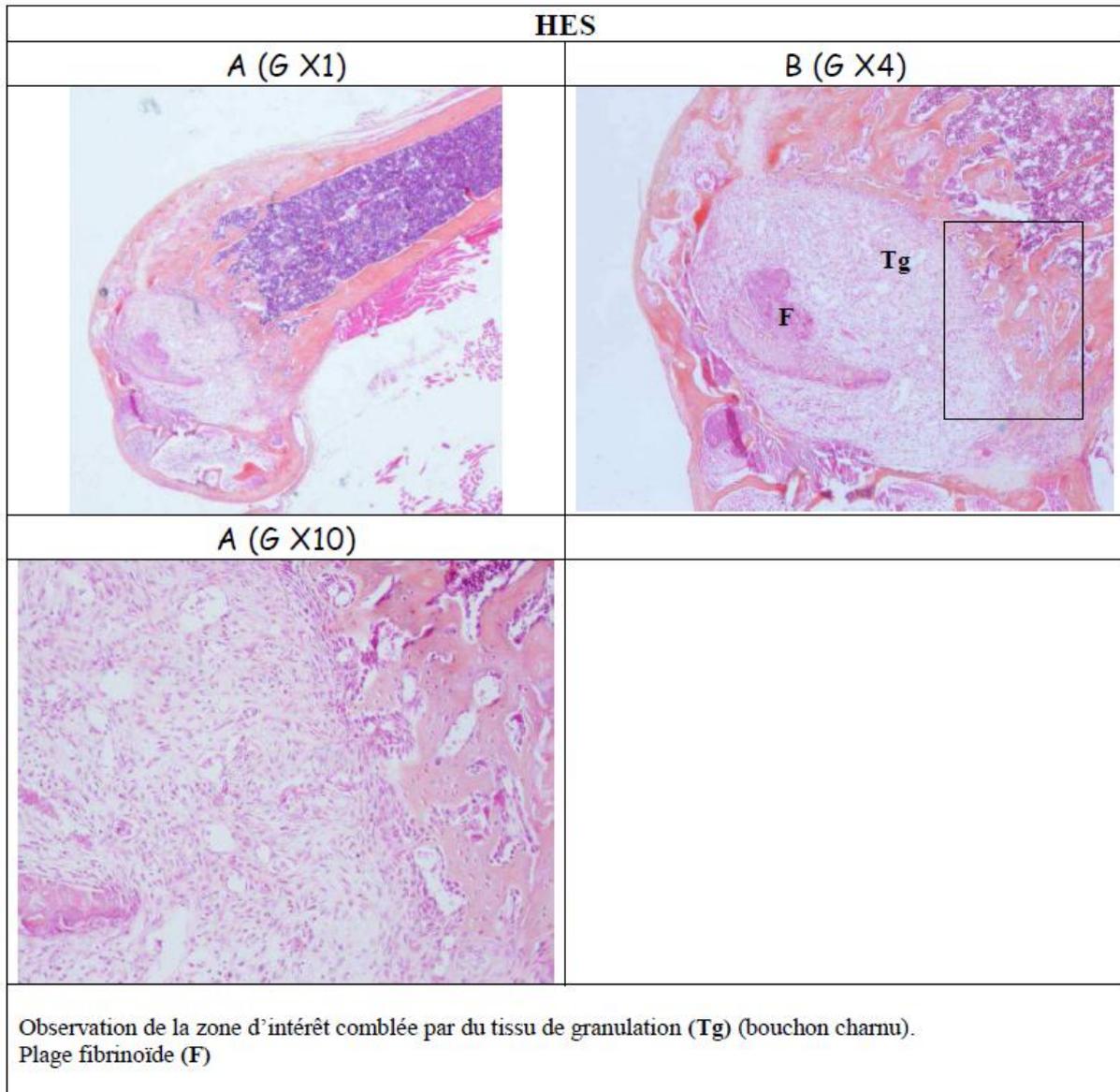
#### Histologie non décalcifiée



**Figure 121 : Histologie descriptive : Echantillon témoin observé en microscopie optique après coloration au vert lumière au 14<sup>ème</sup> jour.**

La zone fraisée est occupée par un bourgeon charnu et est délimitée par de l'os natif. Peu de néoformation osseuse peut être observée au niveau de cette coupe.

*Histologie décalcifiée :*



**Figure 122 : Histologie descriptive : Echantillon témoin observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration au HES au 14<sup>ème</sup> jour.**

La zone fraisée est occupée par un bourgeon charnu et est délimitée par de l'os natif. Peu de néoformation osseuse peut être observée au niveau de cette coupe. Des plages fibrinoïdes ont pu être mises en évidence au centre de certaines zones d'intérêts.

### 2.1.1.1. Echantillon HA.

#### Histologie non décalcifiée.

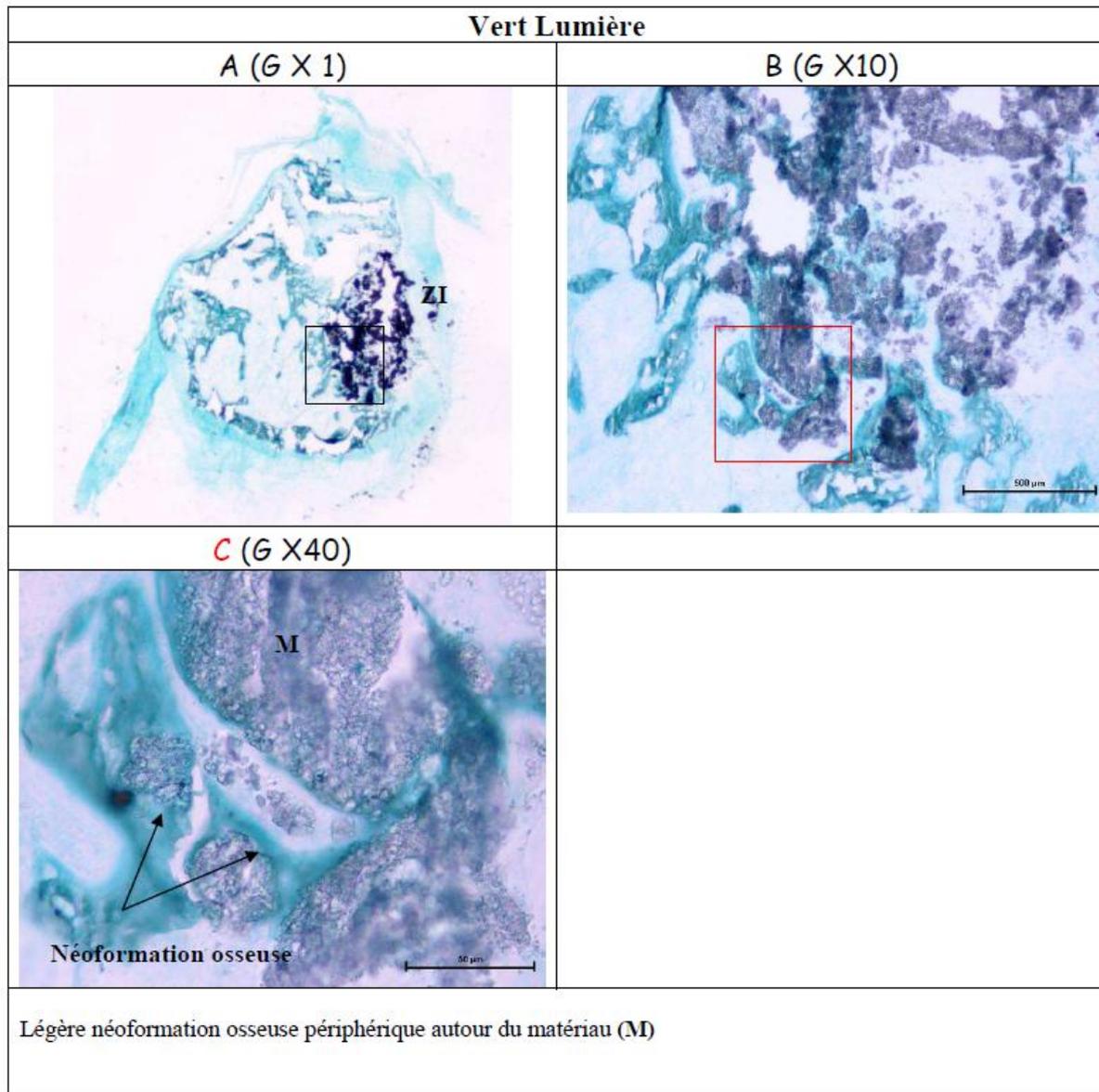
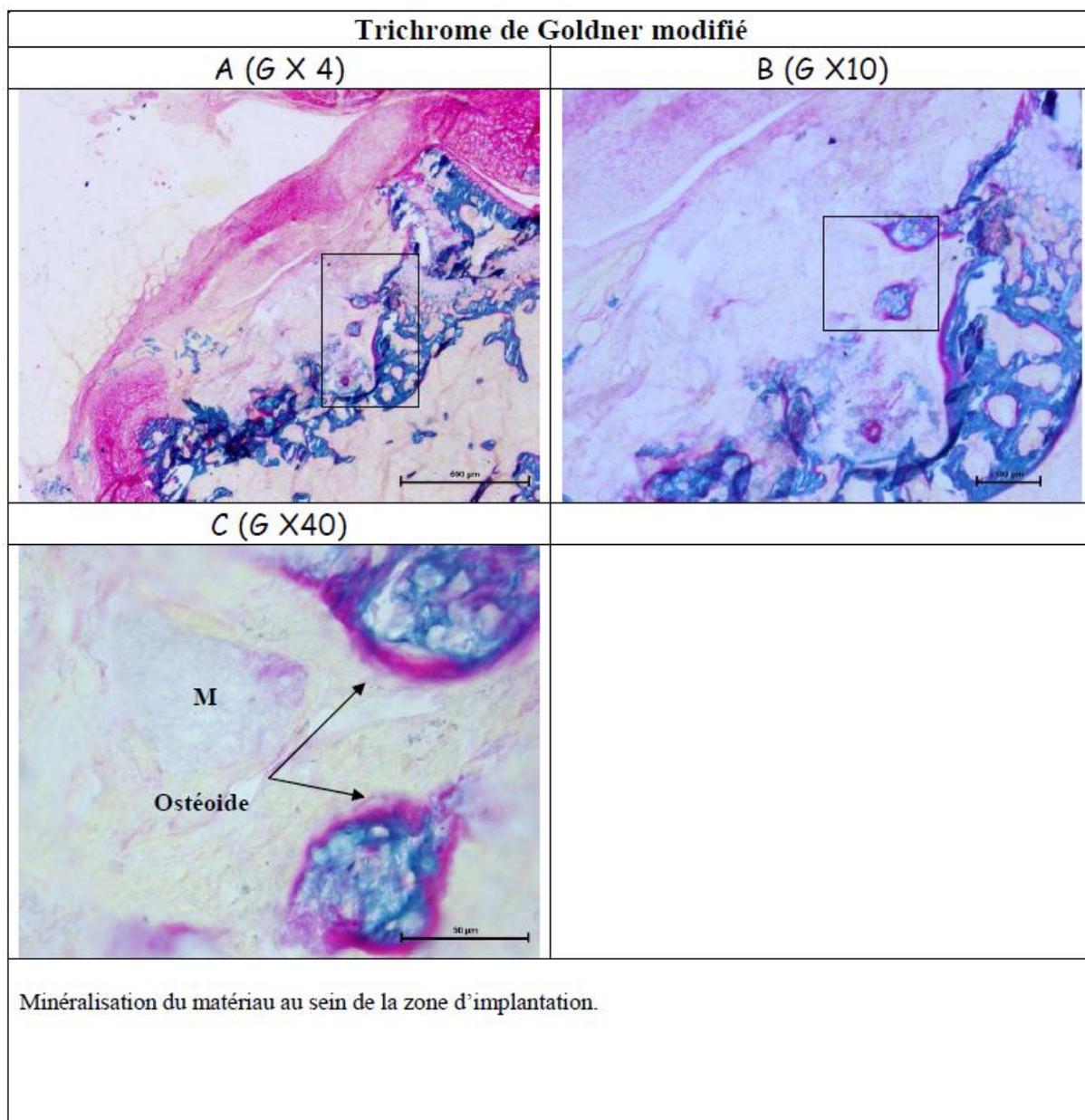


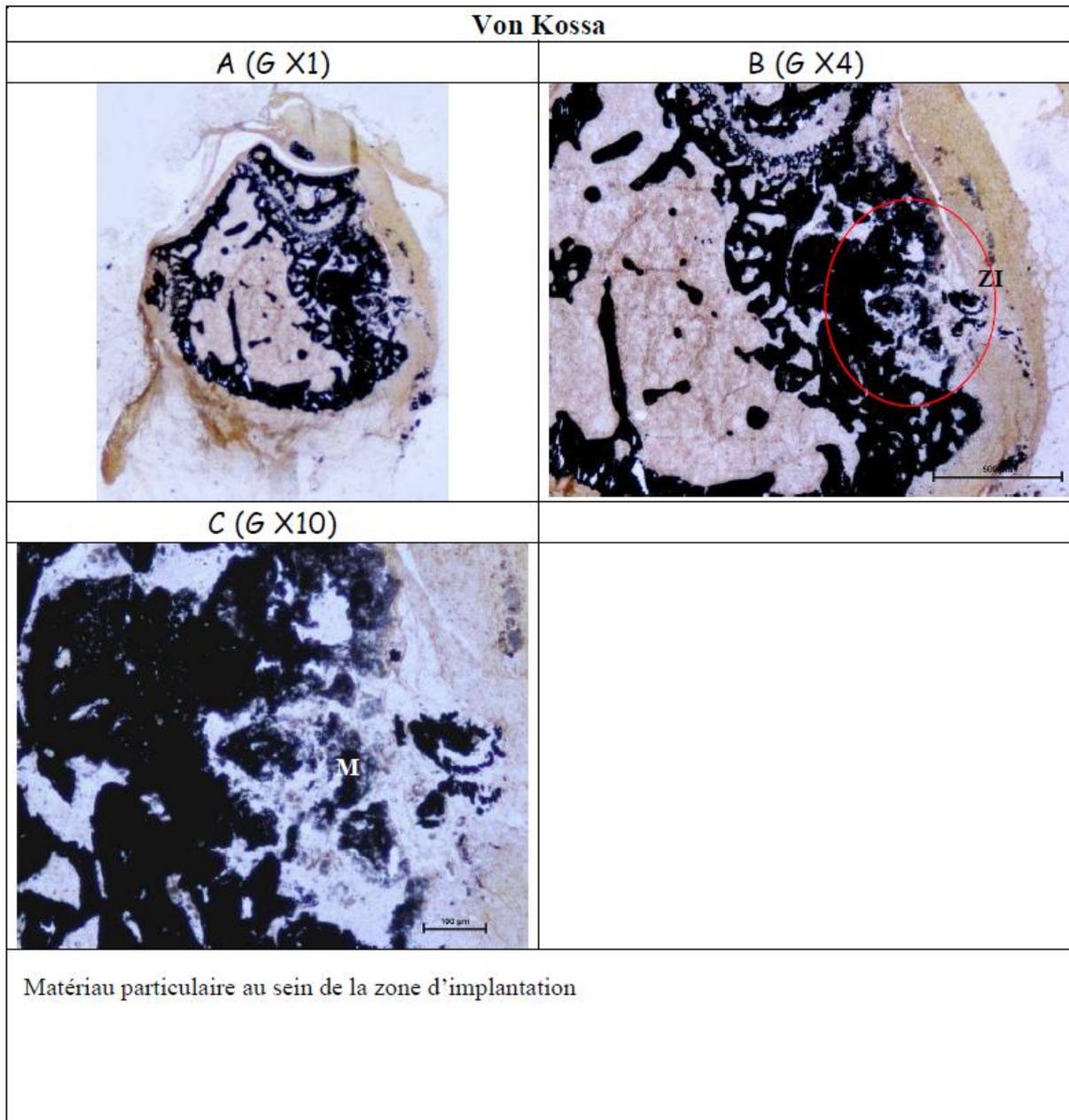
Figure 123 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au vert lumière au 14<sup>ème</sup> jour.

La poudre HA est retrouvée agrégée en amas de 100 µm de diamètre environ. Une légère néoformation osseuse périphérique peut être observée au contact des agrégats en périphérie de la zone d'implantation.



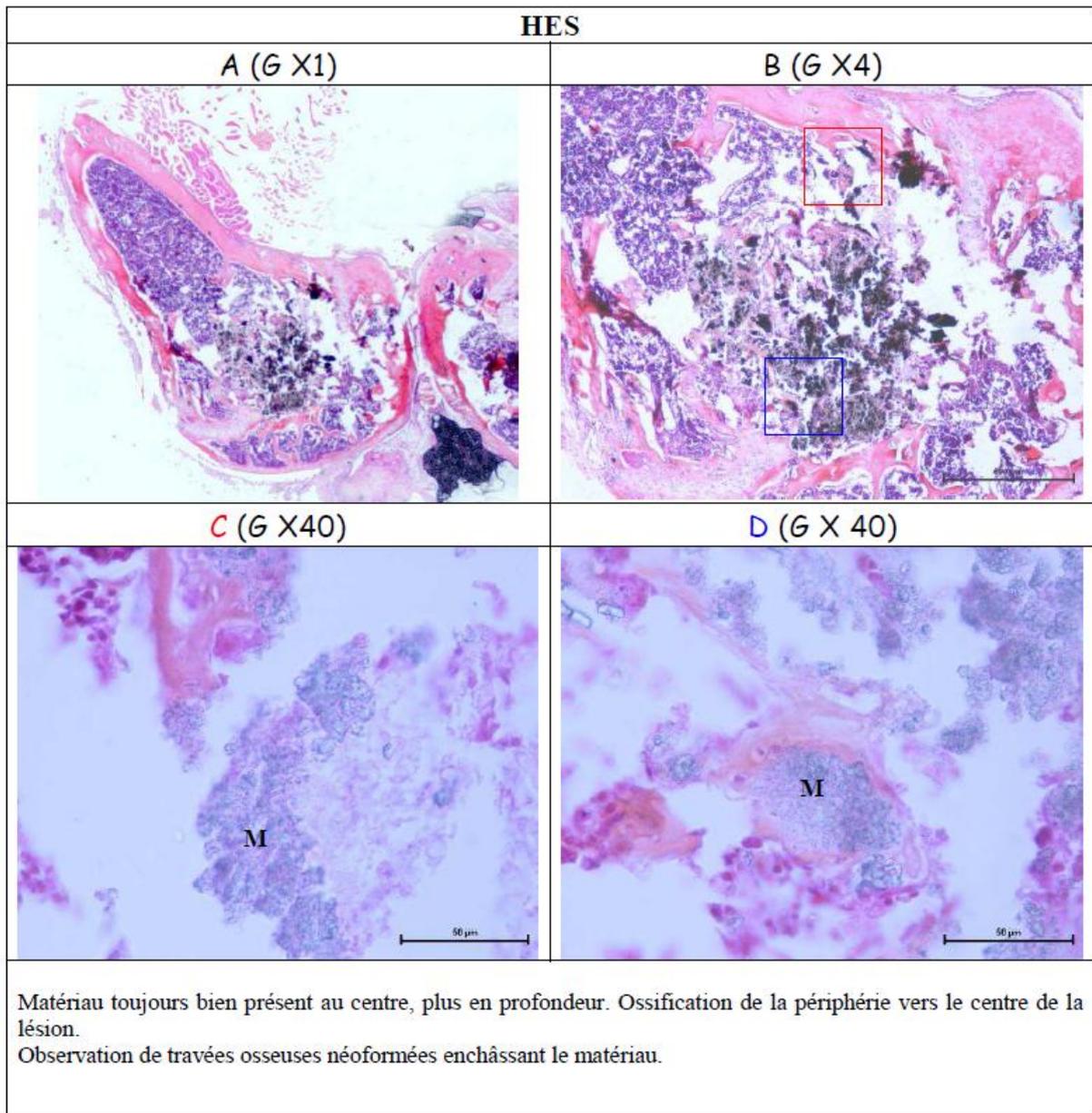
**Figure 124 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au trichrome de Goldner modifié au 14<sup>ème</sup> jour.**

Les résultats obtenus lors de l'étude en vert lumière sont confirmés par le trichrome de Goldner : des plages de minéralisation sont observées autour du matériau et sont mises en évidence par la coloration rouge de l'ostéode apportée par le trichrome de Goldner.



**Figure 125 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au Von Kossa au 14<sup>ème</sup> jour.**

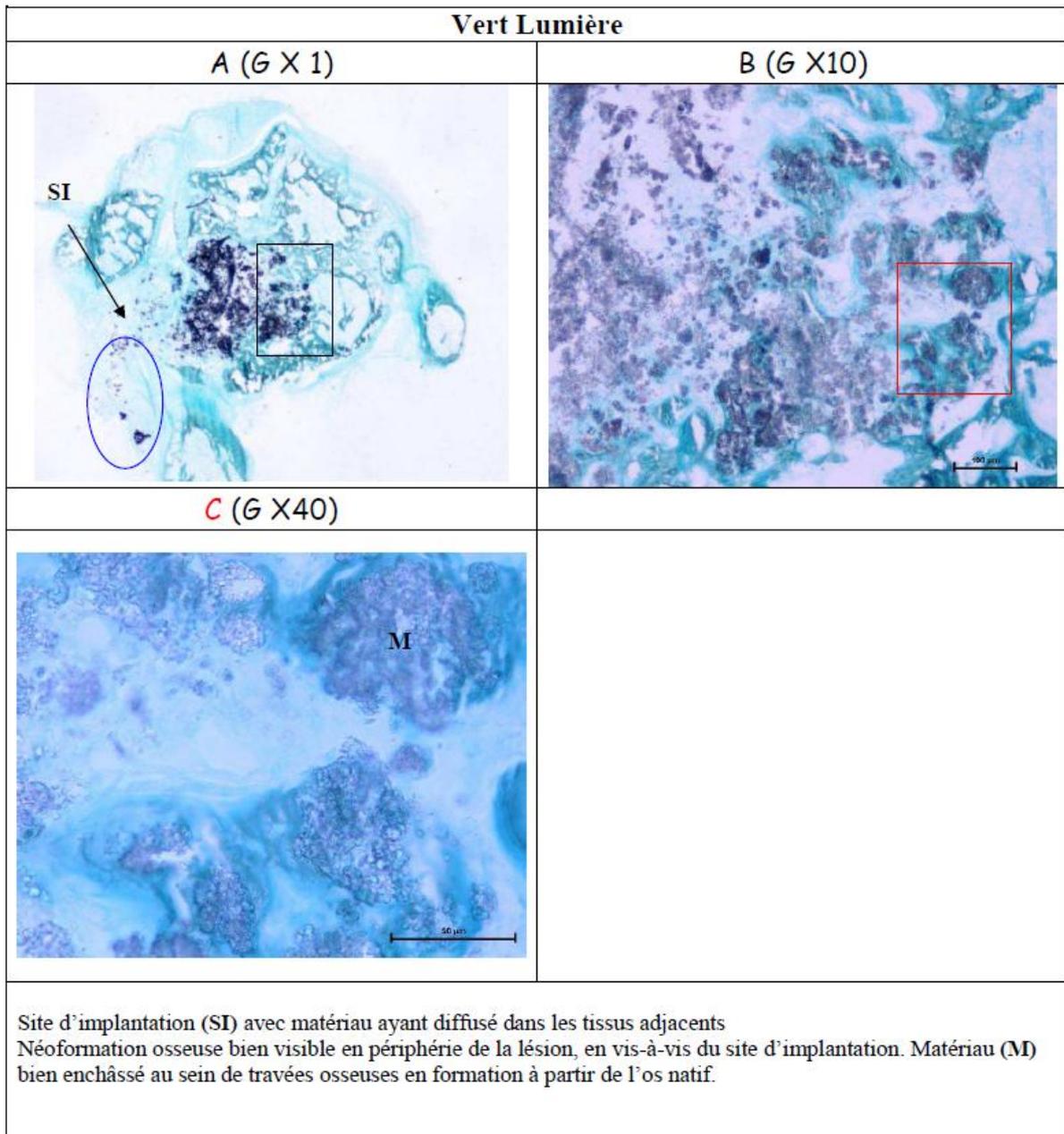
Le regroupement de la poudre en agrégats est mis en évidence par la coloration de Von Kossa. Peu de minéralisation osseuse peut être constatée sur cette coupe.



