



HAL
open science

Hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium : analyse du comportement de cellules endothéliales in vitro

Arthur Brunel

► **To cite this version:**

Arthur Brunel. Hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium : analyse du comportement de cellules endothéliales in vitro. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université de Limoges, 2023. Français. NNT : 2023LIMO0037 . tel-04411413

HAL Id: tel-04411413

<https://theses.hal.science/tel-04411413>

Submitted on 23 Jan 2024

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.

Université de Limoges

ED 609 - Sciences et Ingénierie des Matériaux, Mécanique,
Énergétique (SIMME)

IRCER – Axe 4 : Céramiques sous contraintes environnementales

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Spécialité : Matériaux céramiques et traitements de surface

Présentée par
Arthur Brunel

Soutenue le 11 septembre 2023

Hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium : analyse du comportement de cellules endothéliales *in vitro*

Thèse dirigée par **Éric CHAMPION** et **Amandine MAGNAUDEIX**

JURY :

Président

M. Fabrice Lalloué, Professeur, CAPTuR INSERM U1308, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Joëlle Amédée-Vilamitjana, Directrice de recherche, BioTis INSERM U1026,
Université de Bordeaux

Mme. Delphine Logeart-Avramoglou, Directrice de recherche, B3OA UMR CNRS
7052 INSERM U1271, Université de Paris Cité

Examineurs

M. David Marchat, Chargé de Recherche, SAINBIOSE INSERM U1059, Mines
Saint-Etienne, Saint-Etienne

M. Éric Champion, Professeur, IRCER UMR CNRS 7315, Université de Limoges

Mme. Amandine Magnaudeix, Maître de conférences, IRCER UMR CNRS 7315,
Université de Limoges



Remerciements

Cette thèse réalisée à l'Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER) a été rendue possible par les financements de l'Agence Nationale de la Recherche du projet CharaBioC (ANR-19-CE08-0003-01) et du LabEX SigmaLim (ANR-10-LABX-0074-01).

Merci à mes rapporteuses Joëlle Amédée-Vilamitjana et Delphine Logeart-Avramoglou d'avoir accepté cette tâche et d'avoir fait des retours et des suggestions enrichissants pour la suite de ce projet. Merci à Fabrice Lalloué pour avoir présidé mon jury de thèse et merci à David Marchat d'avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie Philippe Thomas le directeur de l'IRCER de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et permis de réaliser cette thèse.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'encadrement de mes directeurs de thèse, le professeur Eric Champion et la maîtresse de conférences Amandine Magnaudeix. Leur rigueur, leur excellence scientifique et la force de leur soutien ont permis de braver les nombreuses difficultés qu'une thèse peut apporter. Merci à vous deux pour votre aide, sans vous cette thèse n'aurait certainement pas pu être achevée.

Je tiens également à remercier toute l'école doctorale pour le suivi et le soutien apportés tout au long de ma thèse. Merci tout particulièrement à Alexandre Maître et Vincent Rat pour leurs conseils et leur précieux soutien lors des réunions de suivi.

Merci beaucoup à tous les membres passés et présents de l'équipe biocéramiques. Notamment Emeline Renaudie, merci infiniment pour ton aide si précieuse lors des innombrables occasions où tu l'as fait, ton sérieux et ta rigueur ont permis de faire fonctionner le laboratoire avec une grande souplesse ! Un très grand merci également à Patricia Pascaud-Mathieu, ton assistance continue, et dans la bonne humeur, sur le robocasting aura permis de rendre le domptage puis l'utilisation de cette machine bien plus supportable ! Un grand merci aussi à Betty Laverdet, le prêt de pièces du bioréacteur aura été d'une grande aide ! Merci Alice Abelanet pour tes conseils et ton aide sur toute la partie biologie de ma thèse. Merci également à Chantal Damia, Isabelle Julien et Karine Giry pour leurs conseils. Merci Sandrine Lecardeur pour ton aide et les échanges