**Figure 126 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 14<sup>ème</sup> jour.**

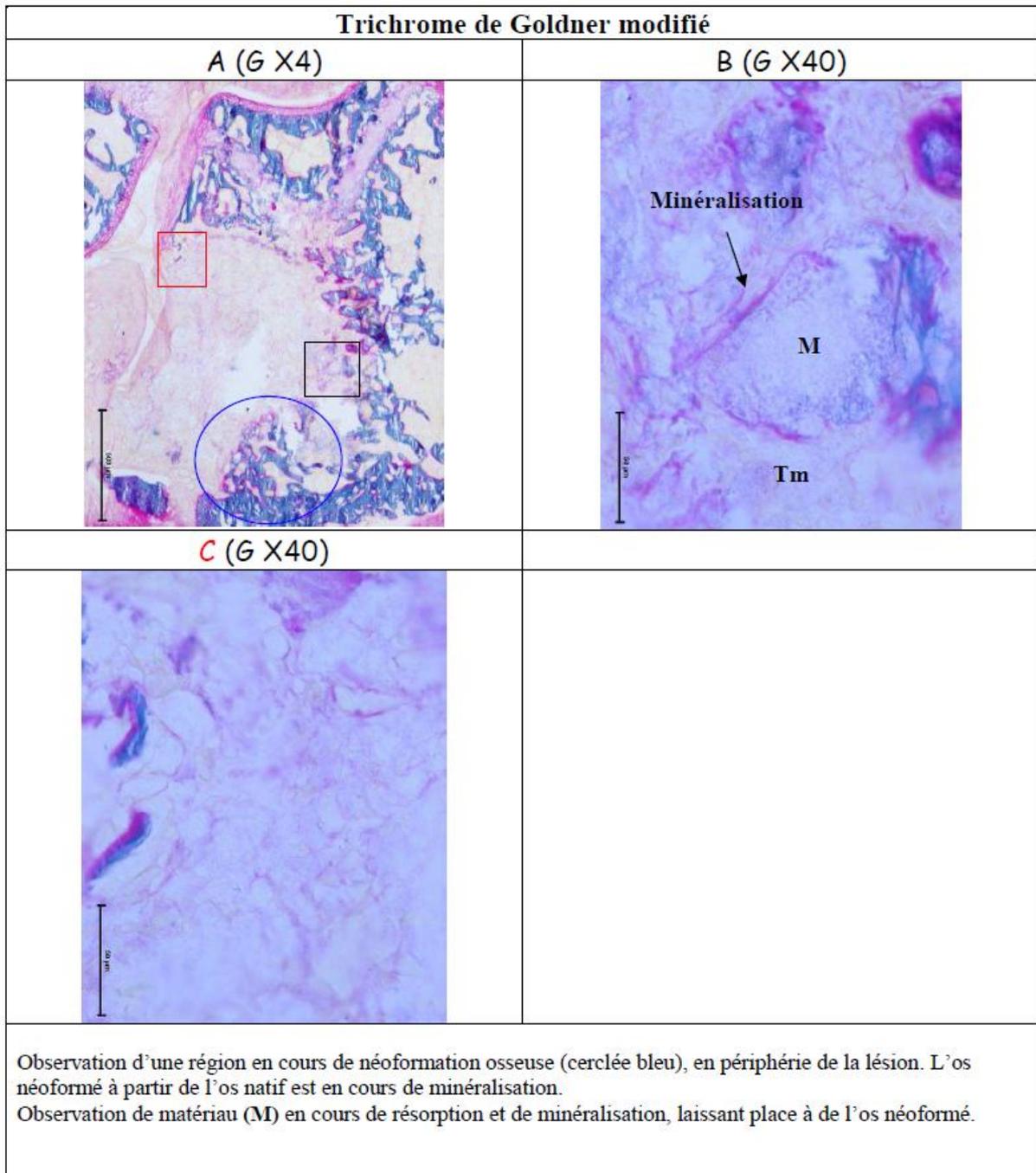
La poudre HA est retrouvée sous forme d'agrégats autour desquels il existe, surtout en périphérie de l'implant une néoformation osseuse importante. L'ossification se réalise de la périphérie du matériau vers le centre. Le matériau est bien présent et montre peu d'images de résorption. En périphérie, des travées osseuses néoformées enchâssent le matériau (M).

### 7.4.2.2. Echantillons HA5.



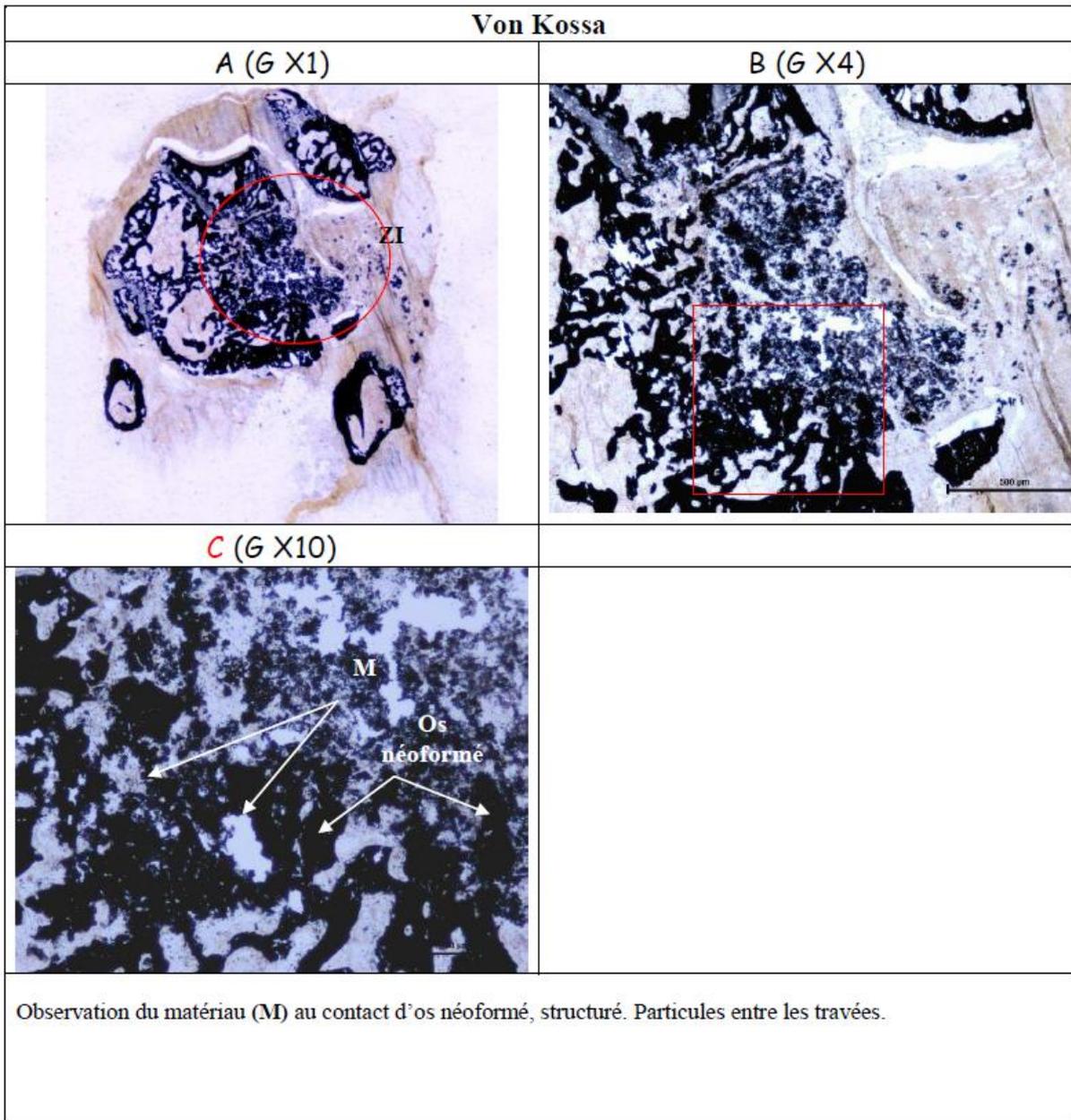
**Figure 127 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration au vert lumière modifié au 14<sup>ème</sup> jour.**

Une néof ormation osseuse est bien visible en périphérie du comblement osseux. Le matériau présente un aspect particulière. En périphérie de l'implant, le matériau est retrouvé enchâssé au sein de travées osseuses en formation provenant de l'os natif. Le matériau plus distant est entouré d'ostéoïde.



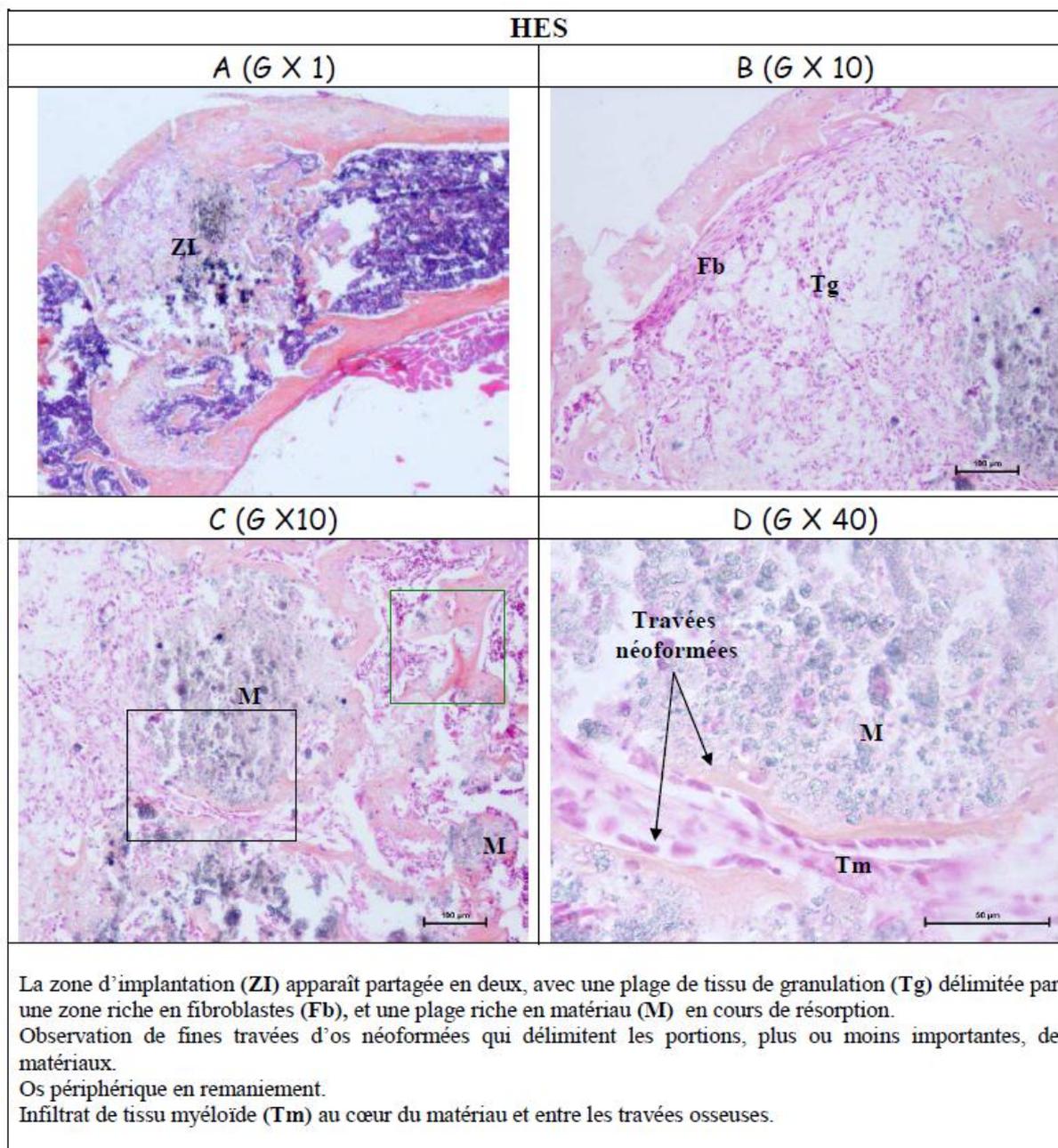
**Figure 128 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration au trichrome de Goldner modifié au 14<sup>ème</sup> jour.**

Le trichrome de Goldner modifié montre la présence d'importantes zones de minéralisation provenant des zones les plus profondes de la zone fraisée. Le matériau est fortement résorbé et laisse place à de l'os néoformé.



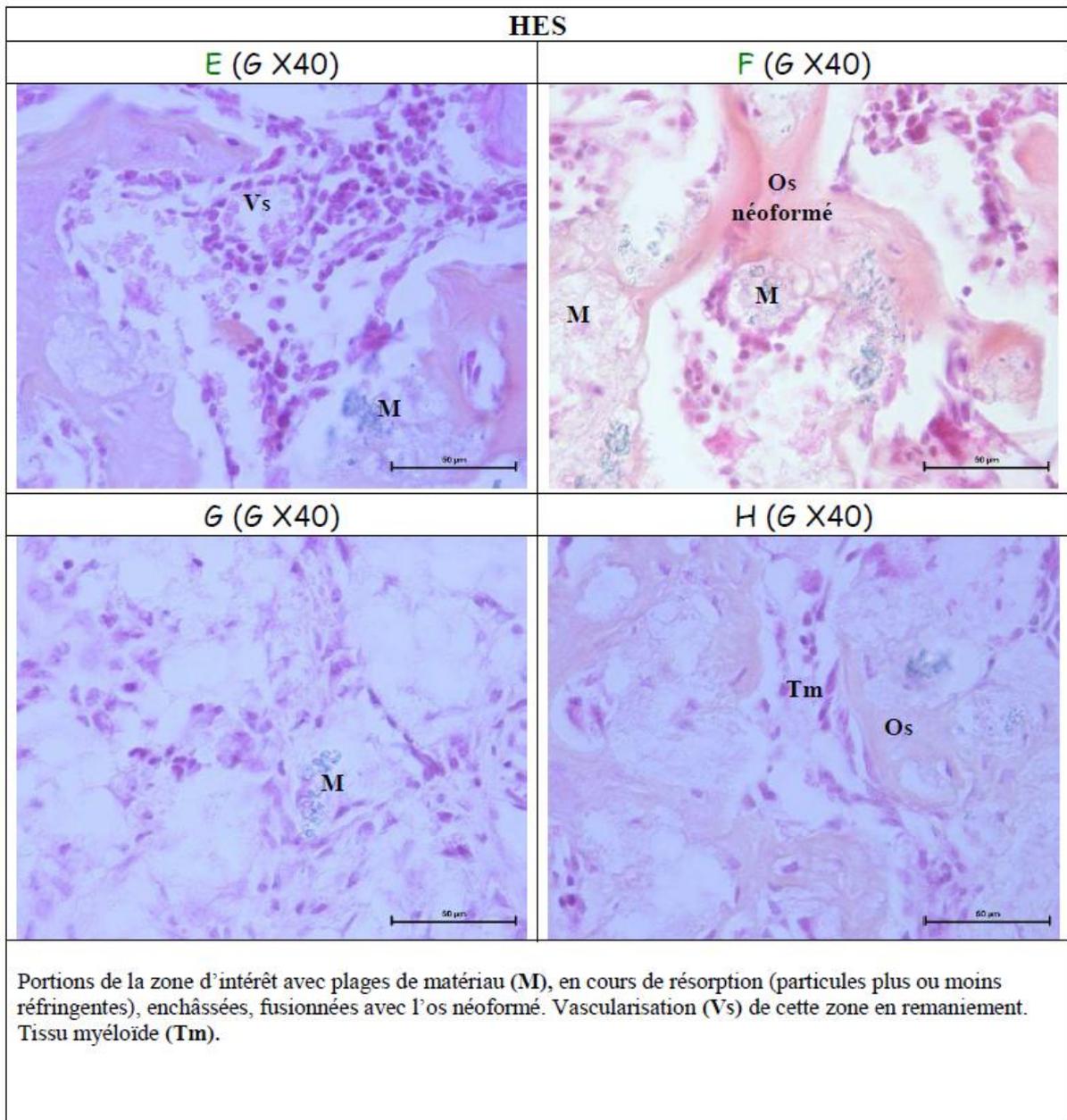
**Figure 129 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration de Von Kossa au 14<sup>ème</sup> jour.**

La coloration Von Kossa révèle un matériau qui a conservé sa forme particulière. Des zones denses et plus organisées en provenance de l'os natif laissent penser à des travées d'os néoformé se dirigeant vers l'intérieur de l'implant.



**Figure 130 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 14<sup>ème</sup> jour (1/2).**

La coloration par l'hématoxyline-éosine-safran (HES) laisse apparaître une zone d'implantation partagée en deux : la partie superficielle est composée d'une plage de tissu de granulation où une zone riche en fibroblastes est présente (figure 130). Les parties les plus profondes sont constituées de plages riches en matériau délimitées par de fines travées osseuses où l'on peut apercevoir des structures laissant penser à des axes vasculaires autour desquels les cellules myéloïdes sont retrouvées (figure 131).



**Figure 131 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 14<sup>ème</sup> jour (2/2).**

### **7.4.2.3. Conclusions à 14 jours:**

#### **Echantillons témoins.**

Les coupes des fémurs témoins montrent une zone d'implantation comblée par un bourgeon charnu, et l'absence de néoformation osseuse périphérique.

#### **Implants HA.**

Une formation osseuse est observée pour 2 implants sur 6 avec des travées bien présentes au centre de la lésion. 3 implants montrent une néoformation osseuse moindre et un seul ne montre aucun signe de remaniement osseux. L'os néoformé, au contact du matériau, apparaît histologiquement sain avec une matrice minéralisée bordée par de l'ostéoïde en cours de minéralisation. Comme pour les implants HA-Sr, le matériau se présente sous forme de particules plus ou moins réfringentes, selon leur degré de résorption, amalgamées en plages plus ou moins denses. Le matériau apparaît bien toléré, n'induisant aucune réaction inflammatoire significative, et se résorbe progressivement pour laisser place à un os néoformé histologiquement sain. Les coupes superficielles mettent en évidence le matériau, présent sur toute la surface de la zone d'implantation. L'absence d'observation de tissu de granulation, est probablement due à la profondeur des coupes. Les coupes profondes mettent en évidence une néoformation osseuse de la périphérie vers le centre de la lésion. Le niveau de résorption du matériau résiduel semble moins important par rapport aux implants HA5.

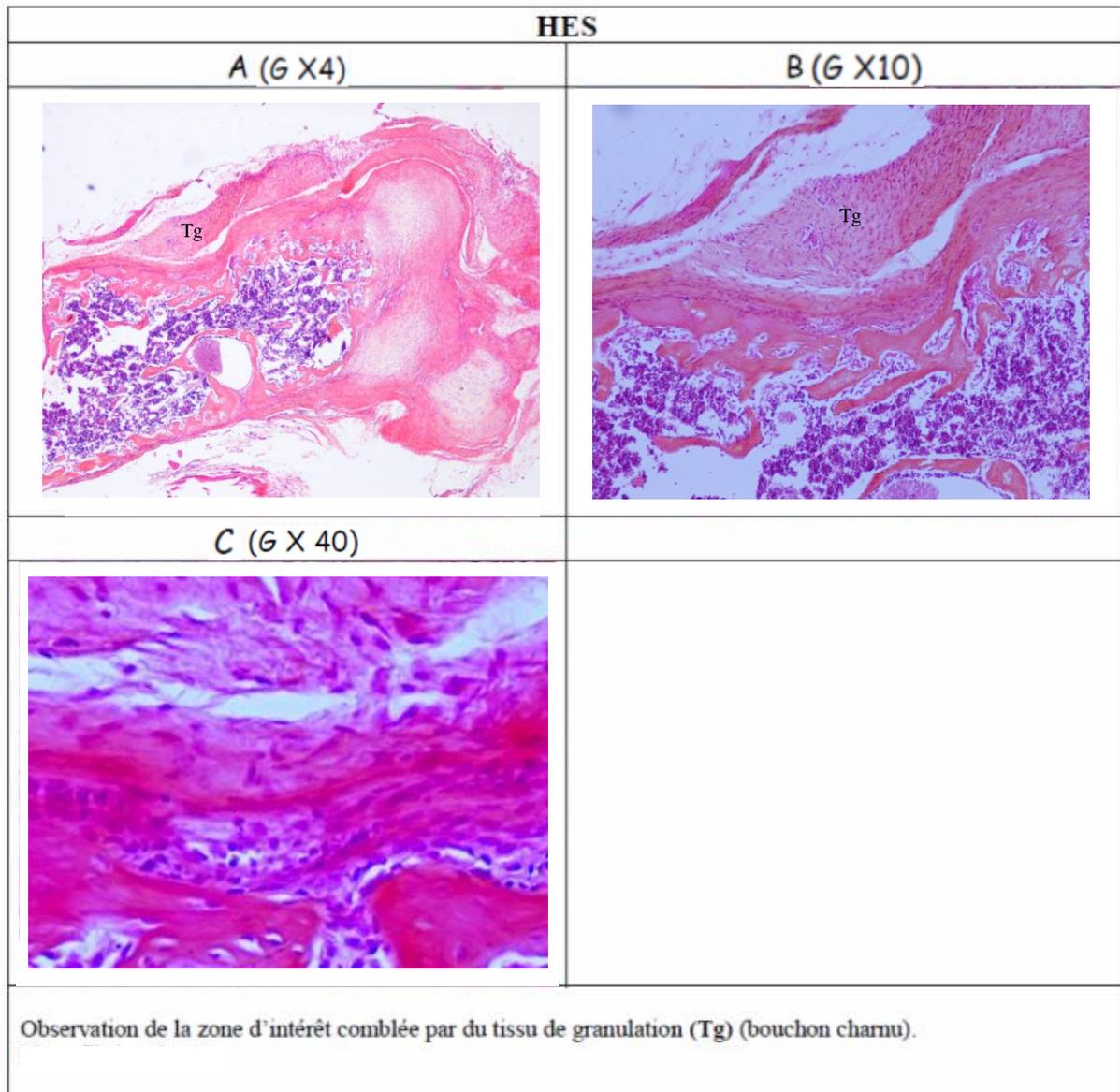
#### **Implants HA5.**

Une importante néoformation osseuse est observée de la périphérie vers le centre de la lésion pour 2 implants sur 3. Un implant en revanche, présente très peu d'os néoformé. Les différences pouvant peut-être s'expliquer par la profondeur du niveau de coupe. L'os néoformé, au contact du matériau, apparaît histologiquement sain avec une matrice minéralisée bordée par de l'ostéoïde en cours de minéralisation. Le matériau se présente sous forme de particules plus ou moins réfringentes, selon leur degré de résorption, amalgamées en plages plus ou moins denses. Les coupes superficielles, mettent en évidence un tissu de granulation en superficie de la lésion, du côté du site de ponction. Les coupes plus profondes montrent un matériau colonisé par le tissu myéloïde et des axes vasculaires favorisant la reconstruction osseuse. Celle-ci se fait de la périphérie vers le centre de la lésion avec remaniement de l'os périphérique natif et en vis-à-vis du site de ponction. Le matériau apparaît bien toléré, n'induisant aucune réaction inflammatoire significative, et se résorbe progressivement pour laisser place à un os néoformé histologiquement sain.

### 7.4.3. Histologie descriptive au 28<sup>ème</sup> jour.

#### 7.4.3.1. Echantillon témoin.

Histologie décalcifiée :



**Figure 131 : Histologie descriptive : Echantillon témoin observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 28<sup>ème</sup> jour.**

La zone fraisée est occupée par un bourgeon charnu et est délimitée par de l'os natif. Une importante néoformation osseuse peut être observée au niveau de cette coupe. L'os néosynthétisé apparaît de constitution normale.

### 7.4.3.2. Echantillon HA.

#### Histologie non décalcifiée.

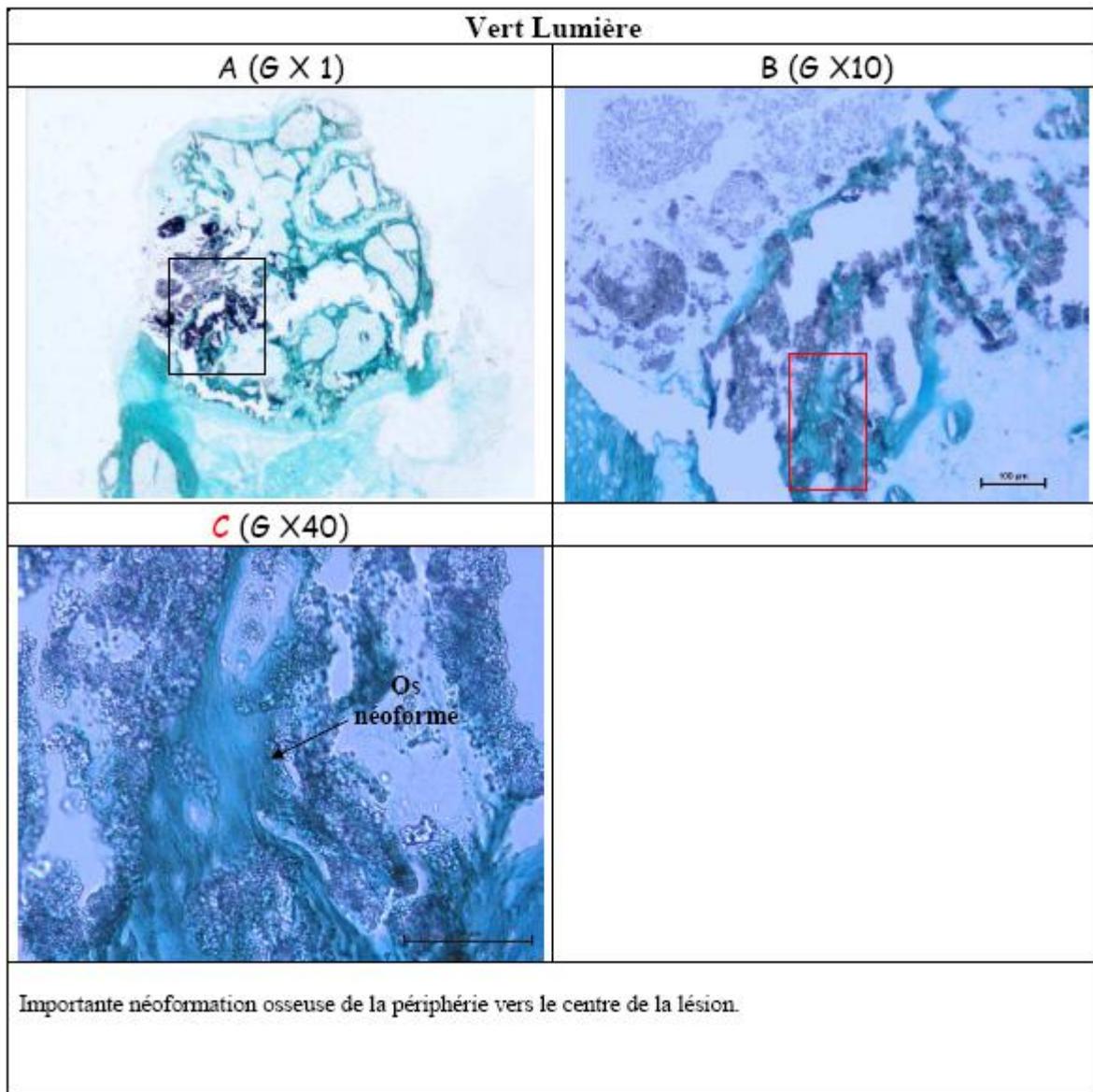
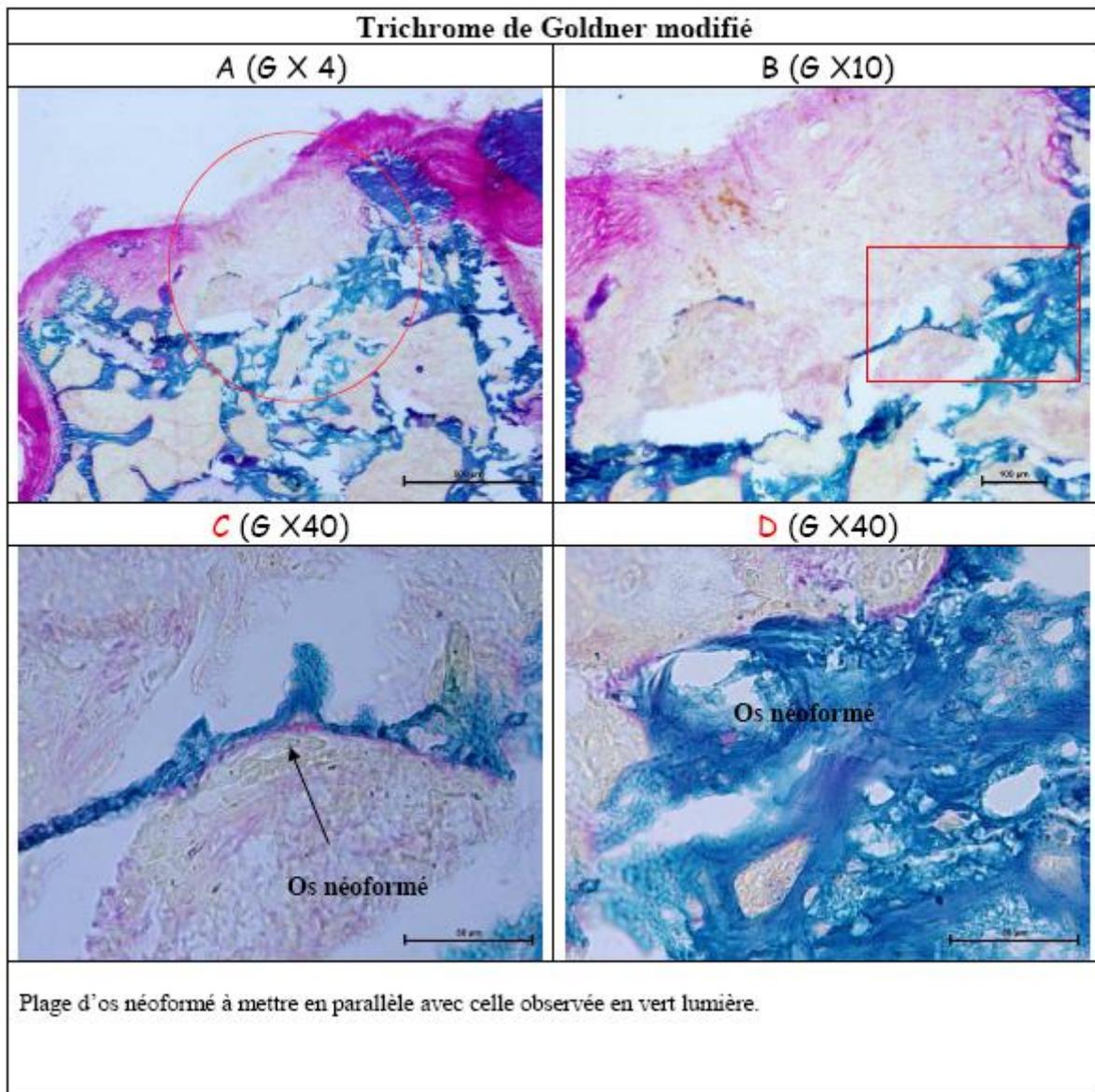


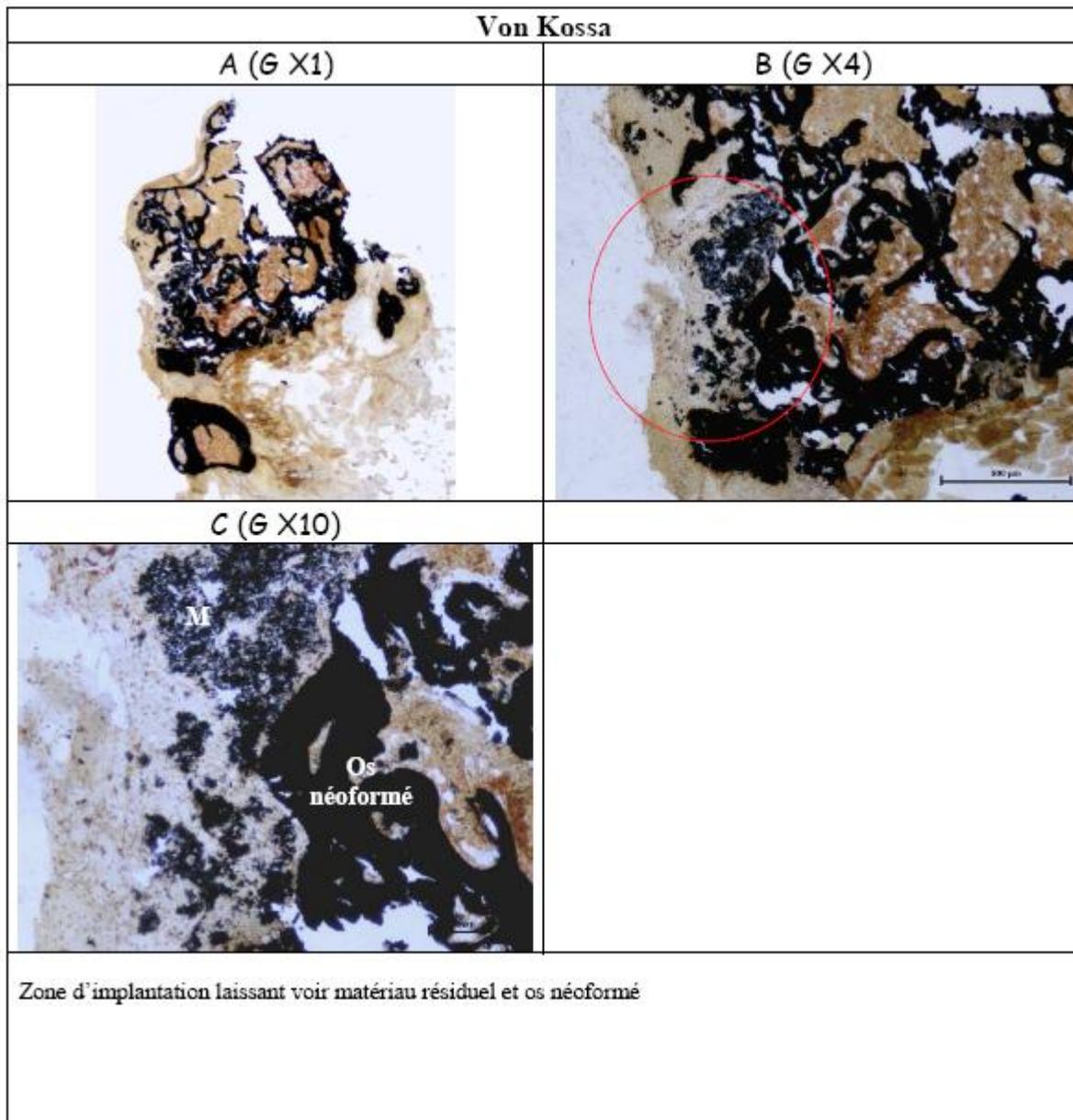
Figure 132 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au vert lumière modifiée au 28<sup>ème</sup> jour.

Les échantillons présentent une poudre apparaissant agrégée. Les amas mesurent en moyenne 100 µm de diamètre et apparaissent reliés par des zones comportant d'importantes plages de néoformation osseuse. L'ossification semble encore être dirigée de la périphérie vers l'intérieur de l'implant.



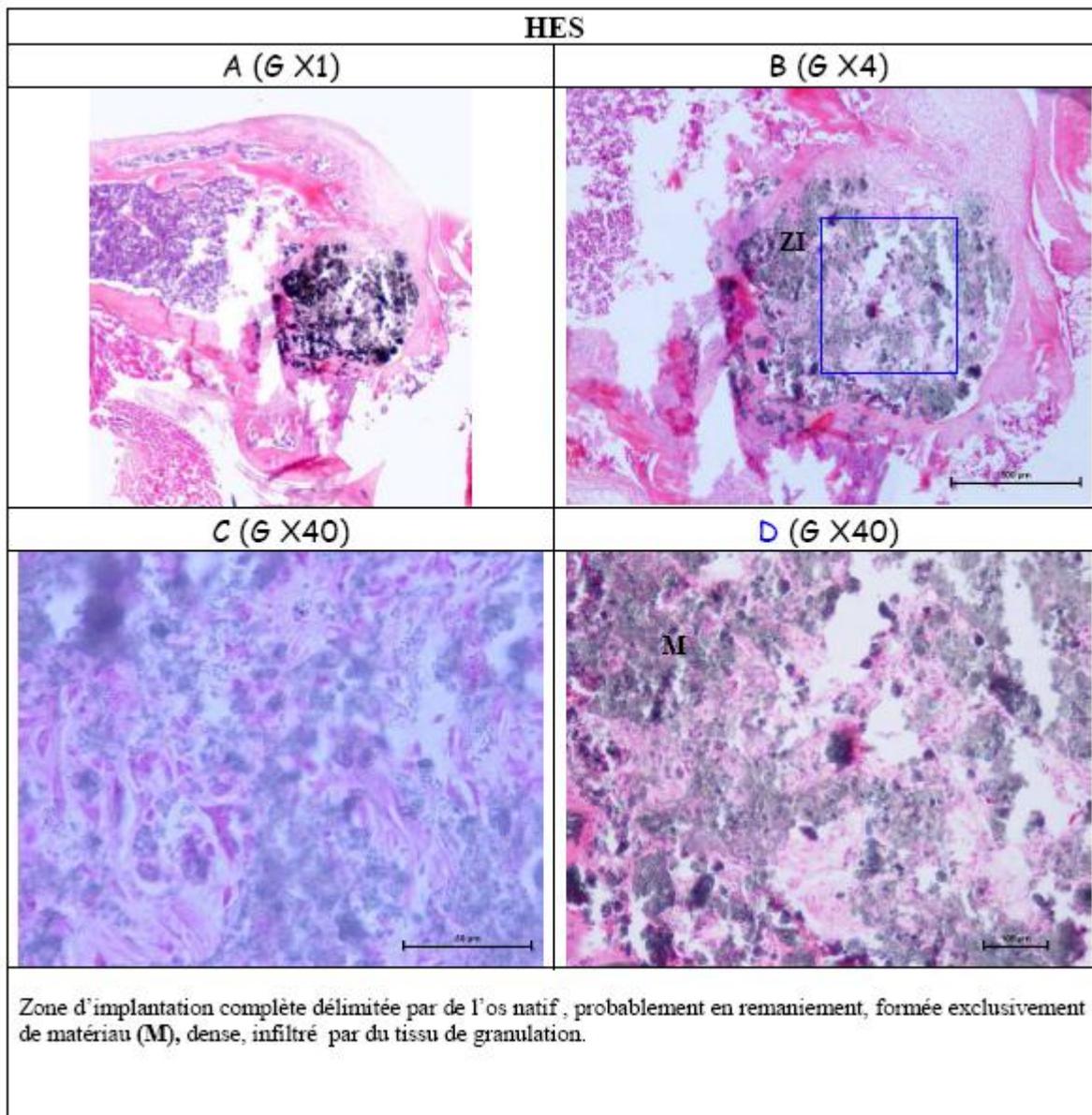
**Figure 133 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au trichrome de Goldner modifié au 28<sup>ème</sup> jour.**

Les résultats obtenus après coloration au vert lumière sont confirmés par le trichrome de Goldner modifié : des plages de néoformation osseuse se dirigeant vers le centre de la lésion sont observables en périphérie de la zone d'implantation.



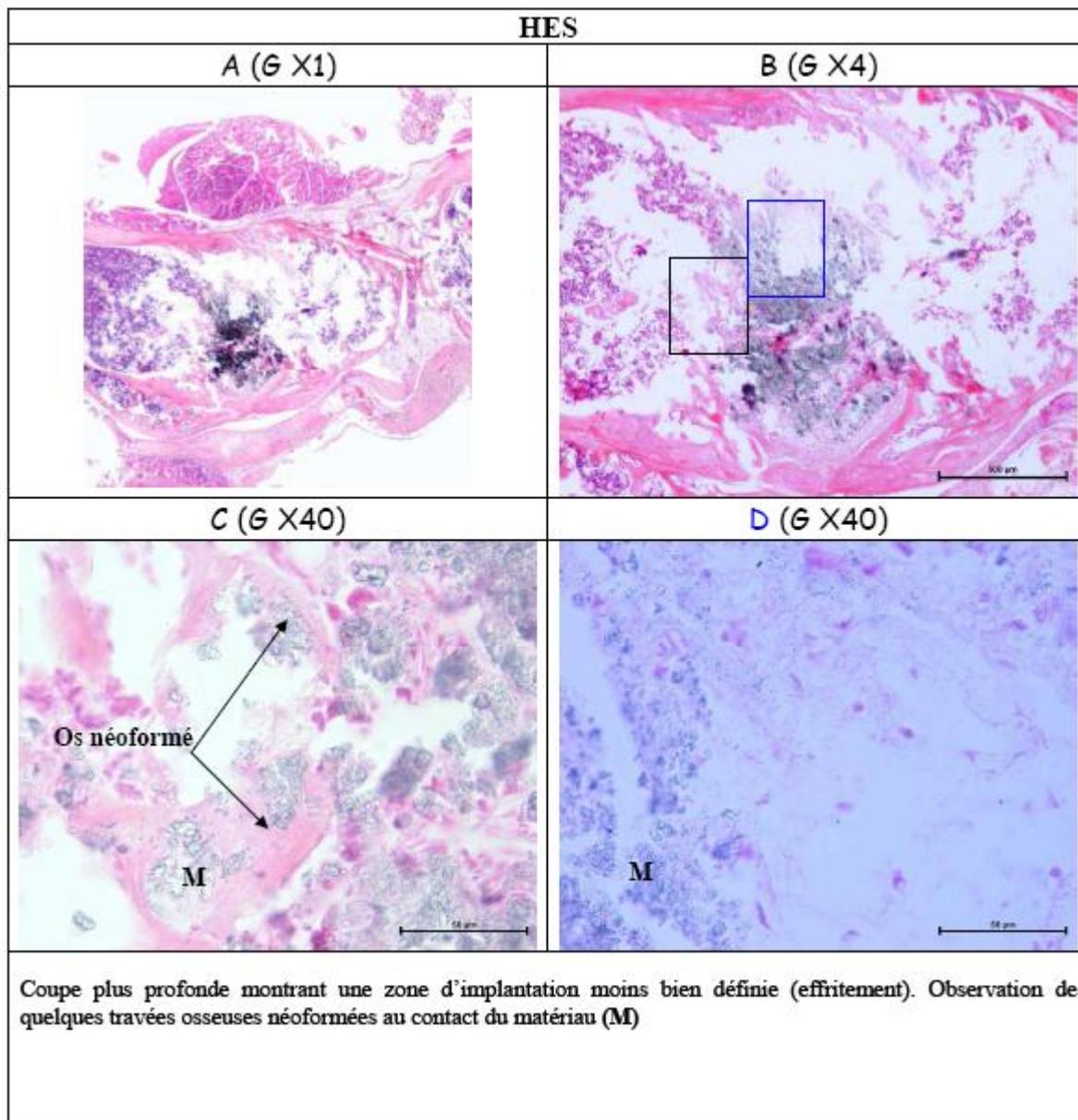
**Figure 134 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après coloration au Von Kossa au 28<sup>ème</sup> jour.**

La coloration de Von Kossa confirme également les résultats acquis lors des précédentes colorations et renforce l'observation d'amas de matériau au sein d'os néoformé.



**Figure 135 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 28<sup>ème</sup> jour (1/2).**

La zone d'implantation est complètement délimitée par de l'os natif. Le matériau est retrouvé sous forme d'amas entourés de zones de néoformation osseuse classique et d'une vascularisation importante en périphérie. Certaines coupes révèlent la présence d'un tissu de granulation résiduel dans les zones proches de la surface de l'implant mais également plus au centre de la lésion.



**Figure 136 : Histologie descriptive : Echantillon HA observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 28<sup>ème</sup> jour (2/2).**

Des coupes réalisées plus en profondeur du site d'implantation montrent d'importantes travées osseuses néoformées au contact direct des matériaux. Sur certaines coupes, le matériau semble intégré à la travée osseuse.

### 7.4.3.3. Echantillon HA5.

#### Histologie non décalcifiée.

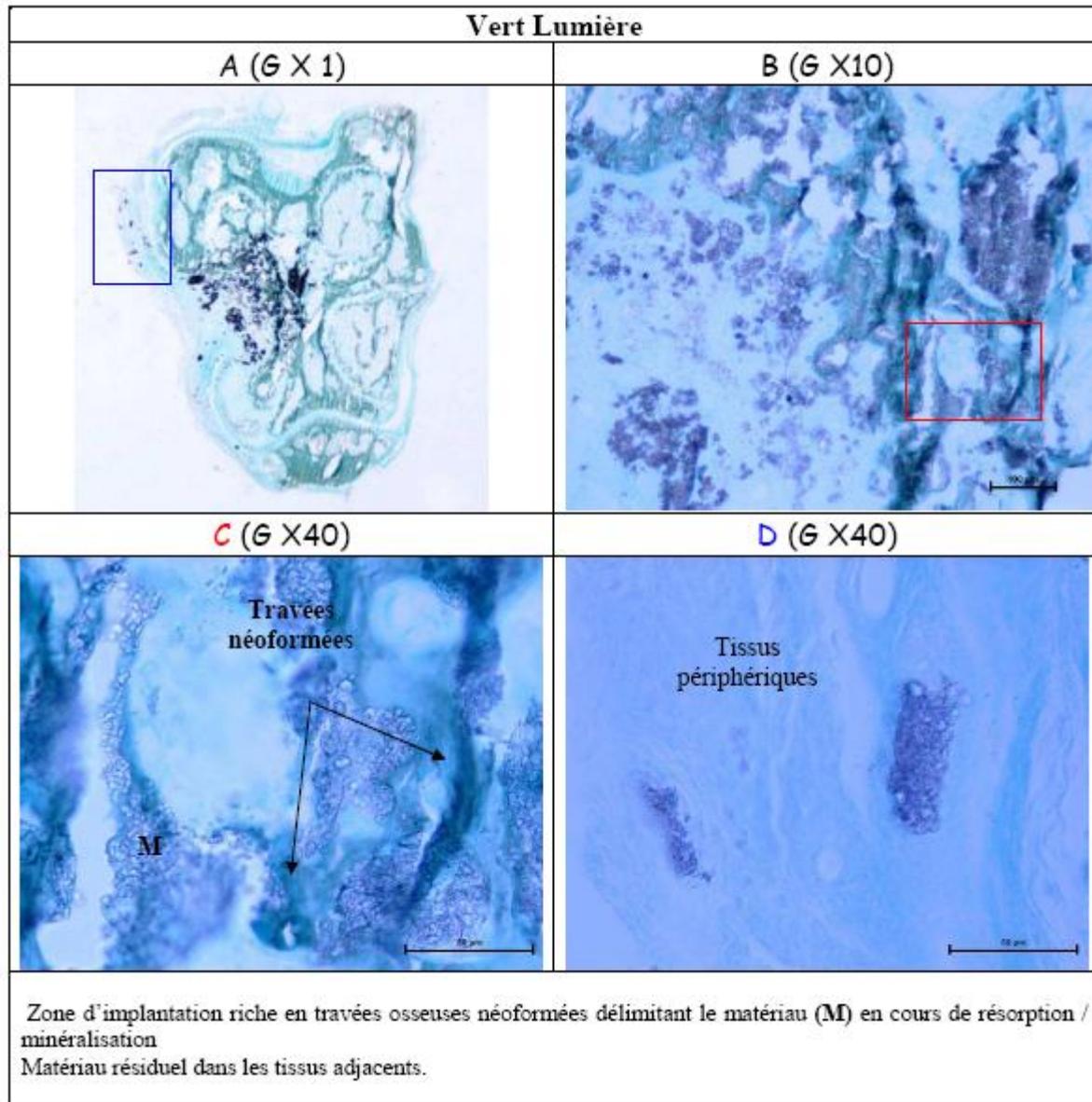
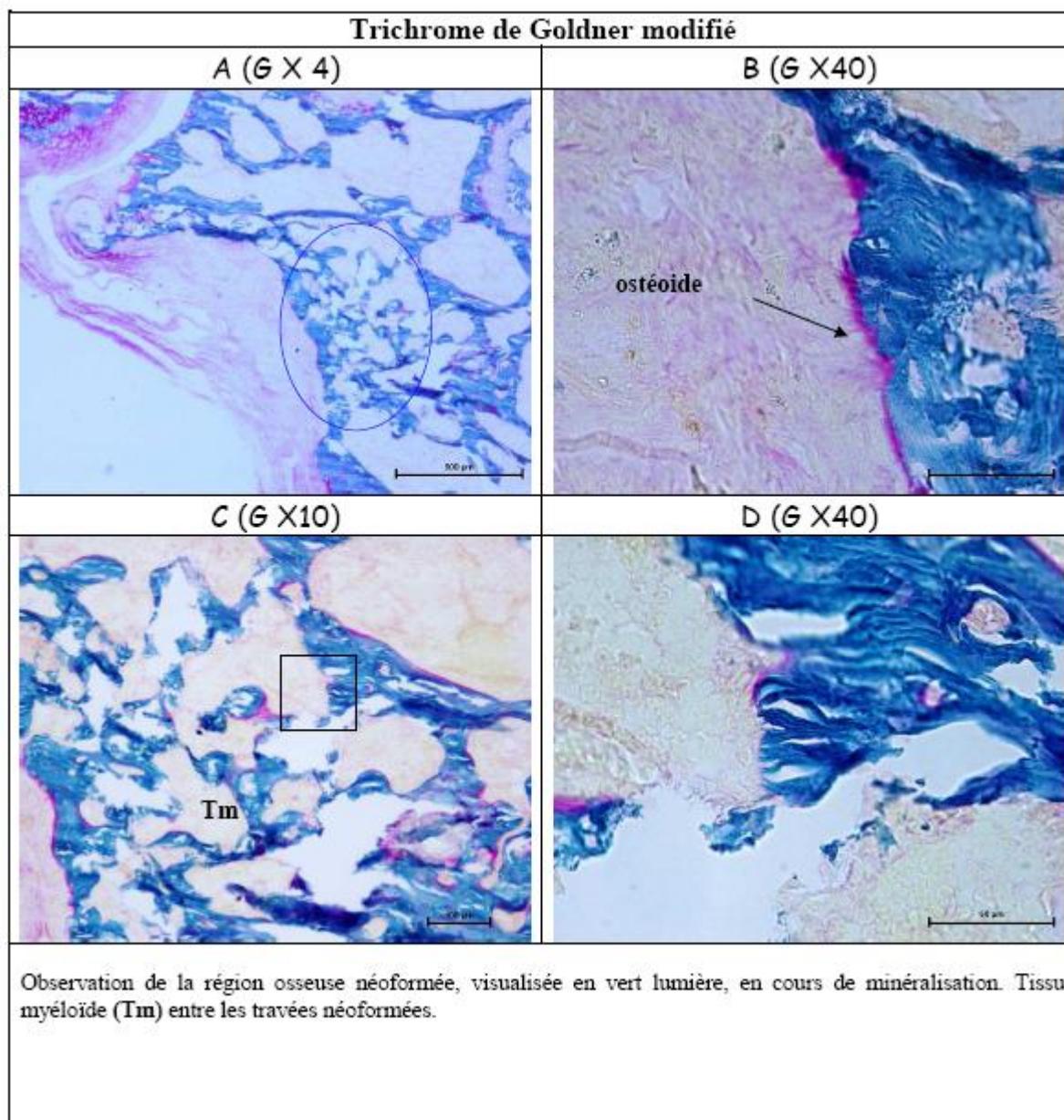


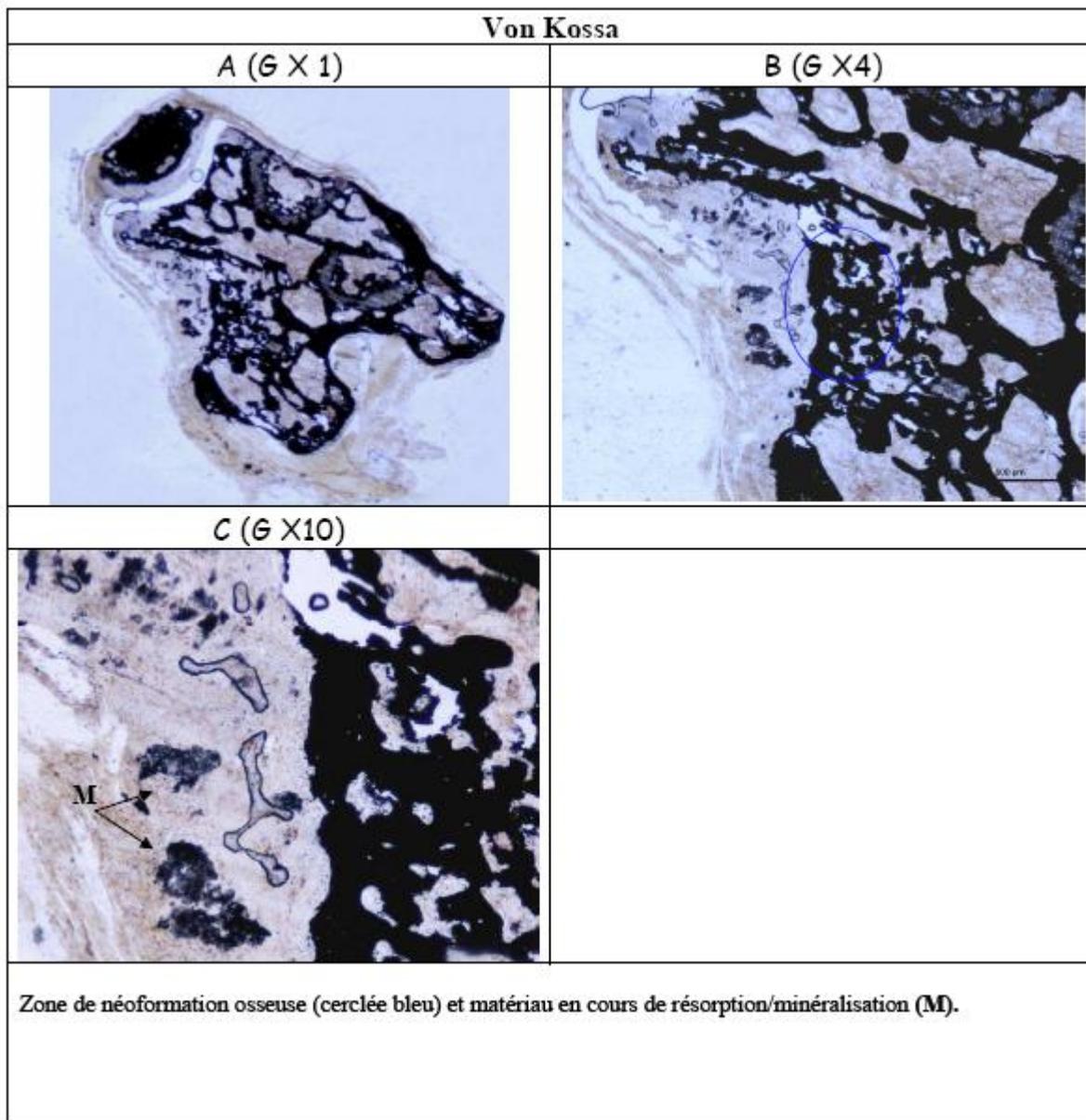
Figure 137 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration au vert lumière modifiée au 28<sup>ème</sup> jour.