Merci beaucoup également aux doctorants et étudiants du laboratoire, notamment à Paul Danty, Antoine Recorda, bien que le contexte n'ait pas permis autant d'échange que je l'aurais souhaité, vous avez toujours été répondeur présent pour m'écouter me plaindre, pour animer le bureau et alimenter cette corne d'abondance qu'il est devenu. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien ! Merci également à Henrique Schappo, Julie Usseglio, Adeline Dumur, Esther Pagès, Souad Hamraoui, Emma Martin, Tom Rautureau, Nathalie Annonay... vous avez été d'une façon ou d'une autre d'une aide précieuse et votre compagnie fut un plaisir. Merci pour votre bonne humeur et votre curiosité.

Je n'aurai pas pu réaliser toutes ces expériences sans l'expertise des personnels du laboratoire. A vous tous qui m'avez permis de tirer le meilleur des équipements du laboratoire et d'exploiter au maximum mes résultats je ne saurai trop vous remercier pour votre sollicitude, votre assistance rigoureuse et votre bonne humeur ! Dans le désordre, en espérant n'oublier personne, je tiens à remercier Julie Cornette, Richard Mayet, Marina Soustre, Séverine Barcina, Etienne Laborde, Pierre Carles, Eloïse Hyvernaud, Yann Launay, Sandra Blanchet, Guillaume Babule, Michael Faucher... Un grand merci posthume à Marion Vandenhende, ta

gentillesse et ta bonne humeur égayaient le laboratoire et ton expertise et tes conseils se sont révélés cruciaux pour la réussite de ma thèse.

Merci beaucoup à Rémi Farges pour l'organisation du partage de l'enceinte climatique. Merci également pour les nombreuses discussions très enrichissantes sur les géopolymères ! Je te souhaite le meilleur des succès pour ton entreprise.

Un énorme merci à tout le personnel non scientifique du laboratoire, en premier lieu Pamela Bathias pour sa réactivité et sa gestion hors pair de toutes les questions administratives. Un grand merci à Nicolas Calvé, Ghali Taibi et Elodie Laplagne pour leur professionnalisme et leur sympathie. Merci à tout le personnel administratif, logistique, ou de nettoyage dans ces fonctions de support si essentielles à un laboratoire, grâce à vous cette thèse s'est déroulée dans les meilleures conditions !

Je tiens également à remercier Fabrice Dupuy, Stéphanie Durand et Florence Drouillard pour leur assistance dans le cadre des TP que j'ai encadré à la faculté des sciences. Merci d'avoir pris le temps de me former et d'avoir su faire preuve d'une redoutable efficacité malgré les nombreuses contraintes. Merci également de m'avoir fait découvrir une partie du fonctionnement d'une faculté.

Enfin je tiens à remercier ma famille qui a toujours été derrière moi lors de ce marathon, qui m'a soutenue tout du long et qui m'a mainte fois rendue visite. Enfin, un merci tout particulier à ma compagne, Audrey, car sans toi rien n'aurait été possible et tu as su me soutenir dans les moments les plus difficiles. A cet égard cette thèse est un peu la tienne également.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