La zone d'intérêt se révèle riche en travées osseuses néoformées. Des lacunes de résorption peuvent être observées par endroits sur le matériau qui présente encore une forme bien particulière.



**Figure 138 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration au trichrome de Goldner modifié au 28<sup>ème</sup> jour.**

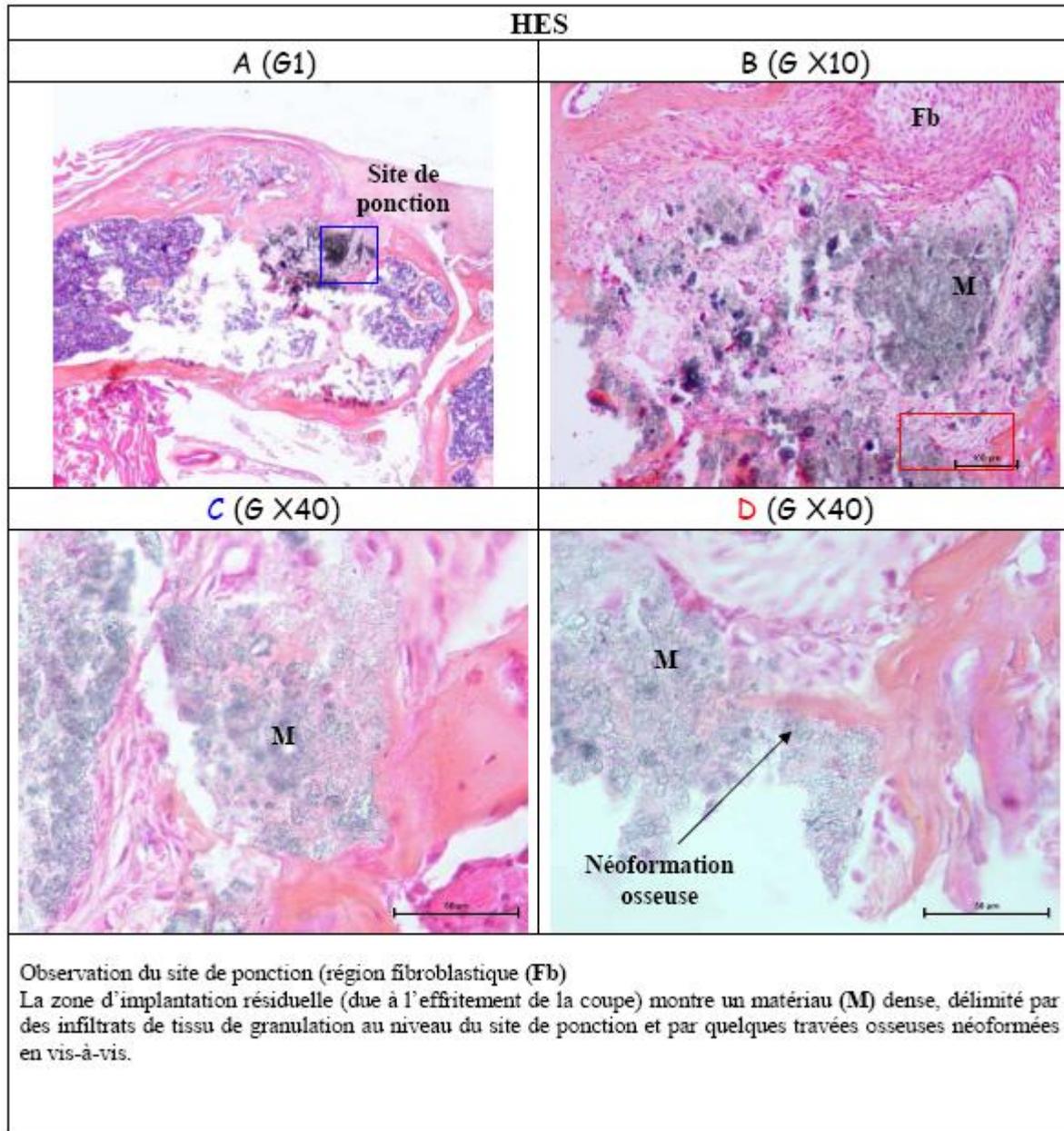
Cette coloration montre de nombreuses zones de néοformations osseuses se dirigeant de la périphérie vers le centre de la lésion résiduelle. Des espaces enfermant du tissu myéloïde ont pu être observés sur de nombreuses coupes.



**Figure 139 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après coloration de Von Kossa au 14<sup>ème</sup> jour.**

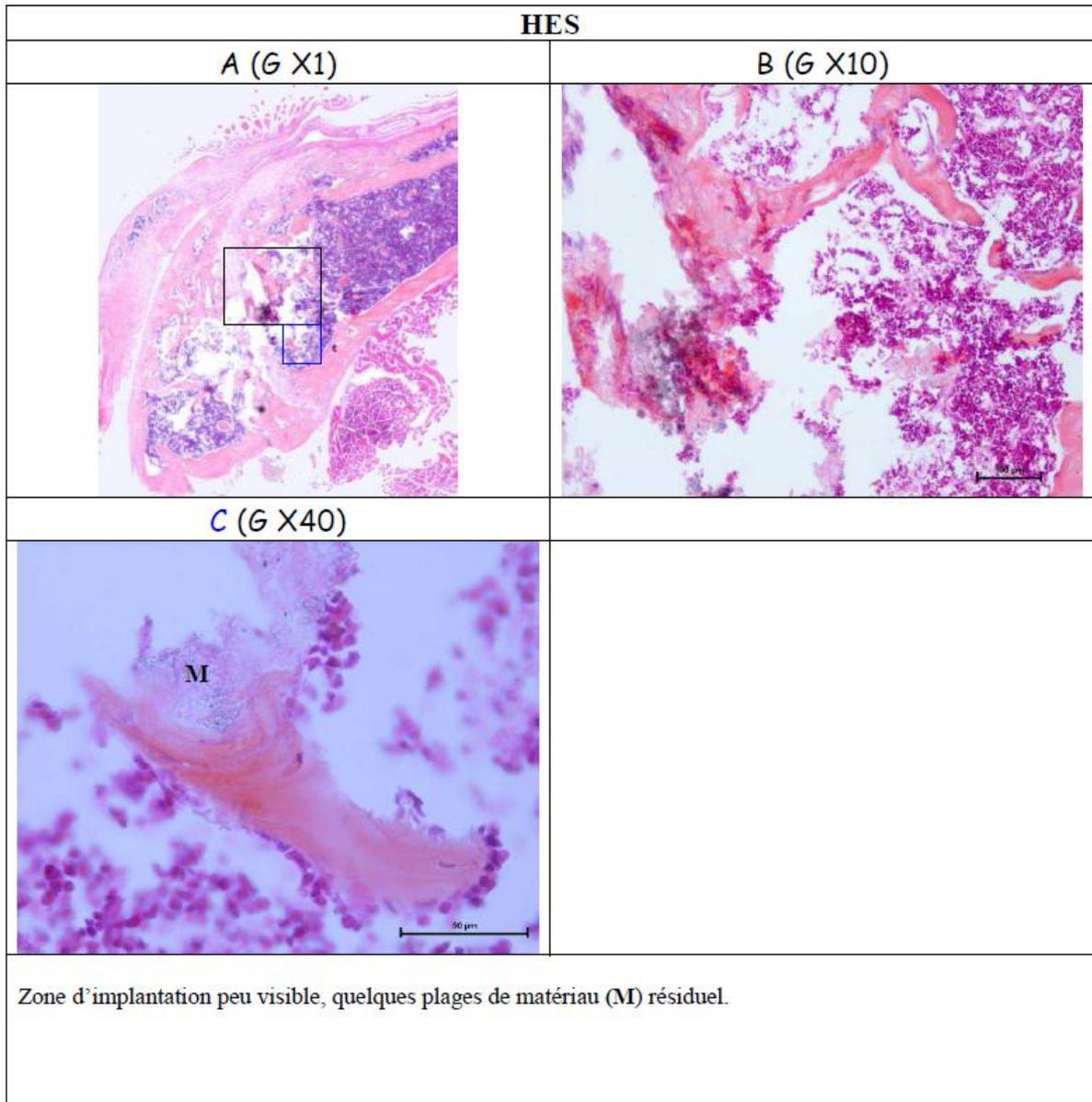
La coloration de Von Kossa laisse apparaître également de nombreuses zones de néoformation osseuse et confirme les résultats acquis par les colorations précédentes.

Histologie décalcifiée.



**Figure 140 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 28<sup>ème</sup> jour (1/2).**

Seules quelques zones de matériau dense peuvent être retrouvées en surface de la zone d'implantation à proximité d'un tissu de granulation et en regard de petites trabéculations osseuses néoformées.



**Figure 141 : Histologie descriptive : Echantillon HA5 observé en microscopie optique après déminéralisation et coloration à l'HES au 28<sup>ème</sup> jour (2/2).**

Plus en profondeur, la majorité des coupes révèlent une bonne intégration du matériau avec quelques petites plages de matériau résiduel bien intégré au sein d'un os en remaniement.

#### **7.4.3.4. Conclusions à 28 jours:**

##### **Echantillons témoins.**

Les coupes des fémurs témoins montrent une zone d'implantation comblée par un bouchon charnu, et présence de néoformation osseuse en périphérie de la lésion.

##### **Implants HA.**

Il a été observé une importante formation osseuse pour deux des implants sur les cinq. Trois présentent une faible néoformation osseuse à leur contact. L'os néoformé au contact du matériau est histologiquement sain, en cours de remaniement et de minéralisation. On observe une résorption du matériau comparé au temps J15.

##### **Implants HA5.**

Observation d'une importante néoformation osseuse de la périphérie vers le centre de la lésion pour trois implants et plus modeste les trois autres. L'os néoformé au contact du matériau est histologiquement sain, en cours de remaniement et de minéralisation. On observe une nette résorption du matériau comparé au temps J15. Seules quelques plages de matériau résiduel ont pu être observées au sein d'un os néoformé lors des études après déminéralisation.

## **DISCUSSION**

# 1. Prolifération induite et toxicité du chlorure de strontium : Détermination de la concentration efficace en $\text{Sr}^{2+}$ .

Les études de prolifération et de viabilité ont révélé des résultats équivalents au sein de nos 2 modèles d'études (MG-63 et cellules primaires) : tous deux ont montré une plage d'intérêt située entre  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$  M/L avec un maximum de chevauchement situé à  $5 \times 10^{-5}$  M/L avec une zone toxique située à partir de  $10^{-2}$  M/L. Cette concentration a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude suite à l'intérêt porté par ce chevauchement d'activité dans le temps pour notre étude mais également suite à sa conformité avec les données acquises de la science sur d'autres modèles cellulaires. En effet, Cannalis *et al.* (1996) ont démontré une efficacité du strontium sur des cultures de calvaria de rat pour des concentrations comprises entre  $10^{-3}$  M/L et  $10^{-5}$  M/L avec un effet maximal sur la synthèse matricielle pour des concentrations de  $5 \times 10^{-4}$  et  $10^{-3}$  M/L. Plus tard, Verbeckmoes *et al.* (2003) démontrèrent toujours sur le modèle de cellules issues de rats, l'importance de la concentration en ions  $\text{Sr}^{2+}$  : de 2,3 à  $5,7 \times 10^{-5}$  mol/L : les ostéoblastes conservent leur capacité à induire la formation de nodules de minéralisation normaux alors que, pour des concentrations plus importantes (jusqu'à  $10^{-3}$  M), les ostéoblastes montraient des difficultés à minéraliser correctement leur milieu. Un effet inhibiteur du strontium sur la formation de la maille d'hydroxyapatite a été suggéré. Plus récemment, Bracci *et al.* (2009) ont montré, dans un modèle de culture de MG-63 sur des revêtements de phosphates de calcium, l'efficacité des concentrations situées entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  M sur la prolifération et la synthèse de collagène de type I de ces cellules. La même année, Brennan *et al.* (2009) réalisèrent le même type d'étude sur des cellules issues de fragments d'os de fœtus humains placés en culture et retrouva encore cette même zone d'intérêt ( $2 \times 10^{-5}$  à  $4 \times 10^{-3}$  M). Aucun de ces auteurs n'a publié de résultats concernant les doses supérieures très certainement suite à la toxicité induite par le strontium dans cette gamme de concentration. De par ces constatations, il nous est apparu intéressant d'étudier l'effet de cette concentration sur d'autres aspects de la physiologie de l'ostéoblaste mais il est important de noter que cette concentration n'est peut être pas la plus efficace au niveau d'autres aspects de la physiologie ostéoblastique. Par ailleurs, il est intéressant de constater que certaines faibles concentrations ( $10^{-9}$  M/L à 7 jours et  $10^{-10}$  M/L à 21 jours) ont entraîné une augmentation de la prolifération des cellules MG-63 en culture que nous n'avons jamais retrouvée au sein de la littérature.

## **2. Dissolution de la poudre HA5.**

Les études de dissolution de la poudre HA5 ont révélé une libération rapide du strontium incorporé lors de la synthèse de cette poudre (maximum atteint en 2 jours). Dans les conditions de notre étude (sans renouvellement du milieu de culture et sans cellules), le relargage maximal de strontium dans le milieu de culture a été de  $2,23 \times 10^{-5}$  M/L pour les poudres les plus substituées en notre possession au début de cette étude (HA5). Au-delà de ces 2 jours, cette concentration diminue pour devenir indétectable au delà de 10 jours signant une éventuelle reprécipitation au sein des boîtes de culture. Xue *et al.* (2006) ont montré que les surfaces de céramiques de phosphate de calcium dopées en strontium avaient une forte capacité d'induction de précipitation d'hydroxyapatite à leur surface. Il est intéressant de noter qu'il en est de même pour le calcium qui connaît un pic de faible intensité à 2 jours puis passe rapidement sous le seuil de détection. La concentration obtenue par la mise en place de la poudre HA5 au sein des milieux de culture étant très proche de la concentration optimale déterminée précédemment, nous avons sélectionné cette dernière pour la suite de l'étude. Néanmoins, il est important de noter que les concentrations situées au contact du matériau peuvent être beaucoup plus importantes.

## **3. Effet des poudres HA et HA5 sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec la concentration d'effet maximal.**

La poudre HA n'a pas entraîné de modification significative de la prolifération et de la viabilité du modèle de culture employé: les résultats obtenus ont été proches des résultats obtenus sur plastique seul. Pour autant, aucune altération des capacités prolifératives du modèle n'a pu être remarquée. Ce résultat était attendu : ces poudres ayant été élaborées avec des formes quelconques de façon à éviter toute toxicité de ces dernières quant à leur morphologie et à leur taille (Laquerrière *et al.* 2003). La poudre HA5 a révélé des capacités à induire une augmentation de la prolifération cellulaire au sein du modèle de façon proche voire supérieure à celle induite par la supplémentation en chlorure de strontium des milieux de culture. Ce résultat est conforme aux capacités de relargage du strontium des poudres mais ne peut être complètement attribué au strontium. En effet, l'incorporation du strontium au sein des poudres modifie de nombreux paramètres physico-chimiques de ces dernières telles que la composition cristalline ainsi que l'énergie de surface de ce biomatériau. Or, ces paramètres ont montré des capacités de modification de la prolifération cellulaire ostéoblastique. En effet,

Grimandi *et al.* (1998) ont démontré qu'une faible variation des proportions des différentes phases au sein de phosphates de calcium biphasiques utilisés en ciment injectable pouvait faire varier les capacités prolifératives d'ostéoblastes en culture. Des études plus récentes (Kumar *et al.* 2010 et Xiong *et al.* 2010) ont également montré que l'énergie de surface des biomatériaux était un facteur clé permettant l'adhésion des ostéoblastes à la surface des biomatériaux et que ce facteur était prédominant sur la cristallinité ou la microdureté. Néanmoins, si l'augmentation de la prolifération ne peut être directement imputée au strontium relargué, l'incorporation du strontium lors de la conception du biomatériau a permis d'obtenir un biomatériau ayant des capacités à augmenter la croissance ostéoblastique.

#### **4. Microscopie électronique à balayage – Etude de la morphologie cellulaire.**

Aucune modification de la morphologie cellulaire n'a pu être constatée suite aux traitements par les poudres ou le chlorure de strontium. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature : Xue *et al.* (2006) n'avaient pas retrouvé de modification significative sur des OPC1 (« Osteoblasts precursor cell line 1 » – cellules issues de fœtus humain sains) et il en a été de même pour Qiu *et al.* (2006) pour des ostéoblastes immortalisés, pour Sun *et al.* (1994) et Ogata *et al.* (2005) sur des cellules MC3T3 ou pour Trombelli *et al.* (2010) sur des cellules « ostéoblast-like ». Les poudres ont révélé des capacités d'adhésion cellulaire intéressantes de par les nombreux prolongements cytoplasmiques créés par les ostéoblastes en direction de ces biomatériaux.

#### **5. Ostéogénèse : Etude de l'expression génique par PCR Arrays.**

##### **Données générales / Phénotype cellulaire**

La technique de PCR Arrays s'est révélée être une technique hautement reproductible essentiellement limitée par les niveaux d'expression des gènes au sein des modèles cellulaires. Ayant pour but d'être utilisable sur un grand nombre de variétés cellulaires voire sur des lysats tissulaires, les seuils de détection se sont révélés parfois un peu limités et les gènes étudiés un peu restreints. Malgré tout, cette technique possède l'avantage de mettre en jeu 5 contrôles internes qui ont permis de normaliser les résultats obtenus. Il est intéressant de

noter que ACTB a montré de plus fortes variations que les autres gènes contrôles. Ainsi, 31 gènes se sont révélés inexploitable en raison de courbes de fusion incorrectes ou de Ct en dehors des seuils de détection de la technique. Parmi ces gènes, il est possible de discerner des gènes normalement exprimés par d'autres lignées cellulaires : ainsi, ANXA5 (Ho *et al.* 2000), COL2A1 et COL10A1 (Robey *et al.*, 2002) sont plus spécifiques du chondroblaste, tout comme : AMELY, ENAM, AMBN et DSPP de l'odontoblaste, la DMP-1 de l'ostéocyte (Toyosawa *et al.*, 2004), CALCR de l'ostéoclaste (Lee *et al.*, 2010) et le collagène de type IV plus spécifique des cellules épithéliales (Sandberg *et al.*, 1988). Par ailleurs, d'autres gènes sont exprimés en forte quantité dans des situations physiologiques ou pathologiques particulières (TNF) : il n'est donc pas surprenant de les retrouver dans cette liste. D'autres sont normalement exprimés par les ostéoblastes mais leurs courbes de dissociation se sont révélées incorrectes ou leur niveau d'expression a été retrouvé en dehors de la fenêtre de validation de la technique. PHEX, par exemple, a été retrouvé à un niveau proche du seuil de détection : quelques échantillons ayant révélé des expressions hors de la zone de détection, l'étude du gène a été invalidée afin de ne pas induire de biais techniques dans cette partie de l'étude. Les expressions des MMP-8, MMP-9 et MMP-10 n'ont pu être détectées très certainement en raison de la faible expression de ces MMPs par les ostéoblastes comme démontré respectivement par Itagaki *et al.* 2008, Corotti *et al.* 2009 et Han *et al.* 2002. A noter, MMP-10, CSF3 n'ont jamais été détectés au sein des échantillons, les MMP-8 et -9 ainsi que BMP-3 et 5, CSF2, EGF, FGFR2, FGF3, FLT1, GDF10, TGFB2 et TGFB3 l'ont été au sein de certains mais n'ont pas montré des courbes de dissociation correctes. ITGAM a montré des courbes de dissociations ne permettant pas la validation de l'étude malgré une détection constante. STATH n'a pas montré de signal exploitable. Tous ces gènes ont donc été exclus de l'étude.

Les gènes exploitables ont permis le phénotypage de notre modèle de culture situant les cellules entre les stades de pré-ostéoblastes et d'ostéoblastes matures. L'utilisation d'un milieu non supplémenté en facteurs permettant la minéralisation du milieu ( $\beta$ -glycérophosphate, vitamines...) est vraisemblablement la cause de cet arrêt de différenciation. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'état de différenciation des cellules et il est probable qu'une hétérogénéité existe au sein d'une même boîte de culture. Cette hétérogénéité existant au sein des tissus biologiques lors de l'implantation d'un substitut osseux, ne nous est pas apparue comme un biais important de l'étude.

Nos études ont permis d'analyser l'effet de particules dopées en strontium par rapport aux effets de particules non dopées ou de la supplémentation du milieu de culture en strontium sur l'expression génique au sein de notre modèle cellulaire. Ce modèle permet d'étudier la réponse cellulaire vis-à-vis du biomatériau et de simuler l'effet d'une libération de particules relarguées lors de l'usure d'un matériau massif.

### **Poudre non substituée**

La poudre non dopée en strontium a induit, par rapport au témoin, une augmentation de l'expression de gènes codant des protéines montrées comme favorables à l'ostéointégration et la vascularisation du matériau (BMP2, BMP4, VEGFB, IGF1 ...). En effet, il a été démontré que l'expression de la BMP-2 est essentielle à la bonne cicatrisation osseuse [Wang *et al.*, 2010], la BMP-4 stimule la différenciation des cellules osseuses et permet d'augmenter la formation osseuse [Shen *et al.*, 2009]. Le VEGF a montré, en plus d'une capacité ostéogénique, une capacité à promouvoir la vascularisation [Roldan 2010]. Par ailleurs, l'utilisation de l'IGF-1 a montré, elle aussi, d'importantes capacités d'accélération de la cicatrisation osseuse [Bernstein *et al.*, 2010]. Il semble donc que la poudre non dopée permet transitoirement d'induire une augmentation de l'expression de gènes codant des facteurs favorisant l'accélération de la cicatrisation osseuse. Ces caractéristiques confèrent à ce type de biomatériau d'intéressantes propriétés lors de l'utilisation de techniques visant à obtenir une régénération osseuse. Cet effet positif des phosphates de calcium sur la physiologie osseuse a été récemment démontré [Chai *et al.*, 2010]. Les auteurs attribuent cet effet aux capacités de libérations d'ions  $Ca^{2+}$  et  $Pi$  de ces biomatériaux et à l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance qu'ils entraînent. Cette étude est d'autant plus intéressante pour nos travaux qu'elle pointe la possibilité d'induire physiologiquement une synthèse de facteurs de croissance par des ostéoblastes via une modification des composants ioniques de l'environnement des cellules. Cet aspect de modification locale de l'expression génique menant à une expression autogène de facteurs de croissance ayant une activité autocrine par modification de la physiologie cellulaire est un exemple des récentes recherches basées autour de l'ingénierie cellulaire dont Mc Arthur *et al.* (2005) ont étendu la définition à l'utilisation de modification de la physiologie d'un système dans le but d'avoir de meilleurs succès thérapeutiques.

Malgré tout, l'utilisation de la poudre non dopée a également engendré l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la résorption osseuse (MMP, CTSK) et, plus particulièrement, les MMP-1 et MMP-2 qui étaient plus exprimées mais également plus

synthétisées dans notre modèle de culture cellulaire. Ces enzymes étant impliquées lors de l'initiation des phénomènes de résorption osseuse, toute augmentation de synthèse peut se traduire par une augmentation du turn-over osseux et une modification de la balance osseuse. Cette initiation, entièrement dévolue aux ostéoblastes, permet la préparation des surfaces osseuses à résorber par une lyse des substances organiques la composant laissant une surface minérale nécessaire et suffisante à la fixation et à l'induction des cellules spécialisées dans la résorption osseuse. La cathepsine K, qui à récemment été décrite comme faisant partie des enzymes protéolytiques synthétisées par les ostéoblastes [Mandelin *et al.*, 2006], possède une forte activité catalytique sur le collagène et pourrait donc également être impliquée dans le contrôle et la mécanistique du remodelage osseux. Son inhibition est récemment devenue un axe de recherche dans le traitement de l'ostéoporose [Black, 2010].

Il est important de noter que l'expression des gènes codant le collagène de type I, principal composant de la matrice protéique osseuse, ainsi que ceux codant la serpine H1, sa chaperonne, n'ont pas montré de modifications significatives. Il en a été de même concernant l'étude de TIMP-1 et TIMP-2, inhibiteurs des MMP-1 et MMP-2.

Ce matériau a également induit une diminution de certains gènes pouvant être impliqués dans la revascularisation des zones lésées (VEGFA). En effet, VEGFA code le « Vascular Endothelial growth factor A » qui est un facteur de croissance important pour la formation des vaisseaux sanguins lors du développement, lors de situations pathologiques ou lors des phases de cicatrisation. Au contraire, VEGFB, qui lui code le « Vascular Endothelial growth factor B », jouerait un rôle dans le maintien des vaisseaux néoformés lors de processus pathologiques ou de cicatrisation. [Zhang F *et al.*, 2009]. Par ailleurs, la poudre HA a également diminué l'expression de gènes impliqués dans les phénomènes d'ossification ou cicatrisation (IGF-2, FGF-1, ...) [Chen *et al.*, 2010 ; Haque *et al.*, 2007].

Cette modification de la balance osseuse peut représenter un facteur délétère de l'ostéointégration. En effet, l'effet recherché dans le cadre d'une ostéointégration est la croissance rapide de tissus biologiques sains au contact du biomatériau. Or ici, le biomatériau employé induit la sécrétion de facteurs aptes à résorber la matrice osseuse néoformée ou à initier la dégradation osseuse malgré une expression de facteurs de croissance ostéoformateurs.

### **Poudre substituée en strontium.**

Le dopage par le strontium a permis d'obtenir un profil d'expression génique et de synthèse protéique différent. En effet, l'expression des gènes codant certaines molécules de la matrice extracellulaire a été amplifiée. Ainsi, l'expression des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type I

est augmentée lors de l'utilisation du strontium. Ces résultats sont concordants avec les résultats publiés dans la littérature scientifique au niveau de cellules animales ou transformées (Marie *et al.* 2005 ; Sila-Asna *et al.* 2007 ; Cappucini *et al.* 2008 et 2009). Notre étude a également démontré une augmentation de l'expression de la SERPINH1 (connue pour être la chaperonne du collagène de type I) qui n'a jamais été démontrée. Cette augmentation de l'expression du collagène de type I par les ostéoblastes pourrait permettre d'expliquer la diminution de la résorption osseuse induite par le strontium. D'autre part, les effets décrits précédemment sur l'expression et la synthèse des métalloprotéases matricielles de la poudre non dopée n'ont pas été retrouvés lors des études réalisées sur la poudre dopée. Les résultats se retrouvent proches des niveaux constatés sur les échantillons témoins. Le dopage par le strontium a donc permis de contrebalancer un effet considéré ici délétère de la poudre non dopée. Cet effet du dopage par le strontium sur les ostéoblastes humains est peu documenté. Seule une étude sur l'effet du strontium menée sur des chondroblastes humains a démontré une diminution de la production de MMP (stromélysine (MMP-3)) [Henrotin *et al.*, 2001] et un effet comparable a été démontré d'un site anatomique différent (testicules de rats traités par le strontium fructose 1,6-diphosphate) [Zhang *et al.*, 2009]. Or, ces enzymes jouent un rôle primordial dans la mise en place de la résorption dans le cycle de remaniement osseux. Ces collagénases sécrétées par les cellules bordantes permettent la dégradation de la matrice collagénique osseuse et donc la mise à nu de la phase minérale de l'os nécessaire à la fixation et à l'activation des cellules circulantes (futurs ostéoclastes). Parfitt *et al.* 1996 ont montré que toute présence de matériel organique en surface de l'os avait la capacité d'inhiber la fixation des cellules clastiques et inhibait donc la dégradation osseuse. Par ailleurs, Chambers et Fuller (1985) ont démontré qu'un traitement par collagénases était nécessaire à cette fixation et que ce rôle était strictement dévolu aux cellules ostéoblastiques. Il en résulte que l'inhibition des MMPs et l'augmentation des capacités de synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes décrites lors des expériences précédentes via les traitements strontiques doit contribuer aux effets constatés au niveau clinique. Il en résulte que le traitement strontique pourrait être intéressant dans le cadre de traitements de maladies liées à la persistance d'un déséquilibre de la balance osseuse (ostéoporose, parodontite...). Les matériaux strontiés pourraient également intervenir au sein de ces patients et avoir des résultats intéressants sur le plan de l'amélioration des thérapeutiques de prises en charge de ce genre de pathologie.

Par ailleurs, la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type V était également surexprimée au sein des échantillons au contact du strontium. Ce collagène est connu pour être synthétisé lors des phénomènes de cicatrisation et lors du développement mais son mode d'action demeure

inconnu: de récentes études montrent des capacités de ce collagène à inhiber l'adhésion des fibroblastes aux tissus mous (Breuls *et al.*, 2009). D'autres études réalisées au sein d'un modèle de cicatrisation parodontal ont montré une augmentation de la contraction des gels de collagène de type I supplémentés en collagène de type V mis au contact de fibroblastes parodontaux. (Berendsen *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été démontré que ce collagène était régulé par le TGF- $\beta$  au sein des ostéoblastes (MC3T3) dans le sens d'une augmentation de synthèse (Kahai *et al.*, 2004). Or, nos résultats ont montré une augmentation de l'expression des récepteurs au TGF- $\beta$  (TGFBR1 et TGFBR2) et de gènes codant des protéines impliquées dans la transduction de ce signal (SMAD3).

Plus généralement, les gènes codant des protéines intervenant dans l'ossification ont montré de discrètes variations d'expression tels que CDH11 et de MINPP1 qui n'ont pu être reliées à l'effet d'un traitement. De façon plus intéressante, TFIP11 a montré des modifications d'expression semblables au cours des trois traitements. Cette protéine est peu connue et peu décrite. Les connaissances acquises de la science placent cette protéine au niveau du spliceosome et Chi *et al.* (2000) lui ont donné des caractéristiques de parallélisme entre son expression et l'expression globale des gènes de la cellule. Cette protéine a été montrée essentielle pour la survie cellulaire. Il est important de noter que la base de données UNIPROT référence ce gène avec une fonction au niveau de la différenciation des améloblastes et des odontoblastes. De par la proximité développementale des odontoblastes et des ostéoblastes, une fonction au niveau de la différenciation ostéoblastique peut également être suspectée. D'autre part, cette modification d'expression peut également s'expliquer par une modification du profil de l'expression génique de la cellule : une phase de diminution de cette expression peut ainsi être suspectée aux temps courts de l'étude alors que les cellules sont en pleine prolifération, pour être suivie aux temps plus longs, d'une phase d'augmentation. Cette hypothèse peut être légèrement appuyée par la faible diminution de l'expression de l'ostéocalcine observée au temps le plus court.

Les gènes codant les facteurs de croissance et leurs récepteurs ont montré des résultats assez disparates. Il est possible de noter une augmentation de l'expression de la BMP-1 pour les traitements strontiés. Une modification du profil d'expression de la BMP-2 peut être notée vers l'augmentation mais la disparité des résultats ne permet pas de conclure précisément à ce sujet. Au temps le plus court, une diminution de l'expression du FGF1 dans nos trois conditions testées a été remarquée. L'expression de l'IGF-1 a montré une modification semblable lors de l'utilisation des poudres dopée et non dopées consistant en une diminution

suivie d'une forte amplification de cette expression génique. L'IGF-1 ayant été montrée comme ostéogénique, elle est également connue pour exercer un rôle autocrine au niveau des ostéoblastes (Canalis *et al.* 2009).

Enfin, des modifications intéressantes de l'expression du VEGFB peuvent être également remarquées au sein des échantillons strontiés. Il est intéressant de noter que toutes les modifications d'expression induites au sein des échantillons ayant été au contact du strontium vont dans le sens de l'ostéoformation.

L'expression des gènes codant des facteurs de transcription et leurs régulateurs montrent un effet biphasique comparable pour tous les traitements avec une sous-expression au 7<sup>ème</sup> jour suivie d'une surexpression au 14<sup>ème</sup> jour. La sous expression de ce gène a été impliquée avec la différenciation terminale des cellules souches mésenchymateuses vers la voie des cellules musculaires (Houzelstein *et al.*, 1999) ou cartilagineuses (Coelho *et al.*, 1993 et Mina *et al.*, 1995). De ce fait, MSX1 a été décrit comme prévenant ces différenciations terminales et comme ayant la capacité de maintenir la prolifération cellulaire (Blin-Wakkac *et al.*, 2009). D'autre part, conformément aux résultats de la littérature (Marie *et al.*, 2005, Sila-Asna *et al.*, 2007, Cappucini *et al.*, 2008 et 2009), RUNX2 est augmenté aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours lors du traitement au chlorure de strontium. Etonnamment, cette augmentation n'a pas été constatée pour les échantillons traités par la poudre strontiée alors qu'elle était attendue. Néanmoins, les conditions de culture ne présentant pas les facteurs induisant la différenciation de notre modèle cellulaire peuvent être une hypothèse plausible d'explication de cette absence d'augmentation de RUNX2.

## 6. Ostéoimmunologie : Etude des témoins.

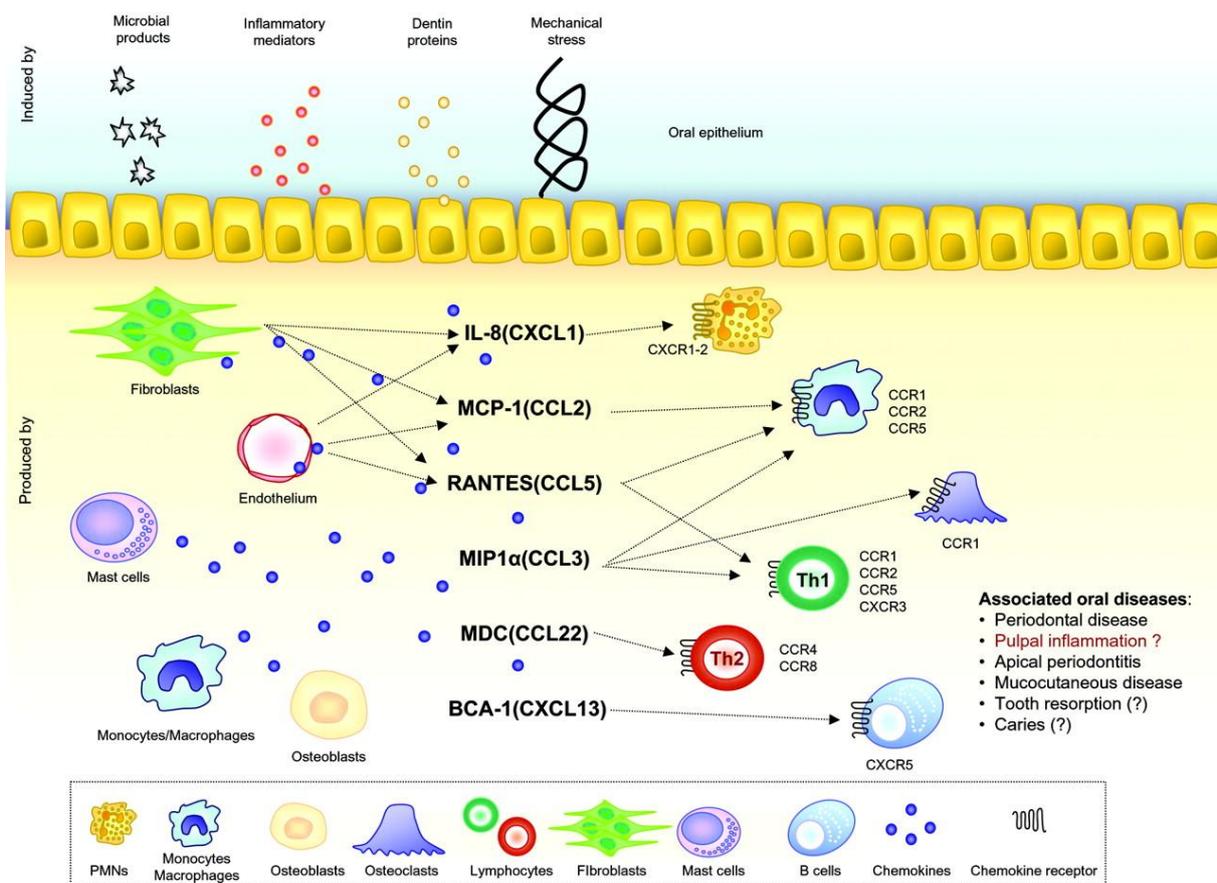
Les résultats obtenus par PCR Arrays permettent de conclure à l'expression de nombreuses cytokines et de nombreux récepteurs de ces cytokines (figure 142).

Cytokines exprimées					Facteurs de croissances	
CXCL	CCL		CCR	IL	ILR	
1 - GROa	2 - MCP1	17 - TARC	CCR1	IL1a	IL1R1	TGFB1
2 - GROb	5 - RANTES	19 - MIP3b	CCR6	IL1F5	IL8RA	EGF
5 - ENA78	7 - MCP3	20 - MIP3a	CCR7	IL3	IL10RB	IGF-1
8 - GCP2	8 - MCP2	24 - EOTAXIN2	CCR9	IL5	IL13RA1	VEGF
12 - SDF1	11 - EOTAXIN	26 - EOTAXIN3		IL6		
13 - BCA1	13 - MCP4			IL7		
				IL8		

Figure 142 : Cytokines et leurs récepteurs exprimés et facteurs de croissance détectés sur les échantillons témoins. Les éléments en noir représentent les éléments détectés uniquement en PCR Arrays, les éléments en bleu représentent les éléments détectés en cytokines arrays, les éléments en rouge représentent les éléments détectés par les 2 techniques et les éléments soulignés représentent les éléments détectés en PCR Arrays et non détectés en cytokine arrays.

Il est important de noter que cette liste n'est pas exhaustive : elle regroupe les cytokines étudiées par les deux techniques mais ne comprend pas l'intégralité du répertoire cytokinique. Une absence ne signifie pas une absence d'expression ou de synthèse mais peut être due à l'absence de cette cytokine du répertoire d'étude des techniques. Par ailleurs, les cellules n'ayant pas été stimulées, les taux d'expression et de synthèse se sont révélés très faibles. D'autre part, les cellules étant relativement spécialisées dans la synthèse d'autres molécules plus spécifiques de l'ostéogenèse, les études en PCR Arrays ont pu être biaisées par la faible proportion de présence des ARN messagers codant les cytokines et donc la faible proportion des ADN complémentaires présents dans le mix au cours de la réaction PCR. Il en résulte la possibilité d'avoir des cytokines dont l'expression peut être « camouflée » par l'application d'un seuil de détection trop important mais fixé par la validation de la technique. Par ailleurs, la technique de cytokines arrays s'est révélée difficile à mettre en place du fait de la grande différence de concentrations des cytokines au sein des milieux de culture : le signal de certaines ayant une forte concentration pouvant brouiller le signal, d'autres ayant une faible expression située trop à proximité. Il en résulte l'obligation d'appliquer un seuillage très fort pouvant gommer les signaux de faible intensité. Malgré ces biais techniques inhérents aux technologies employées, les cellules primaires issues d'explants révèlent une grande panoplie d'expression et de synthèse de cytokines. Ce constat replace bien cette cellule au cœur de l'ostéoimmunologie et de la complexité de la physiologie osseuse. Les données de la littérature corroborent ce fait. Koyama *et al.*, (2008) ont retrouvé l'IL1- $\beta$ , l'IL1R, l'IL-6, l'IL6R, l'IL-8 et l'IL8R, l'IL-11 et le TNF au sein de cultures de cellules SAOS2. Ruddy *et al.* (2004) ont

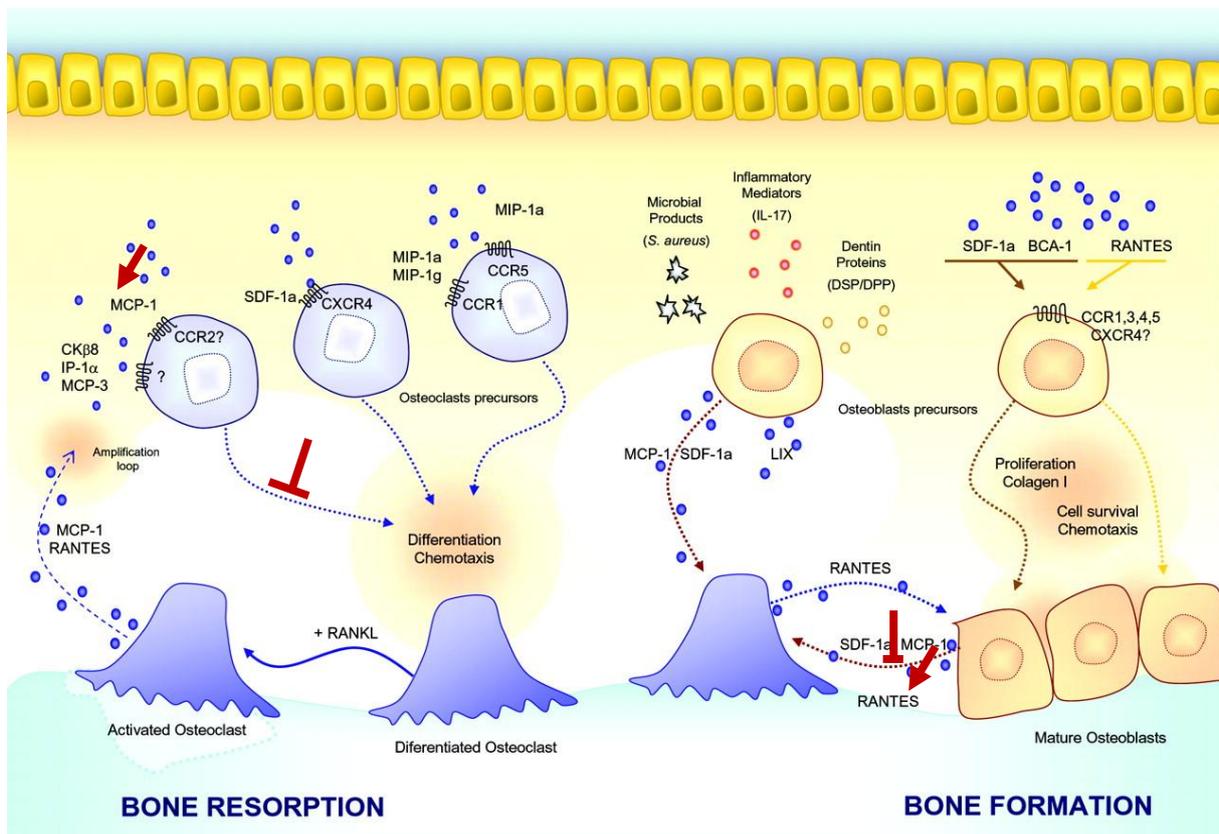
démontré au sein du modèle MC3T3 une synthèse de GRO- $\alpha$ , de MCP-1, d'IL8, de RANTES et de BCL-1 que Lisignoli *et al.* (2002, 2004) ont retrouvé au sein de biopsies osseuses de patients arthritiques. Par ailleurs, la sécrétion de ces cytokines n'est pas représentative d'un état différencié : Penolazzi *et al.* (2008) ont également décrit l'IL-8, la MCP-1 et le VEGF comme synthétisés par les progéniteurs ostéoblastiques issus de cordons ombilicaux. Les affections faisant suite à une dérégulation des processus inflammatoires ou à des inflammations chroniques aboutissant à des destructions osseuses trop souvent irréversibles étant des pathologies courantes en odontologie, une revue de ces facteurs et de leurs implications dans ces pathologies orales a été réalisée par Silva *et al.* en 2007.



**Figure 143 : Implication des cytokines dans les pathologies orales : Rôles prépondérants de l'IL-8, la MCP-1, RANTES, MIP1 $\alpha$ , MDC et BCA-1 d'après Silva *et al.* (2007).**

Il apparait clair que les cytokines synthétisées par les cellules de notre modèle de culture sont les cytokines centrales impliquées dans les pathologies orales. La lignée ostéoblastique a donc la capacité de réguler ou déréguler ces processus physiopathologiques. Par ailleurs, Silva *et al.* (2007) décrivent également une implication centrale de ces mêmes cytokines au sein du modèle de remaniement osseux. Il apparait clairement une forte implication de ces dernières dans la régulation des phénomènes de résorption/apposition avec des effets semblant prendre

place à toutes les étapes : de l'activation à la phase de néo-synthèse osseuse. Nos résultats ont montré un fort effet de la poudre HA sur la synthèse de la MCP-1. Cet effet n'a pas été retrouvé pour les poudres HA5. Le strontium a donc permis de retrouver le niveau normal de synthèse de MCP-1.



**Figure 144 : Représentation de l'implication des cytokines au sein des phénomènes de remaniements osseux modifié d'après Silva (2007). Les flèches rouges signifient une diminution de synthèse et les barres rouges une réduction de la voie d'activation.**

L'autre cytokine étudiée (*GRO-α*) fait le lien entre les cellules osseuses et le système immunitaire (neutrophiles et basophiles) mais a récemment été démontrée comme ayant des propriétés chimiotactiques envers les précurseurs ostéoblastiques (Onan *et al.*, 2009). Une limitation de la synthèse de ce facteur pourrait également avoir un effet dans le recrutement des précurseurs ostéoclastiques et expliquer une partie des effets ostéogéniques du strontium. La balance penche de nouveau vers l'ostéogénèse.

## 7. Etude *in-vivo*.

### Constats généraux

L'implantation des matériaux au sein d'un modèle de défaut osseux au sein de fémurs de souris a permis l'acquisition de données concernant l'effet *in vivo* des biomatériaux. De nombreux modèles au sein de différents animaux existent. Le modèle murin a été choisi en égard à sa facilité de mise en place, son accessibilité économique et les données déjà acquises dans la littérature. Au sein de cet animal, de nombreux modèles de lésions osseuses ont été récemment développés (Choi *et al.*, 2004 ; Wahl *et al.*, 2006). Parmi ces derniers les défauts corticaux figurent en bonne place au niveau de différentes localisation anatomiques : métaphyses fémorales, épimétaphyses fémorales, diaphyses fémorales, diaphyses tibiales (respectivement Uusitalo *et al.*, 2001 ; Campbell *et al.*, 2003 ; Cui *et al.*, 2006 et Nagashima *et al.*, 2005). Ces modèles étaient aptes à montrer l'effet de l'injection ou de l'incorporation de différents virus, cellules ou matériaux. Le modèle qui a été sélectionné pour cette étude est un modèle de création de défauts osseux au niveau de la jonction entre l'épiphyse et la métaphyse fémorale. Ce modèle présentait l'intérêt d'être bien maîtrisé par l'équipe qui nous a guidé dans la réalisation de cette étude, aussi bien au niveau technique que chirurgical et également d'être bien documenté (Montfoulet *et al* 2009, Grellier *et al* 2009). Il est important de noter que deux modifications ont été apportées à cette technique : l'anesthésie par injection d'anesthésiques injectables a été remplacée par une anesthésie gazeuse dans le but d'assurer un plus grand confort à l'animal et de réduire les risques de décès per-opératoire et le diamètre de la lacune formée a été porté à 1,2 mm de façon à éviter toute possibilité de cicatrisation spontanée des animaux. La modification de l'anesthésie a permis de minorer les complications possibles des anesthésiques injectables et a permis de ne déplorer aucune réaction indésirable per et postopératoire au sein de notre population de souris. Après implantation, l'intégralité des souris a repris une vie normale et aucun décès n'a été déploré en per ou post- opératoire. Les études *in-vivo* étant destinées à étudier le comportement *in vivo* des matériaux et à tester à la fois leur biocompatibilité et leurs capacités à conduire une régénération osseuse, il a été décidé de mener l'étude à 7, 14 et 28 jours de façon à nous placer dans les temps où les souris n'ont pas de capacités naturelles d'auto-régénération complète de ces défauts (Montfoulet *et al.*, 2009).

### **Microtomographie X : étude descriptive**

L'étude des témoins a pu démontrer la capacité de la souris à cicatriser spontanément ce genre de lésion : une repousse osseuse a été constatée du fond de la lacune vers la surface. Les vues obtenues par microtomographie X montrent une apparition puis une croissance d'un tissu d'abord moins radio-opaque que l'os environnant atteignant rapidement sa densité. Ces constats sont cohérents avec la littérature (Montfoulet *et al.*, 2009) qui montre une cicatrisation osseuse prenant la forme d'une croissance d'os spongieux à partir de tissu osseux présent dans les profondeurs de la lésion qui mature ensuite jusqu'à 56 jours après implantation pour former un os plus organisé. Parallèlement, ces mêmes auteurs ont montré qu'il était possible de détecter la formation d'une néocorticale qui évolue par condensation de l'os spongieux de surface et n'apparaît mature qu'à des temps plus longs avoisinant les 90 jours post-implantation. Il est intéressant de remarquer que lors de la réalisation de cette étude, l'auteur a décrit une réparation osseuse beaucoup moins efficace lorsque la corticale opposée à l'orifice d'entrée de la fraise était perforée : ces résultats sont proches de ceux connus en chirurgie parodontale où les défauts osseux comportant trois parois présentent des capacités de cicatrisation supérieures aux défauts ne possédant que deux parois.

Avant de conduire l'étude des matériaux au sein des organismes vivants, une étude *in vitro* des matériaux après hydratation a été menée. Les matériaux hydratés montrent une différence radio-morphologique qui a été retrouvée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* : la poudre HA semblant former des amas radio-denses alors que le poudre HA5 semble conserver son aspect particulaire. Ces différences de comportement radiologique peuvent nous mener à l'hypothèse d'un comportement biologique différent tout en gardant à l'esprit que ces vues ne sont que des représentations de la radio-opacité des poudres. Cet aspect, qui semble caractériser les poudres d'HA pures lors de leur utilisation en milieu biologique, a déjà été mis en évidence. (Kochi *et al.*, 2010).

L'étude qualitative *in-vivo* des poudres en microtomographie X laisse suggère un comportement conforme aux données attendues pour la poudre HA : biocompatibilité (capacité de contact direct avec les tissus environnants), ostéoconduction (capacité à supporter et diriger la croissance osseuse), absence de toxicité (aussi bien sur le plan général que local), et capacités à ne pas induire de réaction inflammatoire ou immunologique trop importante (Murugan *et al.*, 2004). La poudre HA5 a montré des capacités équivalentes mais laisse apparaître une résorbabilité plus importante avec des images de diminution de radio opacité sur le pourtour de la lésion ainsi qu'une ostéoconduction plus intense en comparaison de celle

observée pour la poudre non strontiée. La plus forte teneur en TCP de ce matériau pourrait permettre d'expliquer ce phénomène.

L'intégralité des échantillons a présenté une diffusion de matériau vers l'espace articulaire en raison d'une technique chirurgicale peut être mal adaptée aux poudres non cohésives utilisées : la comparaison des techniques chirurgicales n'étant pas le sujet de cette thèse, ces concepts ne seront pas discutés mais il est raisonnable de penser qu'une technique chirurgicale plus adaptée faisant intervenir des membranes permettraient de limiter cette diffusion.