| | |
|--|----|
| Liste des abréviations..... | 15 |
| Partie I. Introduction bibliographique | 18 |
| I.1. Préambule : La réparation des lacunes osseuses à fort risque de non-consolidation.. | 18 |
| I.2. Système vasculaire et angiogénèse..... | 20 |
| I.2.1. Le système vasculaire | 20 |
| I.2.1.1. Le système vasculaire sanguin | 21 |
| I.2.1.2. Le système vasculaire lymphatique..... | 24 |
| I.2.2. La première brique du système vasculaire : la cellule endothéliale..... | 26 |
| I.2.2.1. Généralités sur les cellules endothéliales..... | 26 |
| I.2.2.2. Le cytosquelette d'actine dans les cellules endothéliales | 27 |
| I.2.3. L'angiogénèse | 28 |
| I.2.3.1. L'angiogénèse par bourgeonnement..... | 29 |
| I.2.3.2. L'angiogénèse par intussusception | 31 |
| I.2.4. La signalisation de l'angiogénèse par bourgeonnement | 32 |
| I.2.4.1. Le VEGF-A et ses récepteurs | 32 |
| I.2.4.2. La compétition dynamique entre les cellules endothéliales | 32 |
| I.2.4.3. Les métalloprotéases matricielles | 33 |
| I.2.4.4. Les angiopoïétines | 34 |
| I.2.4.5. Le Facteur de von Willebrand | 34 |
| I.2.4.6. Le rôle de l'hypoxie, des radicaux libres de l'oxygène et de l'enzyme eNOS.. | 34 |
| I.2.4.7. Voie YAP/TAZ..... | 36 |
| I.2.4.8. Le métabolisme des cellules endothéliales | 37 |
| I.2.5. Les molécules d'adhésion de la cellule endothéliale..... | 37 |
| I.2.5.1. VE-Cadhérine | 38 |
| I.2.5.2. PECAM-1 | 40 |
| I.2.6. Une signalisation riche | 40 |
| I.2.6.1. Endomucine..... | 40 |
| I.2.6.2. VCAM-1 | 40 |
| I.2.6.3. Des voies complémentaires au VEGF : PDGF et FGF | 41 |
| I.2.6.4. EphrinB2/EphB4 | 41 |
| I.2.7. Le rôle des contraintes mécaniques dans l'angiogénèse..... | 41 |
| I.3. Le tissu osseux | 42 |
| I.3.1. Généralités sur le tissu osseux..... | 42 |
| I.3.2. Organisation générale du tissu osseux..... | 43 |
| I.3.2.1. L'os compact..... | 43 |
| I.3.2.2. L'os spongieux..... | 45 |
| I.3.2.3. Description d'un os long..... | 46 |
| I.3.2.4. Description d'un os plat..... | 47 |
| I.4. Les cellules du tissu osseux..... | 47 |
| I.4.1. Les ostéoblastes | 47 |
| I.4.2. Les cellules bordantes de l'os..... | 50 |
| I.4.3. Les ostéocytes | 50 |
| I.4.4. Les ostéoclastes..... | 51 |
| I.4.5. Interactions entre cellules osseuses | 52 |
| I.4.5.1.1. Le remodelage osseux et l'unité multicellulaire de base | 52 |