### **Microtomographie X : étude quantitative**

Au vu de ces résultats prometteurs, une étude quantitative a été réalisée à partir des matrices tridimensionnelles acquises en microtomographie X. L'utilisation de poudres minéralisées au sein du modèle d'étude murin a posé de nombreux problèmes de segmentation suite à la faible différence de radio-opacité entre les matériaux et l'os environnant (tous deux constitués majoritairement d'hydroxyapatite). Il en résulte que l'emploi de ce modèle serait plus aisé dans le cadre de matériaux non radio-opaques de type biomatrices ou, au contraire, dans le cadre de matériaux beaucoup plus radio-opaques. La segmentation précise des biomatériaux n'ayant pas été possible et une étude préliminaire laissant apparaître un fort biais de segmentation si cette dernière était réalisée par un opérateur, il a été décidé de réaliser des études dans des zones reproductibles par l'utilisation de critères anatomiques.

Ainsi 3 zones d'intérêts ont été définies :

La première représente une zone de tissu osseux proche du site de fraisage. Elle permet d'estimer si des modifications de ces tissus interviennent lors de la réparation de ces défauts osseux en présence ou non de biomatériaux. Les valeurs inférieures des paramètres signant la minéralisation de la corticale (BMD et BMC) ainsi que des paramètres médullaires (BMD, BMC, TMC, TMD, BVF) révèlent une minéralisation inférieure des zones corticale et médullaire au temps le plus court de l'étude au sein des échantillons témoins par rapport aux échantillons traités. Par ailleurs, le nombre de trabéculations (Tb/N) étant également inférieur et l'apparition d'une différence au sein d'un des facteurs d'étude de l'anisotropie ( $a_1/a_2$ ), il est possible de penser que l'absence d'apport de calcium nécessaire au remaniement de la lésion osseuse au sein des échantillons témoins entraîne une utilisation des stocks calciques de l'os juxta-lésionnel dans les premiers temps de la cicatrisation. Néanmoins, il est important de noter que, de par la faiblesse du nombre d'échantillon, l'analyse statistique n'a très certainement pas permis de conclure quant à des différences qui peuvent exister tout de même au sein de la population. Un échantillonnage plus important ainsi qu'une étude comportant

des fémurs non traités pourrait nous permettre afin de pouvoir statuer sur l'existence ou non d'une différence par rapport à des échantillons non traités.

La seconde zone d'étude quantitative a permis de mettre en évidence une différence de comportement des poudres vis-à-vis de l'hôte : les poudres HA5 ont entraîné une diminution du diamètre apparent des lésions osseuses résiduelles plus nette et plus rapide que les poudres HA. Il est important de souligner que cette diminution a été accompagnée de la reformation de structures radio-anatomiquement proches de l'os normal. Ces différences peuvent s'expliquer à la fois par la plus forte dissolubilité de la poudre HA5 conférée par sa phase whitlockite plus présente mais également par l'effet local du strontium sur les tissus osseux sains permettant une repousse osseuse plus rapide et plus intense.

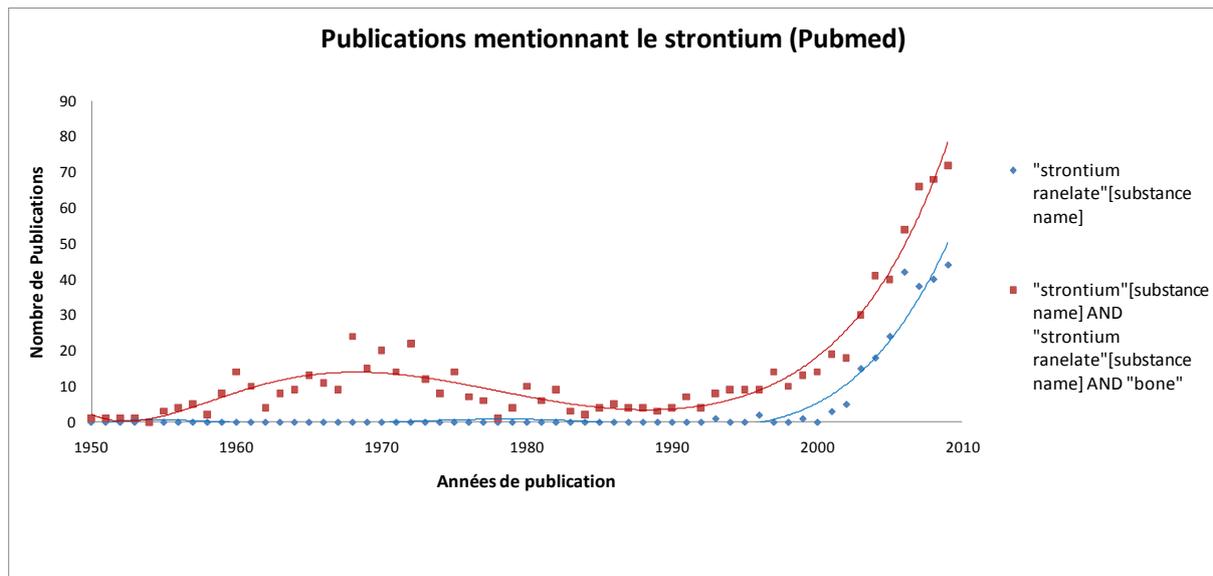
Enfin, la troisième zone d'étude a permis de montrer une différence de comportement intrinsèque du matériau strontié : les paramètres 'volume of bone' représentant le volume du matériau résiduel, BMC et BV/TV montrent, pour la poudre HA5, des valeurs inférieures à celles obtenues lors des études sur le matériau non strontié : il en résulte une plus grande résorbabilité de ce matériau très certainement due à la différence de composition entre les phases composant le matériau (Renaudin *et al.*, 2008). Ce phénomène a déjà été décrit pour des bioverres dopés en strontium (Murphy *et al.*, 2010) suggérant l'implication du strontium. Il est intéressant de noter que la poudre HA5, de par sa plus grande résorbabilité et ses capacités de libération de strontium, permet une cicatrisation osseuse augmentée dans un temps donné. L'utilisation d'un matériau phosphocalcique permet par ailleurs de ne pas mobiliser les stocks calciques de l'organisme et donc de conserver l'intégrité calcique de l'os environnant. Des études comparables sur des céramiques silico-calciques dopées par le strontium apportent des conclusions similaires (Zreiqat *et al.*, 2010).

### **Etude histologique :**

La cicatrisation des lacunes s'est révélée conforme aux données publiées sur le modèle : l'os fémoral s'est reconstruit progressivement à partir des trabéculations les plus profondes mises à nu lors de la phase chirurgicale. Il est important de noter que cette zone comporte de nombreux espaces médullaires riches en tissu myéloïde et en cellules souches. L'os néoformé montre de nombreuses zones de remaniements, signes de l'évolution de la cicatrisation (Montfoulet *et al.*, 2009).

**CONCLUSION  
ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse s'inscrit dans la recherche de biomatériaux innovants. L'intérêt du dopage de phosphates de calcium par le strontium a été évalué. Il nous a permis d'investiguer l'effet que peut conférer cet élément chimique à un matériau sur les tissus de l'organisme et notamment le tissu osseux. Une étude de la bibliographie montre que la recherche de l'effet biologique du strontium est en plein essor et est réalisée en parallèle du développement des études sur le ranélate de strontium (figure 145).



**Figure 145 : Etude de la bibliographie du strontium depuis 1950 (date de première publication conjointe des termes « strontium » et « bone » dans la base de donnée Medline®) jusqu'à nos jours.**

Nos résultats nous ont tout d'abord permis d'étudier la réponse de cultures primaires d'ostéoblastes humains lors de leur contact avec des particules d'hydroxyapatite et la modulation de cette réponse par le strontium. Une modification de la balance osseuse ostéoblastique vers un métabolisme prolifératif et ostéoformateur a été mise en évidence. Il a été également démontré la capacité de poudres composées de phosphates de calcium dopés en strontium à libérer cet ion dans leur environnement proche. Si les voies métaboliques mises en jeu lors de l'utilisation du strontium et plus particulièrement du ranélate de strontium commencent à être découvertes, il demeure que le nombre d'études démontrant ces voies restent faible. Cependant, il reste à définir précisément le niveau d'action précis de la substitution en strontium dans notre modèle cellulaire. Différentes pistes sont à explorer et notamment la modification des voies mises en œuvre dans la transduction du TGF- $\beta$  et plus précisément le mode d'intervention du strontium sur les voies ERK et p38 dont on connaît la modification lors de l'utilisation de strontium (Fromigué *et al.*, 2009). Nos résultats montrent une influence des traitements à base de strontium sur la voie du TGF- $\beta$  et plus particulièrement sur l'expression des gènes codant les SMADs. Une étude quantitative de ces

modifications d'expression et de synthèse de ces protéines ainsi que l'étude de leurs phosphorylations pourrait apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'initiation des effets cellulaires du strontium sur les cellules osseuses et pourraient permettre, à la fois de remonter vers les cibles cellulaires du strontium et de mettre en évidence d'éventuelles autres voies collatérales.

Par ailleurs, il serait intéressant de conduire ces études au sein de modèles cellulaires plus ou moins différenciés afin de mieux cerner les cellules les plus « répondantes » au traitement. Il serait ainsi possible de mieux appréhender nos attitudes thérapeutiques. En effet, Les études *in vitro* ont été réalisées en l'absence de stimulation la différenciation terminale des ostéoblastes de façon à ne pas permettre la minéralisation et ainsi d'influer le moins possible sur la différenciation cellulaire. Il serait intéressant de dupliquer cette étude sur un modèle où cette différenciation aurait été induite afin de statuer sur l'effet du strontium sur des cellules totalement différenciées.

Nos études ont également révélé une modification dans la synthèse de molécules impliquées dans l'ostéo-immunologie lors de la mise en présence des ostéoblastes avec les matériaux. Le strontium a permis une modification des capacités de synthèse de cytokines du modèle cellulaire employé. Cette voie ayant été peu étudiée, une étude différentielle comparant la réaction de ces cellules vis-à-vis des différents biomatériaux couramment employés lors des chirurgies osseuses permettrait de situer la position des matériaux au sein de ceux existants. Par ailleurs, des études de chimiotactisme s'intéressant au comportement de cellules du système de défense vis-à-vis des surnageants de cultures ostéoblastiques mises en présence des matériaux. Il serait ainsi possible de démontrer l'effet du strontium sur le chimiotactisme des cellules impliquées dans la résorption des tissus minéralisés et permettrait de démontrer un nouveau processus de découplage des processus d'apposition/résorption osseuses. En vue de poursuivre nos études de modulation des processus inflammatoires, nous envisageons d'étudier l'effet de phosphates de calcium substitués par d'autres cations divalents sur les cellules inflammatoires. Notamment, le zinc nous semble particulièrement intéressant grâce à sa capacité à diminuer la réponse inflammatoire des polymorphonucléaires neutrophiles sans l'inhiber [Velard *et al*, 2010]. Des études sont d'ores et déjà été menée au sein du laboratoire concernant les effets de tels biomatériaux sur la réponse inflammatoire des PMNs et le profil protéasique des monocytes/macrophages. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune donnée concernant l'effet du strontium sur les PMNs n'est à ce jour disponible.

La substitution ionique en strontium du biomatériau a permis de mimer l'effet du strontium obtenu par supplémentation des milieux. Ce biomatériau a donc une capacité intéressante de vectorisation du strontium au niveau d'un site osseux et permet d'apporter le strontium directement au sein du site d'intérêt. Cette utilisation locale du strontium pourrait permettre une diminution des risques d'effets secondaires constatés lors de l'utilisation du ranélate de strontium (Syndrome DRESS, ...). Par ailleurs, toujours sur le plan de l'innocuité, les biomatériaux phosphocalciques développés par la méthode sol-gel présentent de nombreux intérêts : synthétiques, ils ne sont pas susceptibles d'induire des contaminations par un agent pathogène transmissible conventionnel ou non et sont aisément productibles, stérilisables, et peu coûteux à produire. Ce matériau pourrait donc avoir de nombreuses applications cliniques aussi bien en chirurgie osseuse qu'en chirurgie parodontale. En effet, en accord avec Zreiqat *et al.*, 2010, il semble que l'utilisation d'ions bioactifs permette d'optimiser un biomatériau de façon plus simple, plus durable et surtout de façon beaucoup plus économique que les approches utilisant des facteurs de croissance. Par ailleurs, l'utilisation d'ions bioactifs pourrait également renforcer les effets induits par ces composés biologiques. Les résultats des études *in vivo* sur le modèle murin nous donnent d'importants espoirs vis-à-vis de ce type de matériau. Toutefois, une confirmation des résultats sur d'autres modèles animaux permettront de vérifier l'universalité de l'effet des matériaux dopés au sein des espèces ainsi qu'au sein de différents sites anatomiques de ces organismes. Une étude sur des modèles murins céphaliques (calvaria) ou au niveau de mandibules chez le lapin pourrait nous permettre d'estimer la capacité de ces matériaux à conserver leur activité dans le cadre d'une utilisation dans la sphère oro-faciale. En effet, malgré de grandes avancées dans la prise en charge chirurgicale de nos patients, le biomatériau parfait n'existe pas. Le développement d'un matériau ayant différentes propriétés pourra permettre à l'avenir le développement de techniques de régénération osseuse adaptables au maximum au profil de nos patients sous forme d'une «individual based therapy» (Razzouk, 2010) basée sur des concepts de l'«evidence based medicine». Pour cela, la méthode de synthèse par sol-gel, de par ses capacités à synthétiser des matériaux possédant des caractéristiques physiques différentes (phases cristallines, substitutions ioniques, caractéristiques physiques...) semble être une technique d'avenir dont le développement méthodologique reste à développer. Les deux biomatériaux ont montré une excellente biocompatibilité et une excellente ostéoconduction : les critères décrits par Murugan en 2004 (biocompatibilité, ostéoconduction, absence de toxicité et d'induction de réaction inflammatoire ou immunologique excessives) ont été respectés. Tous deux ont créés des conditions locales permettant la mise en place d'une cicatrisation osseuse de bonne

qualité ainsi que la néo-formation d'un os histologiquement sain à leur contact. Cependant, des différences de comportements ont pu être observées entre ces deux biomatériaux : le matériau dopé par le strontium s'est révélé plus actif que le matériau non dopé : les coupes histologiques ont confirmé la plus grande résorbabilité de ce dernier ainsi que sa plus forte capacité à se laisser pénétrer par un système vasculaire et par le tissu myéloïde. La néoformation osseuse a donc été beaucoup plus intense lors de l'emploi de ce matériau. Les zones profondes n'ont montré que peu de matériau résiduel pour les temps long de l'étude. Pour autant, et malgré une résorbabilité améliorée, il n'a pas été constaté d'invasion conjonctive en surface de l'implant.

Ces résultats complètent donc les résultats acquis lors de l'étude cellulaire. L'incorporation de strontium au sein du matériau lui confère des propriétés ostéogéniques augmentées.

Néanmoins, les résultats de cette étude préliminaire nécessitent d'être confirmés : il serait intéressant de comparer ces résultats à ceux qu'apporteraient des matériaux communément commercialisés et employés en chirurgie osseuse et parodontale ou aux résultats obtenus lors d'autogreffes. Par ailleurs, la répétition de ces études au sein d'autres modèles animaux ou dans d'autres zones anatomiques pourrait affirmer ou infirmer le caractère universel ou non de la substitution ionique apportée au matériau. Il serait également intéressant de déterminer si le strontium a une action chimique ou physico-chimique par l'étude de la cicatrisation osseuse sous apport de strontium par voie générale. Enfin, une étude à plus long terme, permettrait d'appréhender le comportement de ces biomatériaux dans le temps et de valider la qualité de l'os néoformé.

Le chemin est encore long et de nombreuses études sont encore nécessaires.

## **REFERENCES**

ABE E, MARIANS RC, YU W.  
TSH is a negative regulator of skeletal remodelling.  
*Cell* 2003 ; **115** (2) : 151–162.

ADOLPH KW, BORNSTEIN P.  
The human thrombospondin 3 gene : Analysis of transcription initiation and an alternatively spliced transcript.  
*Mol Cell Biol Res Commun* 1999 ; 2 : 47-52.

AFSSAPS  
Protelos® : Résumé de caractéristiques du produit – Annexe 1 [Consulté le 22/05/2010].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.afssaps.fr/content/download/12828/156077/version/1/file/rcp\\_modifie\\_protelos.pdf](http://www.afssaps.fr/content/download/12828/156077/version/1/file/rcp_modifie_protelos.pdf)

ALLIOT-LICHT B, GREGOIRE M, ORLY I, MENANTEAU J.  
Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an in vitro experiment.  
*Biomaterials* 1991 ; 12(8) : 752-6.

AMIZUKA N, KARAPLIS AC, HENDERSEN JE.  
Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development.  
*Dev Biol* 1996 ; 175 (1) : 166-176.

AMMANN P, RIZZOLI R, DELOFFRE P, TSOUDEROS Y, MEYER JM, BONJOUR JP.  
Longterm administration of a high dose of the strontium salt S12911 has no toxic effect on bone biomechanics in female rats and may improve bone strength of the midshaft humerus.  
*J Bone Miner Res* 1995; 10 : 358.

ANDERSON JM, MILLER KM.  
Biomaterial biocompatibility and the macrophage.  
*Biomaterial* 1984 ; 5(1) : 5-10.

ARLOT ME, JIANG Y, GENANT HK, ZHAO J, BURT-PICHAT B, ROUX JP, et al.  
Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate.  
*J Bone Miner Res.* 2008 ; 23(2) : 215-22.

ARNETT T.  
Gallery of bone cells [consulté le 24/06/2010]  
Disponible à partir de l'URL :  
[http://www.cdb.ucl.ac.uk/research/arnett\\_lab/gallery%20bone%20cells.htm](http://www.cdb.ucl.ac.uk/research/arnett_lab/gallery%20bone%20cells.htm)

ATKINS GJ, WELLDON KJ, HALBOUT P, FINDLAY DM.  
Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response.  
*Osteoporos Int* 2009 ; 20(4) : 653-64. Epub 2008 Sep 2.

AUBIN JE, GUPTA AK, ZIRNGBL R, ROSSANT J.  
Knockout mice lacking bone sialoprotein expression have bone abnormalities.  
J Bone Miner Res 1996 ; 11(suppl. 1) : 102.

AUBIN JE.  
Bone stem cells. 25th anniversary issue: New directions and dimensions in cellular  
biochemistry.  
J.Cell.Biochem.Suppl. 1998; 73-82.

AUBIN JE, CANDELIERE GA, BONNELYE E.  
Heterogeneity of the osteoblast phenotype.  
Endocrinologist 1999; 9 : 25-31.

AUBIN JE, TRIFFITT JT.  
Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation.  
In :  
Principles of bone biology. 2nd ed.  
Dir. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A.  
San Diego: Academic Press; 2002 : 59-81.

AUBIN JE, LIU F.  
The osteoblast lineage.  
In :  
Principles of bone biology.  
Dir. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A.  
San Diego: Academic Press; 2002 : 51-67.

BANERJEE C, MCCABE L, CHOI JY, HIEBERT SW, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB.  
Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation : AML-3 is a major component  
of a bone specific complex.  
J Cell Biochem 1997 ; 66 : 1-8.

BARRY FP, BOYNTON RE, HAYNESWORTH S, MURPHY JM, ZAIA J.  
The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an  
epitope on endoglin (CD105).  
Biochem Biophys Res Commun 1999 ; 265 (1) : 134-139.

BECKER W, URIST M, BECKER BE, JACKSON W, PARRY DA, BARTOLD M, et al.  
Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts  
or allografts. 15 human case reports.  
J Periodontol 1996 ; 67(10) : 1025-33.

BELLOWS CG, AUBIN JE, HEERSCHKE JNM.  
Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone modules from  
isolated rat calvaria cells in-vitro  
Endocrinology 1987 ; 121 (6) : 1985-1992.

BELLOWS CG, AUBIN JE.  
Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in  
vitro.  
Dev Biol 1989 ; 133 : 8-13.

BENHAYOUNE H, LAQUERRIERE P, JALLOT E, PERCHET A, KILIAN L, BALOSSIÉ G, et al.

Micrometer level structural and chemical evaluation of electrodeposited calcium phosphate coatings on TA6V substrate by STEM-EDXS.

J Mater Sci Mater Med 2002 ; 13 (11) : 1057-63.

BERGLUNDH T, LINDHE J.

Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog.

Clin Oral Implants Res 1997 ; 8(2) : 117-24.

BERENDSEN AD, BRONCKERS AL, SMIT TH, WALBOOMERS XF, EVERTS V.

Collagen type V enhances matrix contraction by human periodontal ligament fibroblasts seeded in three-dimensional collagen gels.

Matrix Biol 2006 ; 25(8) : 515-22.

BERNSTEIN A, MAYR HO, HUBE R.

Can bone healing in distraction osteogenesis be accelerated by local application of IGF-1 and TGF-beta1?

J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010 ; 92(1) : 215-25.

BIANCO P, FISHER LW, YOUNG MF, TERMINE JD, ROBEY PG ;

Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues.

Calcif Tissue Int 1991 ; 49 : 421-426.

BLAIR HD, TEITELBAUM SL, GROSSO LE, LACEY DL, TAN HL, McCOURT DW, et al.

Extracellular-matrix degradation at acid-pH: Avian osteoclast acid collagenase isolation and characterization.

Biochem J 1993; 29 : 873-874.

BLIN-WAKKACH C, LEZOT F, GHOUL-MAZGAR S, HOTTON D, MONTEIRO S, TEILLAUD C, et al.

Endogenous Msx1 antisense transcript: In vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals

PNAS, 2001 ; 13 : 7336-7341.

BONNEVIER J, MALMQVIST U, SONNTAG D, SCHROETER M, NILSSON H, PFITZER G, et al.

Sustained norepinephrine contraction in the rat portal vein is lost when Ca(2+) is replaced with Sr(2+).

Am J Physiol Cell Physiol 2002 ; 282 (4) : 845-52.

BOSKEY AL, WIANS FH, JR., HAUSCHKA PV.

The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth.

Calcif Tissue Int 1985 ; 37 (1) : 57-62.

BOSSARD MJ, TOMASZEK TA, THOMPSON SK, AMAGADZIE BY, HANNING CR, JONES C, et al.

Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K: Expression, purification, activation, and substrate identification.

J Biol Chem 1996 ; 271 : 12517-12524.

- BOYCE T, EDWARDS J, SCARBOROUGH N.  
Allograft bone. The influence of processing on safety and performance.  
OrthopClin.North Am1999 ; 30 (4) : 571-81.
- BRENNAN TC, RYBCHYN MS, GREEN W, ATWA S, CONIGRAVE AD, MASON RS.  
Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate.  
Br J Pharmacol 2009 ; 157(7) : 1291-300. Epub 2009 Jun 25.
- BREULS RG, KLUMPERS DD, EVERTS V, SMIT TH.  
Collagen Type V Modulates Fibroblast Behavior Dependent on Substrate Stiffness.  
Biochem Biophys Res Commun 2009 Jan 23. [Epub ahead of print]
- BRUDER SP, HOROWITZ MC, MOSCA JD, HAYNESWORTH SE.  
Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens.  
Bone 1997 ; 21 : 223-235.
- BRUDER SP., RICALTON NS, BOYNTON RE, CONNOLY TJ, JAISWAL N, ZAIA J, et al.  
Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activate leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation.  
J Bone Miner Res 1998 ; 13 : 655-663.
- BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, et al.  
The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.  
Clin Chem 2009 ; 55(4) : 611-22.
- BUTLER WT, RITCHIE H.  
The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins.  
Int J Dev Biol 1995 ; 39 : 169-179.
- CAMPBELL TM, WONG WT, MACKIE EJ  
Establishment of a model of cortical bone repair in mice.  
Calcif Tissue Int 2003 ; 73 : 49-55
- CANALIS E, ECONOMIDES AN, GAZZERRO E.  
Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton.  
Endocr Rev 2003 ; 24 : 218-235.
- CANALIS E.  
Growth factor control of bone mass.  
J Cell Biochem 2009 ; 108(4) : 769-77.
- CANDELIERE GA., LIU F, AUBIN JE.  
Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires.  
Bone 2001; 28 (4) : 351-61.
- CAPLAN AI.  
Mesenchymal stem cells  
J orthop Res 1991 ; 9 : 641-650

CAPUCCINI C, TORRICELLI P, SIMA F, BOANINI E, RISTOSCU C, BRACCI B, et al.  
Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response.  
*Acta Biomater* 2008 ; 4(6) : 1885-93.

CAPUCCINI C, TORRICELLI P, BOANINI E, GAZZANO M, GIARDINO R, BIGI A.  
Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells.  
*J Biomed Mater Res A* 2009 ; 89(3) : 594-600.

CARRON JA, BOWLER WB, WAGSTFF SC et GALLAGHER JA.  
Expression of members of the thrombospondine family by human skeletal tissues and cultured cells.  
*Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 263 : 389-391.

CARRON JA, WALSH CA, FRASER WD, GALLAGHER JA.  
Thrombospondine promotes resorption by osteoclasts in vitro.  
*Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 213 : 1017-1025.

CENTRELLA M, MCCARTHY TL AND CANALIS E.  
Transforming growth factor-beta and remodeling of bone.  
*Journal of Bone and Joint Surgery* 1991; **73** (9) : 1418–1428.

CHAI YC, ROBERTS SJ, SCHROOTEN J, LUYTEN FP.  
Probing the Osteoinductive Effect of Calcium Phosphate by Using An In-Vitro Biomimetic Model.  
*Tissue Eng Part A*. 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]

CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T.  
Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.  
*MolCellBiochem* 2003; 253 (1-2): 269-85.

CHAMBERS TJ, FULLER K.  
Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact.  
*J Cell Sci* 1985; 76 : 155-185.

CHATTOPADHYAY N, QUINN SJ, KIFOR O, YE C, BROWN EM.  
The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation.  
*Biochem Pharmacol* 2007 ; 74(3) : 438-47.

CHENU C, DELMAS PD.  
Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human.  
*J Bone Miner Res* 1992 ; 7 (1) : 47-54.

CHERTOV O, YANG D, HOWARD OM, OPPENHEIM JJ.  
Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses.  
*Immunol Rev* 2000; 177: 68-78.

CHI H, YANG X, KINGSLEY PD, O'KEEFE RJ, PUZAS JE, ROSIER RN, et al.  
Targeted deletion of *Minpp1* provides new insight into the activity of multiple inositol polyphosphate phosphatase in vivo.  
*Mol Cell Biol* 2000 ; 20(17) : 6496-507.

CHOI P, OGILVIE C, THOMPSON Z, MICLAU T, HELMS JA .  
Cellular and molecular characterization of a murine non-union model.  
J Orthop Res 2004 ; 22 : 1100–1107.

CHRISTOFFERSEN J, CHRISTOFFERSEN MR, KOLTHOFF N, BÄRENHOLDT O.  
Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection.  
Bone 1997 ; 20 : 47-54.

COROTTI MV, ZAMBUZZI WF, PAIVA KB, MENEZES R, PINTO LC, LARA VS, et al.  
Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development.  
Arch Oral Biol 2009 ; 54(8) : 764-71.

COUJARD R ET POIRIER J.  
Les agents de résorption et les mécanismes de la destruction du tissu osseux.  
In :  
Précis d'histologie humaine.  
Ed. Coujard R, Poirier J, Racadot J.  
Paris : Masson ; 1980 : 227-228.

CUI Q, XIAO Z, LI X, SALEH KJ, BALIAN G.  
Use of genetically engineered bone-marrow stem cells to treat femoral defects: an experimental study.  
J Bone Joint Surg Am 2006 ; 88 Suppl 3 : 167–172.

CURZON ME.  
The relationship between caries prevalence and strontium concentrations in drinking water, plaque and surface enamel.  
J Dent Res 1985 ; 64 : 1286-1388.

CULLINANE DM.  
The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception.  
J Musculoskelet Neuronal Interact 2002 ; 2 : 242-244.

D'SOUZA RN, CAVENDER A, SUNAVALA G, ALVAREZ J, OHSHIMA T, KULKARNI AB et al.  
Gene expression patterns of murine dentin matrix protein I (DmpI) and dentine sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo.  
J Bone Miner Res 1997; 12 : 2040-2049.

DAGANG G, KEWEI X, YONG H.  
The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement.  
J Biomed Mater Res A 2008 ; 86(4) : 947-58.

DAHL SG, ALLAIN P, MARIE PJ, MAURAS Y, BOIVIN G, AMMANN P, et al.  
Incorporation and distribution of strontium in bone.  
Bone 2001 ; 28(4) : 446-53.

DE GROOT K.

Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of calcium phosphate ceramics.

Ann N Y Acad Sci 1988 ; 523 : 227-33.

DE GROOT K, WOLKE JGC, JANSEN JA.

State of the art : hydroxylapatite coatings for dental implants.

JOral Implant 1994 ; 20 : 232-4.

DELANY AM, AMLING M, PRIEMEL M, HOWE C, BARON R, CANALIS E.

Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice.

J Clin Invest 2000 ; 105 : 915-923.

DELMAS PD, TRACY RP, RIGGS BL, MANN KG.

Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two dimensional gel electrophoresis.

Calcif Tissue Int 1984 ; 36 : 308-316.

DOBERENZ AR, WEBER CW, REID BL.

The effect of high dietary strontium levels on bone and egg shell calcium and strontium.

Calcified Tissue Res 1969 ; 4 : 180-184.

DRIESSENS FCM.

Formation and stability of calcium phosphate in relation to the phase composition of the mineral in calcified tissue.

In :

Bioceramics of calcium phosphate

Ed. DeGroot K.

Boca Raton, Florida : CRC Press; 1983

DRISCOLL KE.

TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress.

Toxicol Lett 2000 ; 112-113 : 177-83.

DUCY P, DESBOIS C, BOYCE B, PINERO G, STORY B, DUNSTAN C, et al.

Increased bone formation in osteocalcin-deficient-mice.

Nature 1996 ; 282 (6590) : 448-452.

DE BART ACW, QUAX PHA, LOWIK CWGM, VERHEIJEN JH.

Regulation of plasminogen activation, matrix metalloproteinases and urokinase-type plasminogen activator-mediated extracellular matrix degradation in human osteosarcoma cell line MG-63 by interleukin-1 alpha.

J Bone Miner Res 1995 ; 10 : 1374-1384.

DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, RIDALL AL, KARENTY G.

Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.

Cell 1997 ; 89 : 747-754.

DUCY P, SCHINKE T, KARSENTY G.

The osteoblast : a sophisticated fibroblast under central surveillance.

Science 2000 ; 289 : 1501-1504.

DUMELIE N, BENAHYOUNE H, RICHARD D, LAURENT-MAQUIN D, BALOSSIER G.  
In vitro precipitation of electrodeposited calcium-deficient hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrate.  
Mat Charact 2008 ; 59 (2) : 129-33.

ER K, POLAT ZA, OZAN F, TAŞDEMİR T, SEZER U, SISO SH.  
Cytotoxicity analysis of strontium ranelate on cultured human periodontal ligament fibroblasts: a preliminary report.  
J Formos Med Assoc 2008 ; 107(8) : 609-15.

ERICKSEN EF, GUNDERSEN HJG, MELSEN F, MOSEKILDE L.  
Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition.  
Metab Bone Dis Rel Res 1984 ; 5 : 243-252.

FALLA N, VAN VLASSALER P, BIERKENS J, BORREMANS B, SCHOETERS G, VAN GORP U.  
Characterization of a 5-Fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of the murine bone marrow.  
Blood 1993 ; 82 (12) : 3580-3591.

FAUCHIAS P, COUDERT JF, VARDELLE M, VARDELLE A, DENOIRJEAN A.  
Diagnostics of thermal spray plasma jets.  
J.Thermal Spray Technol 1992 ; 1: 117-12.

FERNANDEZ E, GIL FJ, BEST S, GINEBRA MP, DRIESSENS FC, PLANELL JA.  
The cement setting reaction in the CaHPO<sub>4</sub>-alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> system: an X-ray diffraction study.  
J Biomed Mater Res 1998 ; 42(3) : 403-6.

FERNANDEZ E, GIL FJ, BEST SM, GINEBRA MP, DRIESSENS FC, PLANELL JA.  
Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO<sub>4</sub>-alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> system: compressive strength and microstructural development.  
J Biomed Mater Res 1998 ; 41(4) : 560-7.

FERRARO EF, CARR R, ZIMMERMANN K.  
A comparison of the effects of strontium chloride and calcium chloride on alveolar bone.  
Calcif Tissu Int 1983 ; 35 : 258-260.

FILIAGGI MJ, COOMBS NA, PILLIAR RM.  
Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-6Al-4V implant system.  
J Biomed Mater Res 1991; 25 : 1211-30.

FINKEMEIER CG.  
Bone-grafting and bone-graft substitutes.  
J.Bone Joint Surg.Am 2002 ; 84-A (3) : 454-64.

FISCHER LW, TERMINE JD.  
Noncollagenous proteins influencing in the local mechanisms of calcification.  
Clin Orthop 1985; 362-385.

FISCHER LW, TERMINE JD, YOUNG MF.

Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorine) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species.  
J Biol Chem 1989 ; 264 : 4571-4576.

FRASHER JRE, LAURENT T C, LAURENT UBG.

Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover  
J Intern Med 1997 ; 242 : 27-33.

FRIEDENSTEIN AJ

Osteogenic stem cells in the bone marrow.

In:

Bone and mineral research.

Dir. Heersche J.N.M. and Kanis J.A.

New York : Elsevier Science ; 1990 : 243-270.

FRITZ E, GLANT T, VERMES C, JACOBS JJ, ROEBUCK KA.

Chemokine gene activation in human bone marrow-derived osteoblasts following exposure to particulate wear debris.

J Biomed Mater Res 2006 ; 77(1) : 192 – 201.

FROMIGUÉ O, HAÏ E, BARBARA A, PETREL C, TRAIFFORT E, RUAT M, et al.

Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate.

J Cell Mol Med 2009 Aug ;13(8B) : 2189-99.

FROMIGUE O, HAY E, BARBARA A, MARIE PJ.

Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated WNT signalling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate.

J Biol Chem 2010 Jun 16. [Epub ahead of print]

FURLONG RJ, OSBORN JF.

Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings.

J.Bone.Joint Surg 1991 ; 73B : 741-745.

GARNETT J et DIEPPE P.

The effect of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth.

Biochem. J 1990 ; 266 : 863-868.

GEESINK RGT.

Experimental and clinical experience with hydroxyapatite-coated hip implants.

Orthopedics 1989 ; 12 : 1239-42.

GIANNOUDIS PV, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E.

Bone substitutes: an update.

Injury 2005 ; 36 Suppl 3 : S20-7.

GISEP A.

Research on ceramic bone substitutes: current status.

Injury 2002 ; 33 Suppl 2 : 88-92.

GLIMCHER MJ.

The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification.  
Instr Course Lec 1987 ; 36 : 49–69.

GOKHALE JA, ROBEY PG, BOSKEY AL.

The biochemistry of bone

In:

Osteoporosis

Dir. Marcus R, Feldman R, Nelson D, Rosen CJ.

San Diego: Academic Press, 2001

GORSKI JP, KREMER EA, CHEN Y, RYAN S, FULLENKAMP C, DELVISCIO J, et al.

Bone acidic glycoprotein-75 self-associates to form macromolecular complexes in-vitro and in-vivo with the potential to sequester phosphate ions.

J Cell Biochem 1997 ; 64 : 547-564.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, LAQUERRIERE P, GUENOUNOU M, LAURENT-MAQUIN D, PHILLIPS TM.

Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles.

Biomaterials 2005 ; 26(15) : 2361-69.

GRELLIER M, GRANJA PL, FRICAIN JC, BIDARRA SJ, RENARD M, BAREILLE R, et al.

The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect.

Biomaterials 2009 ; 30 : 3271–3278.

GRIMANDI G., WEISS P., MILLOT F., DACULSI G.

In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material.

J Biomed Mater Res 39 ; 660-6 : 1998.

GRYNPAS MD, MARIE PJ.

Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats.

Bone 1990 ; 11 : 313-319.

GRYNPAS MD, HAMILTON E, CHEUNG R, TSOUDEROS Y, DELOFFRE P, HOTT M, et al.

Strontium increases vertebral bone volume in rats at low doses that does not include mineralization defect.

Bone 1996 ; 18 : 253-259.

GRONTHOS S, GRAVES SE, OHTA S, SIMMONS J.

The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors.

Bone 1994 ; 84 (12) : 4164-4173.

GROSS KA, BERNDT CC, HERMAN H.

Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings.

J Biomed Mater Res 1998 ; 39 (3) : 407-14.

GRZESIK WJ, ROBEY PG.

Bone matrix RGD glycoproteins : Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro.

J Bone Miner Res 1994 ; 9 : 487-496.

HANKENSON KD, BAIN S, KYRIAKIDES TR, SMITH EA, GOLDSTEIN SA, BORNSTEIN P.

Increased marrow-derived osteoprogenitor cells and endosteal bone formation in mice lacking thrombospondine 2.

J Bone Miner Res 2000 ; 15 : 851-862.

HALL BK, MIYAKE T.

All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.

Bioessays 2000 ; 22 : 138-147.

HAMDY NA.

Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis.

Rheumatology (Oxford) 2009 ; 48 Suppl 4 : 9-13.

HAN X, BOLCATO AL, AMAR S.

Identification of genes differentially expressed in cultured human osteoblasts versus human fibroblasts by DNA microarray analysis.

Connect Tissue Res 2002 ; 43(1) : 63-75.

HAN Y, XU K, LU J, WU Z.

The structural characteristics and mechanical behaviors of nonstoichiometric apatite coatings sintered in air atmosphere.

J.Biomed Mater Res 1999 ; 45 (3) : 198-203

HAN Y, XU K, LU J.

Dissolution response of hydroxyapatite coatings to residual stresses.

J Biomed Mater Res 2001; 55 (4) : 596-602.

HAN X, BOLCATO AL, AMAR S.

Identification of genes differentially expressed in cultured human osteoblasts versus human fibroblasts by DNA microarray analysis.

Connect Tissue Res 2002 ; 43(1) : 63-75.

HANSEN U, MASOUHOS S, AMIS AA.

Material properties of biological tissues related to joint surgery.

Curr Ortho 2006 ; 20 : 16-22.

HAUSCHKA PV, LIAN JB, COLE DE, GUNDBERG CM.

Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone.

Physiol Rev 1989 ; 69 (3) : 990-1047.

HAUSCHKA PV, MAVRAKOS AE, IAFRATI MD.

Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose.

J Biol Chem 1986; 261 (27) : 12665–12674.

- HAZENBERG JG, FREELEY M, FORAN E.  
Microdamage : a cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes.  
J biomech 2006 ; 39 (11) : 2096-2103.
- HEDBOM E, HEINEGARD D.  
Binding of fibromodulin and decorine to separate sites on fibrillar collagens.  
J Biol Chem 1993 ; 268 : 27307-27312.
- HENCH L, BEST S.  
Ceramics, Glasses, and Glass-Céramics  
In:  
Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.  
Ed. Ratner D, Hoffman A, Schoen J, Lemons J.  
San Diego : Elsevier ; 2004 : 153-170.
- HENROTIN Y, LABASSE A, ZHENG SX, GALAIS P, TSOUDEROS Y, CRIELAARD JM.  
Strontium ranelate increases cartilage matrix formation.  
J Bone Miner Res 2001 ; 16(2) : 299-308.
- HENSON PM.  
The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes.  
J Immunol 1971 ; 107 : 1547
- HERON GS, UNEMORI E, WONG M, RAPP JH, HIBBS MH, STONEY RJ.  
Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms.  
ArteriosclerThromb 1991 ; 11 : 1667-1677.
- HIGASHI S., YAMAMURO T., NAKAMURA T., IKADA Y., HYON S. H., JAMSHIDI K.  
Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers.  
Biomaterials 1986 ; 7 : 183-7.
- HO NC, JIA L, DRISCOLL CC, GUTTER EM, FRANCOMANO CA.  
A skeletal gene database.  
J Bone Miner Res 2000 ; 15(11) : 2095-122.
- HOFFMAN A.  
Classes of materials used in medicine  
In:  
Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.  
Ed. Ratner D, Hoffman A, Schoen J, Lemons J.  
San Diego : Elsevier ; 2004 : 67-68.
- HOUZELSTEIN D, AUDA-BOUCHER G, CHERAUD Y, ROUAUD T, BLANC I, TAJBAKHSH S, BUCKINGHAM M, FONTAINE-PERUS J, ROBERT B.  
The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb.  
Development 1999 ; 126 : 2689-2701.
- HUGUES FJ, COLLYER J, STANFIELD M ET GOODMAN SA.  
The effects of bone morphogenic protein -2, -4 and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro.  
Endocrinology 1995 ; 136 : 2671-2677.

HUNTER GK, HAUSCHKA PV, POOLE AR, ROSENBERG LC, GOLDBERG HA.  
Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins.  
Biochem J 1996 ; 317 (Pt 1) : 59-64.

IKENAGA M., HARDOUIN P., LEMAITRE J., ANDRIANJATOVO H., FLAUTRE B.  
Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic  
cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics.  
J Biomed Mater Res 1998 ; 40 : 139-44.

ISHIDA Y, ET HEERSCHKE JNM.  
Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell  
populations derived from adult female but not from adult male rats.  
Bone 1997 ; 20(1) : 17-25.

ITAGAKI T, HONMA T, TAKAHASHI I, ECHIGO S, SASANO Y.  
Quantitative analysis and localization of mRNA transcripts of type I collagen, osteocalcin, MMP  
2, MMP 8, and MMP 13 during bone healing in a rat calvarial experimental defect model.  
Anat Rec (Hoboken) 2008 ; 291(8) : 1038-46.

JALLOT E, NEDELEC JM, GRIMAULT AS, CHASSOT E, GRANJEAN-LAQUERRIERE  
A, LAQUERRIERE P, et al.  
STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel  
derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids.  
Colloids Surf.B Biointerfaces 2005 ; 42 (3-4) : 205-10.

JARCHO M.  
Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics.  
ClinOrthopRelat Res 1981 ; (157) : 259-78

JOHNSSON MSA, NANACOLLAS GH.  
The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation.  
Crit Rev Oral Biol Med 1992 ; 3 (1/2) : 61-82.

JOHNSON MSA, NANCOLLAS GH.  
The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation.  
Crit Rev Oral Biol Med 1992 ; 3 (1/2) : 61-82.

JONVILLE-BÉRA AP, CRICKX B, AARON L, HARTINGH I, AUTRET-LECA E.  
Strontium ranelate-induced DRESS syndrome: first two case reports.  
Allergy 2009 ; 64(4) : 658-9.

JONES JA.  
Metabolism of calcium and phosphorous as influenced by addition to the diet of salts of  
metals which form insoluble phosphate.  
Am J Physiol 1938 ; 124 : 210-214.

JOYNER CJ, ATHANASOU NA TRIFFITT JT.  
Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-  
specific monoclonal antibodies.  
Bone 1997 ; 21(1) : 1-6.

KAHAI S, VARY CP, GAO Y, SETH A.

Collagen, type V, alpha1 (COL5A1) is regulated by TGF-beta in osteoblasts.  
Matrix Biol 2004 ; 23(7) : 445-55.

KARAPLIS A.C.

Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondrale bone formation.

In :

Principles of bone biology. 2nd ed.

Dir. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A.

San Diego : Academic Press ; 2002 : 33-58.

KAY MI, YOUNG RA, POSNER AS.

Crystal structure of hydroxyapatite.

Nature 1964 : 204 ; 1050-1052

KIM Y, LEGEROS J, LEGEROS RZ.

Characterization of commercial HA-coated implants.

J Dent Res 1994 ; 73 : 137.

KLEIN I, SARKADI B, VÁRADI A.

An inventory of the human ABC proteins.

Biochim Biophys Acta 1999 ; 1461(2) : 237-62.

KOCHI G, SATO S, EBIHARA H, HIRANO J, ARAI Y, ITO K.

A comparative study of microfocuss CT and histomorphometry in the evaluation of bone augmentation in rat calvarium.

J Oral Sci 2010 ; 52(2) : 203-11.

KNOTHE TATE ML, ADAMSON JR, TAMI AE, BAUER TW.

The osteocyte.

Int J Biochem Cell Biol 2004 ; 36 : 1-8.

KOGIANNI G, MANN V, NOBLE BS.

Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localised bone destruction.

J Bone Miner Res 2006 ; 21(4) : 616-625.

KOMORI T., YAGI H., NOMURA S., YAMAGUCHI A., SASAKI K., DEGUCHI K, et al.

Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.

Cell 1997 ; 89(5) : 755-764.

KOYAMA Y, MITSUI N, SUZUKI N, YANAGISAWA M, SANUKI R, ISOKAWA K, et al.

Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells.

Arch Oral Biol 2008 ; 53(5) : 488-496.

KUMAR D, GITTINGS JP, TURNER IG, BOWEN CR, BASTIDA-HIDALGO A, CARTMELL SH.

Polarization of hydroxyapatite: influence on osteoblast cell proliferation. Acta

Biomaterials 2010 ; 6(4) : 1549-54.

- KURASHIN AK, KURITA H, HIRANO M, KOTANI A, KLEIN CP, DE GROOT K.  
In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste.  
Biomaterials 1997 ; 18 : 539-43.
- KUZNETSOV SA, KREBSBACH PH, SATOMURA K, KERR J, RIMINUCCI M, BENAYAHU D, ROBEY PG.  
Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.  
J Bone Miner Res 1997 ; 12(9) : 1335-1347.
- LACEY DL, GROSSO LE, MOSER SA, ERDMANN J, TAN HL, PACIFICI R, et al.  
IL-1- induced Murine Osteoblast IL-6 Production is mediated by the Type 1 IL-1 Receptor and is increased by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.  
J Clin Invest 1993 ; 91 : 1731-1742.
- LANDIS WJ, HODGENS KJ, ARENA J, SONG MJ, MCEWEN BF.  
Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography.  
Res Tech 1996 ; 33(2) : 192-202.
- LANGER R, VACANTI JP . \*  
Tissue engineering.  
Science. 1993 14;260(5110):920-6.
- LAQUERRIERE P, GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, JALLOT E, BALOSSIER G, FRAYSSINET P, GUENOUNOU M.  
Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro.  
Biomaterials 2003 ; 24(16) : 2739-47.
- LALOU C, SILVE C, ROSATO R, SEGOVIA B, BINOUX M.  
Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-Binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells.  
Endocrinology 1994 ; 135 : 2318-2326.
- LANDIS WJ, HODGENS KJ, SONG MJ, ARENA J, KIYONAGA S, MARKO M, et al.  
Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: Evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging.  
J Struct Biol 1996 ; 117 : 24-35.
- LEE M.H., JAVED A, KIM H.J., SHIN H.I., GUTIERRZ S., CHOI J.Y., et al.  
Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor beta 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation.  
J Cell Biochem 1999 ; 73(1) : 114-125.
- LEE HJ, KIM SY, KIM GS, HWANG JY, KIM YJ, JEONG B, et al.  
Fracture, bone mineral density, and the effects of calcitonin receptor gene in postmenopausal Koreans.  
Osteoporos Int 2010 ; 21(8) : 1351-60.

LEROUX L, HATIM Z, FRECHE M, LACOUT JL.

Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement.

Bone 25 : 31S-4S ; 1999.

LI C, PARIS O, SIEGEL S, ROSCHGER P, PASCHALIS EP, KLAUSHOFER K, et al.

Strontium is incorporated into mineral crystals only in newly formed bone during strontium ranelate treatment.

J Bone Miner Res 2010 ; 25(5) : 968-75.

LI J, SAROSI I AND CATTLEY RC.

Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in ostéopénie.

Bone 2006 ; 39(4) : 754–766.

LI Y, FENG G, GAO Y, LUO E, LIU X, HU J.

Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats.

J Orthop Res 2010 ; 28(5) : 578-82.

LIAN JB, STEIN GS.

Development of the osteoblasts phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblasts growth and differentiation.

Iowa Orthop J 1995 ; 15 : 118-40.

LIEBSCHNER MAK, WETTERGREEN MA.

Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications  
In :

Topics In Tissue Engineering

Ed. Ashammakhi N et Ferretti P

e-book on tissue engineering, T.Waris & N. Ashammakhi, Chapter 22 ; 2003

LISIGNOLI G, CRISTINO S, TONEGUZZI S, GRASSI F, PIACENTINI A, CAVALLO C, et al.

IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  differently modulate CXCL13 chemokine in stromal cells and osteoblasts isolated from osteoarthritis patients: evidence of changes associated to cell maturation.

Exp Gerontol 2004 ; 39 : 659-665.

LISIGNOLI G, TONEGUZZI S, GRASSI F, PIACENTINI A, TSCHON M, CRISTINO S, GUALTIERI G, FACCHINI A.

Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN- $\gamma$  and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and RANTES production by arthritic osteoblasts.

Cytokine 2002 ; 20(5) : 231-238.

LIU F., MALAVAL L. ET AUBIN J.E.

The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity.

Exp Cell Res 1997; 232 : 97-105.

LLINAS P, MASELLA M, STIGBRAND T, MENEZ A, STURA EA, LE DU MH.

Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones.

Protein Sci 2006 ; 15(7) : 1691-700.

- LUO G, DUCY P, McKEE MD  
Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein.  
Nature 1997 ; 386 : 78-81.
- LYMPERI S, HORWOOD N, MARLEY S, GORDON MY, COPE AP, DAZZI F.  
Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells.  
Blood 2008 ; 111(3) : 1173-81.
- MAC ARTHUR BD, OREFFO RO.  
Bridging the gap.  
Nature 2005 ; 433(7021) : 19.
- MAILLARD C, BERRUYER M, SERRE CM, DECHAVANNE M, DELMAS PD.  
protein-S, a vitamine k-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts.  
Endocrinology 1992 ; 130(3) : 1599-1604.
- MANDELIN J, HUKKANEN M, LI TF, KORHONEN M, LILJESTRÖM M, SILLAT T, ET AL.  
Human osteoblasts produce cathepsin K.  
Bone 2006 ; 38(6) : 769-77.
- MANOLAGAS SC, JILKA RL.  
Bone marrow, cytokines, and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.  
N Engl J Med 1995 ; 332 : 305-311.
- MANOLAGAS S.  
Birth and death of bone cells : Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.  
Endocr Rev 2000 ; 21 : 115-137.
- MAQUART FX, SIMÉON A, PASCO S, MONBOISSE JC.  
Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines  
J Soc Biol 1999 ; 193(4-5) : 423-8. Review.
- MARCUS C.S., LENGEMANN F.W.  
Absorption of <sup>45</sup>Ca and <sup>85</sup>Sr from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat.  
J Nutr 1962 ; 77 : 155-160.
- MARIE PJ, HOTT M.  
Short-term effects of fluorides and strontium on bone formation and resorption in the mouse.  
Metabolism 1986 ; 35 : 547-551.
- MARIE PJ.  
Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption.  
Osteoporos Int 2005 ; 16 Suppl 1 : S7-10.
- MARIE PJ, FELSEMBERG D, BRANDI ML.  
How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis.  
Osteoporos Int 2010 Sep 2. [Epub ahead of print].

MAROTTI G., CANE V., PALAZZINI S. ET PALUMBO C.

Structure-fonction relationships in the osteocyte.

Ital J Miner electrolyte Metab 1990 ; 4 : 93-106.

MARTIN R.B.

Toward a unifying theory of bone remodelling.

Bone 2000 ; 26 : 1-6.

MARTIN T.J. ET SEEMAN E.

Bone remodelling : its local regulation and the emergence of bone fragility.

Best Pract Clin Endo Metab 2008 ; 22(5) : 701-722.

MASI L, BRANDI ML, ROBEY PG, CRESCIOLI C, CALVO JC, BERNABEI P, et al.

Biosynthesis of bone sialoprotein by a human osteoclast-like cell line (FLG 29.1).

J Bone Miner Res 1995 ; 10 (2) : 187-96.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S.

Matrix metalloproteinases: Structure evolution and diversification.

FASEB J 1998 ; 12 : 1075–1095.

MATHIAS R.S., BROWN E.M.

Divalent cations modulate PTH-dependant 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate production in renal proximal tubular cells.

Endocrinology 1991 ; 128 : 3005-3012.

MATSUMINE A, MYOUI A, KUSUZAKI K, ARAKI N, SETO M, YOSHIKAWA H, et al.

Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study.

J.Bone Joint Surg.Br 2004 ; 86 (5) : 719-25.