| | |
|--|----|
| 1.4.5.1.2. Contrôle du remodelage osseux..... | 53 |
| 1.4.5.1.2.1. Mécanisme de la résorption osseuse..... | 57 |
| 1.4.5.1.2.2. Mécanisme de la synthèse osseuse..... | 57 |
| 1.4.6. Le système vasculaire dans l'os long :..... | 58 |
| 1.4.7. L'angiogenèse au sein du tissu osseux..... | 60 |
| 1.4.8. La réponse du tissu osseux à la suite d'un traumatisme..... | 60 |
| 1.4.8.1. Réponse immunitaire..... | 60 |
| 1.4.8.2. Réponse immunitaire et biomatériaux..... | 61 |
| 1.4.8.3. L'angiogenèse dans l'os suite à un traumatisme :..... | 63 |
| 1.5. Stratégies de développement pour des céramiques adaptées aux problématiques de la réparation du tissu osseux..... | 64 |
| 1.5.1. Généralités sur les céramiques adaptées aux problématiques de la réparation du tissu osseux..... | 64 |
| 1.5.2. Effets biologiques des paramètres physico-chimiques de céramiques phosphocalciques sur les types cellulaires au sein de l'os..... | 65 |
| 1.5.2.1. Paramètres physiques..... | 65 |
| 1.5.2.1.1. Rigidité..... | 65 |
| 1.5.2.1.2. Surface spécifique..... | 66 |
| 1.5.2.1.3. Taille des grains..... | 68 |
| 1.5.2.1.4. Topographie..... | 68 |
| 1.5.2.2. Paramètres chimiques..... | 70 |
| 1.5.2.2.1. L'impact du calcium..... | 71 |
| 1.5.2.2.1.1. Effets sur les cellules endothéliales..... | 72 |
| 1.5.2.2.1.2. Effets sur les ostéoblastes..... | 72 |
| 1.5.2.2.1.3. Effets sur les ostéoclastes..... | 73 |
| 1.5.2.2.2. L'impact du phosphore..... | 74 |
| 1.5.2.2.2.1. Effet sur les cellules endothéliales..... | 74 |
| 1.5.2.2.2.2. Effet sur les ostéoblastes..... | 75 |
| 1.5.2.2.2.3. Effet sur les ostéoclastes..... | 75 |
| 1.5.2.2.3. L'impact du cuivre..... | 75 |
| 1.5.2.2.3.1. Rôle biologique du cuivre..... | 75 |
| 1.5.2.2.3.2. Effets sur les cellules endothéliales..... | 76 |
| 1.5.2.2.3.3. Effets sur les ostéoblastes..... | 77 |
| 1.5.2.2.3.4. Effets sur les ostéoclastes..... | 78 |
| 1.5.2.2.3.5. Effets supplémentaires..... | 78 |
| 1.5.2.2.4. L'impact du silicium..... | 78 |
| 1.5.2.2.4.1. Rôle biologique du silicium..... | 78 |
| 1.5.2.2.4.2. Effet sur les cellules endothéliales..... | 79 |
| 1.5.2.2.4.3. Effet sur les ostéoblastes..... | 79 |
| 1.5.2.2.4.4. Effet sur les ostéoclastes..... | 80 |
| 1.6. Brève revue des hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium pour la régénération osseuse et/ou l'angiogenèse..... | 81 |
| 1.6.1. Les hydroxyapatites dopées au cuivre..... | 81 |
| 1.6.2. Les hydroxyapatites dopées au silicium..... | 83 |
| 1.6.3. Bilan des hydroxyapatites substituées au cuivre ou au silicium pour la régénération osseuse et/ou l'angiogenèse..... | 85 |
| 1.7. Conclusions et objectifs de l'étude..... | 86 |
| Partie II. Matériels & Méthodes..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| II.1. Matériaux..... | 87 |
| II.1.1. Synthèse d'hydroxyapatite (HA) | 87 |
| II.1.2. Synthèse d'hydroxyapatite substituée au silicium (Si _{0,4} HA)..... | 87 |
| II.1.3. Préparation d'une hydroxyapatite substituée au cuivre (Cu _{0,1} HA et Cu _{0,5} HA)..... | 88 |
| II.1.4. Caractérisation des poudres..... | 92 |
| II.1.4.1. Diffraction des rayons X | 93 |
| II.1.4.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) | 95 |
| II.1.5. Elaboration de céramiques | 99 |
| II.1.5.1. Pastilles mises en forme par pressage uniaxial | 99 |
| II.1.5.2. Obtention d'une pâte d'hydroxyapatite permettant la mise en forme d'architecture macroporeuse par micro-extrusion | 99 |
| II.1.6. Contrôle des températures de calcination et de frittage | 102 |
| II.1.7. Méthodes de caractérisation..... | 103 |
| II.1.8. Détermination de la taille des grains et des pores par microscopie électronique à balayage | 103 |
| II.1.9. Détermination de la porosité ouverte par la méthode de la poussée d'Archimède | 103 |
| II.1.10. Détermination de la masse volumique des matériaux par pycnométrie..... | 103 |
| II.1.11. Détermination de la surface spécifique de poudres ou de pastilles par la méthode de la BET 8 points | 103 |
| II.1.12. Détermination de la rugosité de surface des pastilles par profilométrie..... | 104 |
| II.1.13. Analyse des éléments chimiques solubles par spectrométrie d'émission optique à couplage plasma inductif (ICP-OES) | 104 |
| II.2. Caractérisation des propriétés biologiques des céramiques à base d'hydroxyapatite | 104 |
| II.2.1. Modèles biologiques : lignées cellulaires | 104 |
| II.2.2. Cellules endothéliales murines : C166..... | 104 |
| II.2.3. Pré-Ostéoblastes murins : MC3T3-E1 Sous-clone 14..... | 105 |
| II.2.4. Conditions de culture cellulaire | 105 |
| II.2.5. Préparation des matériaux céramiques pour la culture cellulaire | 106 |
| II.2.6. Ensemencement des cellules et conditions de culture..... | 106 |
| II.2.6.1. Évaluation des propriétés angiogéniques des HA substituées par le cuivre ou le silicium | 106 |
| II.2.6.2. Développement de modèles de coculture en bioréacteur à flux pour l'évaluation des propriétés biologiques des matériaux céramiques | 107 |
| II.2.6.2.1. Description du bioréacteur à flux en perfusion | 107 |
| II.2.6.2.2. Mise en place des cultures en bioréacteur..... | 109 |
| II.2.7. Évaluation de la réponse des cellules endothéliales C166 aux céramiques à base d'HA substituée par le silicium ou le cuivre..... | 111 |
| II.2.7.1. Mesure de l'activité métabolique par le test de MTT..... | 111 |
| II.2.7.2. Mesure de la mortalité cellulaire par marquage nucléaire à l'iodure de propidium (IP) | 111 |
| II.2.7.3. Mesure de la viabilité cellulaire par marquage à la calcéine | 112 |
| II.2.7.4. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation du 5-Ethynyl-2'- deoxyuridine (EdU) | 112 |
| II.2.7.5. Évaluation de l'expression de protéines impliquées dans l'angiogenèse par Western Blot | 113 |
| II.2.7.6. Expression des gènes associés à l'angiogenèse par RT-qPCR. | 115 |