MAURIN AC, CHAVASSIEUX PM, FRAPPART L, DELMAS PD, SERRE CM, MEUNIER PJ.

Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures.

Bone 2000 ; 26 : 485-489.

MAYER I, FEATHERSTONE JDB.

Dissolution studies of Zn-containing carbonated hydroxyapatite.

J.Cryst.Growth 2000 ; 219 : 98-101.

MEUNIER P, AARON J, EDOUARD C, VIGNON G.

Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies.

Clin Orthop 1971 ; 80 : 147-154.

MELLONIG JT.

Bone allografts in periodontal therapy.

Clin Orthop Relat Res 1996 ; (324) : 116-25.

MIGNATTI P, RIFKIN DB.

Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.

PhysiolRev 1993 ; 73 : 161–195.

- MIYAMOTO Y, ISHIKAWA K, TAKECHI M, TOH T, YOSHIDA Y, NAGAYAMA M, et al.  
Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone.  
*J Biomed Mater Res* 37 ; 457-64 : 1997.
- MOHAN S. AND BAYLINK D.J.  
Bone growth factors  
*Clin Orthop Relat Res* 1991 ; 263 : 30-48.
- MONFOULET L, RABIER B, CHASSANDE O, FRICAIN JC.  
Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration.  
*Calcif Tissue Int* 2010 ; 86(1) : 72-81.
- MOON R.T., KOHN A.D., DE FERRARI G.V.  
Wnt and beta-catenin signalling: diseases and therapies  
*Nature Rev Genet* 2004 ; 5(9) : 691-701.
- MOROHASHI T, SANO T, YAMADA S.  
Effects of strontium on calcium metabolism in rats : A distinction between pharmacologic and toxicdoses.  
*Jpn J Pharmacol* 1994 ; 64 : 155-162
- MURPHY S, BOYD D, MOANE S, BENNETT M.  
The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts.  
*J Mater Sci Mater Med* 2009 May 28. [Epub ahead of print].
- MURRAY GI.  
Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules.  
*J.Pathol* 2001 ; 195 (2) : 135-7.
- MURUGAN R, RAMAKRISHNA S.  
Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite.  
*Biomaterials* 2004 ; 35 : 3829-3835.
- NAGASHIMA M, SAKAI A, UCHIDA S, TANAKA S, TANAKA M, NAKAMURA T.  
Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur.  
*Bone* 2005 ; 36 : 502-511.
- NAKAMURA O, KAZI JA, OHNISHI T, ARAKAKI N, SHAO Q, KAJIHARA, et al.  
Effect of rat fetuin on stimulation of bone resorption in the presence of parathyroid hormone.  
*Biosci Biotechnol Bioche.* 1999 ; 63 : 1383-1391.
- NANCI A..  
Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 7th ed.  
St Louis : Mosby ; 2008.
- NEWTON G, WEREMOWICZ S, MORTON CC, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND ND et al.  
The thrombospondin-4 gene.  
*Mamm Genome* 1999 ; 10 : 1010-1016.

- NIELSEN BB, KASTRUP JS, RASMUSSEN H, HOLTET TL, GRAVERSEN JH, ETZERODT M, et al.  
Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an  $\alpha$ -helical coiled coil.  
FEBS Lett 1997 ; 412(2) : 388-392.
- NIELSEN SP.  
The biological role of strontium.  
Bone 2004 ; 35 : 583-588.
- NOSHI T, YOSHIKAWA T, IKEUCHI M, DOHI Y, OHGUSHI H, HORIUCHI K, et al.  
Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein.  
J Biomed Mater Res 52 : 621-30 ; 2000
- NUTTALL ME, PATON AJ, OLIVIERA DL, NADEAU DP, GOWEN M.  
Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteogenic disorders.  
J Bone Miner Res 1998 ; 13 : 371-382.
- NUTTALL ME, GIMBLE JM.  
Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis?  
Bone 2000 ; 27(2) : 177-184.
- NYMAN JS, REYES M, ET WANG X.  
Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone.  
Micron 2005 ; 36 : 566-582.
- OGATA K, IMAZATO S, EHARA A, EBISU S, KINOMOTO Y, NAKANO T, et al.  
Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites.  
J Biomed Mater Res A 2005 ; 72(2) : 127-35.
- ONAN D, ALLAN E, QUINN J, GOOI J, POMPOLO S, SIMS N, et al.  
The Chemokine Cxcl1 Is a Novel Target Gene of Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Protein in Committed Osteoblasts.  
Endocrinology 2009 ; 5 : 2244-2253.
- ONG LJ, CARNES DL, BESSHO K.  
Evaluation of titanium plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo.  
Biomaterials 2004 ; 25 : 4601-6.
- ONYIA JE, HALE LV, MILES RR, CAIN RL, TU Y, HULMAN JF, et al.  
Molecular characterization of gene expression changes in ROS 17/2.8 cells cultured in diffusion chambers in vivo.  
Calcif Tissue Int 1999 ; 65(2) : 133-138.
- OREFFO RO, VIRDY AS, TRIFFITT JT.  
Retroviral marking of human bone marrow fibroblasts: in vitro expansion and localization in calvaria sites after subcutaneous transplantation in vivo.  
J Cell Physiol 2001 ; 186(2) : 201-9.

OSAKA A, MIURA Y, TAKEUCHI K, ASADA M, TAKAHASHI K.  
Calcium apatite prepared from calcium hydroxyde and orthophosphoric acid .  
J.Mater Sci Mat Med 1991; 2 : 51-5.

OHSAWA Y, NITATORI T, HIGUCHI S, KOMINAMI E, UCHIYAMA Y.  
Lysosomal cystéine and aspartic proteinases, acid phosphatase, and endogenous cysteine  
proteinase inhibitor, cystatin- $\beta$ , in rat osteoclasts.  
J Histochem Cytochem 1993 ; 41 : 1075-1083.

OWEN M.E.  
The marrow stromal cell system.  
In:  
Marrow stromal cells in culture  
Dir. Beresford J.N. and Owen M.E.  
Cambridge : Cambridge Univ. Press ; 1998 : 88-110.

OWEN TA, ARONOW M, SHALHOUB V, BARONE LM, WILMING L, TASSINARI MS,  
et al.  
Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in  
expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during  
formation of the bone extracellular matrix.  
J Cell Physiol 1990 ; 143 (3) : 420-30.

PAN HB, LI ZY, LAM WM, WONG JC, DARVELL BW, LUK KDK, et al.  
Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration.  
Acta Biomaterialia 2009 : 1678-1685.

PARFITT AM, DREZNER MK, GLORIEUX FH, KANIS JA, MALLUCHE H, MEUNIER  
PJ, et al.  
Bone histomorphometry : standardization of nomenclature, symbols, and units.  
J.Bone Miner Res 1987 ; 2 : 595-610.

PARFITT AM.  
Osteonal and hemiosteonal remodeling : the spatial and temporal framework for signal traffic  
in adult human bone.  
J Cell Biochem 1994 ; 55 : 273-286.

PARFITT AM, MUNDY GR, ROODMAN GD, HUGHES DE,BOYCE BF.  
A new model for the regulation of bone resorption with particular reference to the effects of  
bisphosphonates  
J Bone Miner Res 1996 ; 11 : 150-159.

PARFITT AM.  
The mecanism of coupling : a role fort the vasculature.  
Bone 2000 ; 26 : 319-323.

PARHAMI F, GARFINKEL A, DEMER LL.  
Role of lipids in osteoporosis.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 ; 20 : 2346-2348.

PARK JW.  
Increased bone apposition on a titanium oxide surface incorporating phosphate and strontium.  
Clin Oral Implants Res 2010 Jun 8.

- PARK JW, KIM HK, KIM YJ, JANG JH, SONG H, HANAWA T.  
Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium.  
*Acta Biomater* 2010 ; 6(7) : 2843-51.
- PARK JY, RAMACHANDRAN G, RAYNOR PC, OLSON GM JR.  
Determination of particle concentration rankings by spatial mapping of particle surface area, number, and mass concentrations in a restaurant and a die casting plant.  
*J Occup Environ Hyg* 2010 ; 7(8) : 466-76.
- PARK BH, YOON SJ, JANG KY, KIM MR, LEE HS, KIM KB, et al.  
Lim ST, Song KJ, Kim JR.  
COMP-angiopoietin-1 accelerates bone formation during distraction osteogenesis.  
*Bone* 2010 ; 46(5) : 1442-8.
- PARK S.R., OREFFO R.O., ET TRIFFITT J.T.  
Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro.  
*Bone* 1999 ; 24(6) : 549-554.
- PATRICIA AM, SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF JW.  
Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors  
*BioTechniques* 2005 ; 38:73-83.
- PAZ YEPES M, RODRÍGUEZ CASTILLA J.  
Rash and renal failure secondary to strontium ranelate.  
*Med Clin* 2010 ; 134(2) : 85-6.
- PENOLAZZI L, LAMBERTINI E, TAVANTI E, TORREGIANI E, VESCE F, GAMBARI R, et al.  
Evaluation of chemokine and cytokine profiles in osteoblast progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-PLEX technology.  
*Cell Biol Int* 2008 ; 32(2) : 320-325.
- PENG S, ZHOU G, LUK KD, CHEUNG KM, LI Z, LAM WM, et al.  
Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway.  
*Cell Physiol Biochem* 2009 ; 23(1-3) : 165-74.
- PEREIRA RC, STADMEYER L, MARCINIAK SJ, RON D, CANALIS E.  
C/EBP homologous protein is necessary for normal osteoblastic function.  
*J Cell Biochem* 2006 ; 97(3) : 633-40.
- PERRY RL, RUDNICK MA.  
Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation.  
*Front Biosci* 2000 ; 5 : 750-767.
- PIETTE M, DESMET B, DAMS R.  
Determination of strontium in human whole blood by ICP-AES.  
*Sci Total Environ* 1994; 141 : 269-273.

PROFF P, RÖMER P.

The molecular mechanism behind bone remodelling: a review.  
Clin Oral Invest 2009 ; 13 : 355–362.

PFENDER E.

Plasma jet behavior and modeling associated with the plasma spray process.  
Thin Solid Films 1994 ; 238 : 228–241.

POTEMPA J, KORZOS E, TRAVIS J.

The serpin superfamily of protease inhibitors: Structure, function and regulation.  
J Biol Chem 1994 ; 269 : 15957-15960.

PROCKOP D.J.

Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues  
Science 1997 ; 276 : 71-74.

PURCELL L, GRUIA-GRAY J, SCANGA S, RINGUETTE M.

Developmental anomalies of *Xenopus* embryos following microinjection of SPARC antibodies.  
J Exp Zool 1993 ; 265 : 153-164.

QIU K, ZHAO XJ, WAN CX, ZHAO CS, CHEN YW.

Effect of strontium ions on the growth of ROS17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds.  
Biomaterials 2006 ; 27(8) : 1277-86.

RADIN S, DUCHEYNE P.

Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability.  
Mater Med 1992 ; 3 : 33–42.

RAMIREZ F, PEREIRA L

The fibrillins.  
Int J Biochem Cell Biol 1997 ; 21 : 255-259.

RAVINDRAN S, NARAYANAN K, EAPEN AS, HAO J, RAMACHANDRAN A, BLOND S, et al.

Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP-78 mediates endocytosis of dentin matrix protein 1.  
J Biol Chem 2008 ; 283(44) : 29658-70.

RAZZOUK S.

Bone remodelling and Individual-based Implant Therapy.  
N Y State Dent J 2010 ; 76(1) : 39-41.

REEVE J, ARLOT ME, CHAVASSIEUX PM, EDOUARD C, GREEN JR, HESP R, et al.

The assessment of bone formation and bone resorption in osteoporosis: a comparison between tetracycline-based iliac histomorphometry and whole body <sup>85</sup>Sr kinetics.  
J Bone Miner Res 1987 ; 2 : 479-489.

- RENAUDIN G, LAQUERRIERE P, FILINCHUK Y, JALLOT E, NEDELEC JM.  
Structural characterisation of sol-gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties.  
J Mater Chem 2008 ; 18 : 3593-3600.
- REYNOLDS MA, AICHELMANN-REIDY ME, BRANCH-MAYS GL GUNSOLLEY JC.  
The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review.  
Ann Periodontol 2003 ; 8 : 227-265.
- RHEE SH.  
Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment.  
Biomaterials 2002 ; 23 (4) : 1147-52.
- RHO JY, KUHN-SPEARING L, ZIOUPOS P.  
Mechanical properties and the hierarchical structure of bone.  
Med Eng Phys 1998 ; 20 : 92-102.
- RINGE JD, DORST A, FARAHMAND P.  
Efficacy of strontium ranelate on bone mineral density in men with osteoporosis.  
Arzneimittelforschung 2010 ; 60(5) : 267-72.
- ROBINSON, R.A., WATSON, M.L.  
Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope.  
Anat Rec 1952 ; 114 : 383-409.
- ROBEY PG, YOUNG MF, FISHER LW, McCLAIN TD.  
Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix.  
J Cell Biol 1989 ; 108 : 719-727.
- ROBEY PG.  
Bone matrix protéoglycanes and glycoproteins.  
In:  
Principles of Bone Biology.  
Dir. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA.  
San Diego: Academic Press; 2002 : 225-237.
- ROBLING AG, NIZIOLEK PJ, BALDRIDGE LA, CONDON KW, ALLEN MR, ALAM I, et al.  
Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin.  
J Biol Chem 2008 ; 283(9) : 5866-75.
- RODAN GA.  
Introduction to bone biology.  
Bone 1992 ; 13(Suppl. 1) : S3-S6.
- ROSEBERRY H, HASTINGS A, MORSE J.  
X-ray analysis of bone and teeth.  
J Biol Chem 1931 ; 90 : 395-407.
- ROSEN ED, SPIEGELMAN BM.  
Molecular regulation of adipogenesis  
Annu Rev Cell Dev Biol 2000 ; 16 : 145-171.

ROSENBERG AE, SANFORD IR.

Bone

In :

Histology for pathologists

Dir. Stacey E.Mills

Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007 : 75-95.

RUDDY MJ, SHEN F, SMITH JB, SHARMA A, GAFFEN SL.

Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: Implication for inflammation and neutrophil recruitment.

J leukocyte Biol 2004 ; 76 : 135-144.

RUOSLAHTI E

RGD and other recognition sequences for integrins.

Annu Rev Cell Dev Biol 1996 ; 12 : 697-715.

RYDZIEL S, LADD C, MCCARTHY TL.

Determination and expression of platelet-derived growth factor-AA in bone cell cultures.

Endocrinology 1992 ; 130(4) : 1916-1922.

SAFTIG P, HUNZIKER E, EVERTS V, JONES S, BOYDE A, WAHMEYER O, et al.

Functions of cathepsin K in bone resorption: Lessons from cathepsin K deficient mice.

Adv Exp Biol Med 2000 ; 477 : 293-303.

SAINZ M, DEL POZO JG, ARIAS LH, CARVAJAL A.

Strontium ranelate may cause alopecia.

BMJ 2009 ; 22 : 338.

SANDBERG M, AUTIO-HARMAINEN H, VUORIO E.

Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones.

Dev Biol 1988 ; 130(1) : 324-34.

SATO M, GRASSER W, HARM S, FULLENKAMP C, GORSKI JP.

Bone acidic glycoprotein 75 inhibits resorption activity of isolated rat and chicken osteoclasts.

FASEB J 1992 ; 6(11) : 2966-2976.

SCHMIDT C, KASPAR D, SARKAR MR, CLAES LE, IGNATIUS AA.

A scanning electron microscopy study of human osteoblast morphology on five orthopedic metals.

J Biomed Mater Res 2002 ; 63(3) : 252-61.

SHEN Q, ZHU S, HU J, GENG N, ZOU S.

Recombinant human bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-stimulated cell differentiation and bone formation within the expanding calvarial suture in rats.

J Craniofac Surg 2009 ; 20 (5) : 1561-5.

SCHONHERR E, HAUSSER HJ.

Extracellular matrix and cytokines: A functional unit.

Dev Immunol 2000 ; 7 : 89-101.

- SCHREINER LJ, CAMERON IG, FUNDUK N, MILJKOVIC L, PINTAR MM, KYDON DN.  
Proton NMR spin grouping and exchange in dentin.  
Biophys J 1991 ; 59 : 629-639.
- SERRE CM, FARLAY D, DELMAS PD, CHENU C.  
Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers.  
Bone 1999 ; 25 : 623-629.
- SHANBHAG AS, JACOBS JJ, BLACK J, GALANTE JO, GLANT TT.  
Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro.  
Clin Orthop Relat Res 1997 ; (342) : 205-17.
- SHANBHAG AS, JACOBS JJ, BLACK J, GALANTE JO, GLANT TT.  
Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro.  
J Orthop Res 1995 ; 13 (5) : 792-801.
- SHANBHAG AS, JACOBS JJ, BLACK J, GALANTE JO, GLANT TT.  
Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area.  
J Biomed Mater Res 1994 ; 28 (1) : 81-90.
- SHIMIZU T, NISHIHIRA J, WATANABE H, ABE R, HONDA A, ISHIBASHI T, et al.  
Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells.  
J Biol Chem 2004 ; 279(14) : 13729-37.
- SILA-ASNA M, BUNYARATVEJ A, MAEDA S, KITAGUCHI H, BUNYARATAVEJ N.  
Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell.  
Kobe J Med Sci 2007 ; 53(1-2) : 25-35.
- SILVA TA, GARLET GP, FUKADA SY, SILVA JS, CUNHA FQ.  
Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease.  
J Dent Res 2007 ; 86 : 306-319.
- SIMONET W.S., LACEY D.L., DUNSTAN C.R.  
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.  
Cell 1997 ; 89(2) : 309-319.
- SIMMONS P.J. ET TOROK-STORB B.  
Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody STRO-1.  
Blood 1991 ; 78(1) : 55-62.
- SODEK J, GANSS B, McKEE MD.  
Osteopontin.  
Crit Rev Oral Biol Med 2000 ; 11 : 279-303.
- SMITH EV, SHIPLEY DR.  
Severe exfoliative dermatitis caused by strontium ranelate: two cases of a new drug reaction.  
Age Ageing 2010 ; 39 (3) : 401-3.

SOBEL AE, COHEN Y, KRAMER B.

The nature of the injury to the calcifying mechanism in rickets due to strontium.  
Biochem J 1935 ; 29 : 2640-2645.

SOMMARIN Y, WENDEL M, SHEN Z, HELLMAN U, HEINEGARD D.

Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix.  
J Biol Chem 1998 ; 273 : 16723-16729.

SPENCER EM, LIU CC, SI EC.

In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats.  
Bone 1991 ; 12(1) : 21-26.

STUBBS JT III, MINTZ KP, EANES ED, TORCHIA DA, FISCHER LW.

Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: Delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain.  
J Bone Miner Res 1997 ; 12 : 1210-1222.

SUN L, BERNDT CC, GROSS KA, KUCUK A.

Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review.  
J Biomed Mater Res 2001 ; 58 (5) : 570-92.

SUNG V, STUBBS JT 3RD, FISHER L, AARON AD, THOMPSON EW.

Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the  $\alpha(v)\beta3$  and  $\alpha(v)\beta5$  integrins.  
J Cell Physiol 1998 ; 176 (3) : 482-94.

TERMINE JD, BELCOURT AB, CONN KM, KLEINMAN HK.

Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone.  
J Biol Chem 1981; 256 : 10403-10408.

TOYOSAWA S, KANATANI N, SHINTANI S, KOBATA M, YUKI M, KISHINO M, et al.

Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) during fracture healing.  
Bone 2004 ; 35(2) : 553-61.

TRAUB W, PIEZ KA.

The chemistry and structure of collagen.  
Adv Protein Chem 1971 ; 25 : 243-352.

TRAUB W, ARAD T, WEINER S.

Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers.  
Proc Natl Acad Sci USA 1989 ; 86 : 9822-9826.

TROMBELLI L, PENOLAZZI L, TORREGGIANI E, FARINA R, LAMBERTINI E, VECCHIATINI R, et al.

Effect of hydroxyapatite-based biomaterials on human osteoblast phenotype.  
Minerva Stomatol 2010 ; 59(3) : 103-15.

TURNER C.H. ET FORWOOD M.R.

What role does the osteocyte network play in bone adaptation?  
Bone 1995 ; 16 : 283-285.

TWINING SS.

Regulation of proteolytic activity in tissues.

Crit Rev Biochem Mol Biol 1994 ; 29 : 315–383.

UJITA M, SHINOMURA T, KIMATA K.

Molecular cloning of the mouse osteoglycin-encoding gene.

Gene 1995 ; 158 : 237-240.

UUSITALO H, RANTAKOKKO J, AHONEN M, JAMSA T, TUUKKANEN J, KAHARI V,  
et al.

A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing.

Bone 2001 ; 28 : 423–429.

VAN BEZOOIJEN RL, SVENSSON JP, EEFTING D, VISSER A, VAN DER HORST G,  
KARPERIEN M, et al.

Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of Sclerostin on BMP-stimulated bone formation.

J Bone Miner Res 2007 ; 22(1) : 19-28.

VAN BEZOOIJEN RL, TEN DIJKE P, PAPAPOULOS SE, LÖWIK CW.

SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation.

Cytokine Growth Factor Rev 2005 ; 16(3) : 319-27.

VAN BEZOOIJEN RL, ROELEN BA, VISSER A, VAN DER WEE-PALS L, DE WILT E,  
KARPERIEN M, et al.

Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist.

J Exp Med 2004 ; 199(6) : 805-14.

VAN HEEST A, SWIONTKOWSKI M.

Bone-graft substitutes.

Lancet 1999 ; 353 Suppl 1: S128-9.

VASHISHTH D.

Hierarchy of bone microdamage at multiple length scales.

Int J Fatigue 2007 ; 29 : 1024-1033.

VELARD F, LAURENT-MAQUIN D, BRAUX J, GUILLAUME C, BOUTHORS S,  
JALLOT E, et al.

The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation.

Biomaterials 2010 ; 31(8) : 2001-9.

VERBORGT O, GIBSON GJ, SCHAFFLER MB.

Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo.

J Bone Miner Res 2000 ; 15 : 60-67.

VERSIECK J, VANBALLENBERGHE L, WITTOEK A, VANHOE H..

The determination of strontium in human blood serum and packed blood cells by radiochemical neutron activation analysis .

J Radioanalytic Nuc Chem 1994 ; 168 : 243-248.

VROMAN L.

Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids.  
Nature 1976 ; 196 : 476–477.

WAHL EC, LIU L, PERRIEN DS, ARONSON J, HOGUE WR, SKINNER RA, et al.

A novel mouse model for the study of the inhibitory effects of chronic ethanol exposure on direct bone formation.

Alcohol 2006 ; 39 : 159–167.

WANG D, CHRISTENSEN K, CHAWLA K, XIAO G, KREBSBACH PH, FRANCESCHI RT.

Isolation and characterisation of MC3T3-E1 preosteoblasts subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential.

J Bone Miner Res 1999 ; 14(6) : 983-903.

WANG Q, HUANG C, XUE M, ZHANG X.

Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing.

Bone 2010 ; Nov 5. [Epub ahead of print].

WEINER S, WAGNER HD.

The material bone: Structure-mechanical function relations.

Annu RevMater Sci 1998 ; 28 : 271–298.

WERNIKE E, MONTJOVENT MO, LIU Y, WISMEIJER D, HUNZIKER EB, SIEBENROCK KA, et al.

VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo.

Eur Cell Mater 2010 ; 19 : 30-40.

WILLENBROCK F, CRABBE T, SLOCOMBE PM, SUTTON CW, DOCHERTY AJ, COCKETT MI, et al.

The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A.

Biochemistry 1993 ; 32 (16) : 4330-7.

WONG M, LAWTON T, GOETINCK PF, KUHN JL, GOLDSTEIN SAS, BONADIO J.

Aggrecan core protein is expressed in membranous bone of chick embryo : Molecular and biomechanical studies of normal and nanomelia embryos.

J Biol Chem 1992 ; 267 : 5592-5598.

WOESSNER JF Jr.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.

FASEB J 1991 ; 5 : 2145–2154.

WUTHIER RE, REGISTER TC.

The role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues.

The chemistry and biology of mineralized tissues 1984 ; 114-124

XIONG J, LI Y, HODGSON PD, WEN C.

In vitro osteoblast-like cell proliferation on nano-hydroxyapatite coatings with different morphologies on a titanium-niobium shape memory alloy.

J Biomed Mater Res A. 2010. [Epub ahead of print].

XU T, BIANCO P, FISCHER LW, LONGENECKER G, SMITH E, GOLDSTEIN S, et al.  
Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice.  
Nature Genet 1998 ; 20 : 78-82.

XUE W, MOORE JL, HOSICK HL, BOSE S, BANDYOPADHYAY A, LU WW, et al.  
Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics.  
J Biomed Mater Res A. 2006 ; 79(4) : 804-14.

YAMAGUSHI A, KOMORI T, SUDA T.  
Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenic proteins, hedgehogs,  
and Cbfa1.  
Endocr Rev 1999 21(4) : 393-411.

YAN Q, SAGE EH.  
SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions.  
J Histochem Cytochem 1999 ; 47 : 1495-1506.

YOSHITAKE Y, RITTLING SR, DENHARDT DT, NODA M.  
Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption.  
Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; 96(14) : 8156-8160.

ZHANG F, TANG Z, HOU X, LENNARTSSON J, LI Y, KOCH AW, et al.  
VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B  
targeting inhibits pathological angiogenesis.  
Proc Natl Acad Sci USA 2009 ; 106 (15) : 6152-7.

ZHANG Q, LIU HR, YING HJ, DAI DZ, TANG XY, DAI Y.  
Strontium fructose 1,6-diphosphate alleviates early diabetic testopathy by suppressing  
abnormal testicular matrix metalloproteinase system in streptozocin-treated rats.  
J Pharm Pharmacol 2009 ; 61(2) : 229-36.

ZHAO C, IRIE N, TAKADA Y.  
Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis.  
Cell Metabolism 2006 ; 4(2) : 111-121.

ZIMMERMANN DR, RUOSLAHTI E.  
Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican.  
Embo J 1989 ; 8 : 2975-2981.

ZREIQAT H, RAMASWAMY Y, WU C, PASCHALIDIS A, LU Z, JAMES B, et al.  
The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue  
engineering.  
Biomaterials 2010 ; 31(12) : 3175-84.