| | |
|--|-----|
| II.2.7.7. Détection par immunofluorescence et observation <i>in situ</i> de protéines liées à l'angiogenèse..... | 116 |
| II.2.7.8. Détection par imagerie de fluorescence et observation <i>in situ</i> du cytosquelette d'actine | 117 |
| II.2.7.9. Mesures de la sécrétion de VEGF164..... | 117 |
| II.2.7.10. Évaluation de l'activité cellulaire par Wound Healing assay. | 117 |
| II.2.7.11. Dosage des espèces radicalaires intracellulaires par test au diacétate de dichlorodihydrofluorescéine (H ₂ DCFDA) | 118 |
| II.2.8. Analyse de la colonisation des architectures céramiques 3D en HA après monocultures et cocultures dans un système en perfusion dynamique. | 119 |
| II.2.8.1. Mesures de la sécrétion de VEGF164..... | 119 |
| II.2.8.2. Observations du matériel biologique au sein des architectures céramiques en HA par inclusion en résine de poly méthyl méthacrylate (PMMA) et coloration histologique. | 119 |
| II.2.9. Tableaux des anticorps utilisés lors des mesures d'expression et de localisation | 122 |
| II.2.10. Observations des cultures cellulaires par microscopie optique | 122 |
| II.2.11. Analyse d'image | 123 |
| II.2.12. Analyses statistiques | 123 |
| Partie III. Etude <i>in vitro</i> du comportement biologique de C166 à la surface des matériaux en conditions de cultures 2D statiques | 124 |
| III.1. Mise en forme et caractérisations des pastilles de matériaux..... | 124 |
| III.1.1. Frittage des pastilles..... | 124 |
| III.1.2. Apparences et dimensions des pastilles | 125 |
| III.1.3. Caractéristiques chimiques des matériaux..... | 125 |
| III.1.3.1. Caractérisation chimique par DRX | 125 |
| III.1.3.2. Caractérisation chimique par FTIR..... | 127 |
| III.1.4. Caractéristiques physiques des matériaux :..... | 129 |
| III.1.5. Conclusion de la caractérisation physico-chimique des pastilles | 134 |
| III.2. Biocompatibilité des matériaux..... | 137 |
| III.2.1. Démarche expérimentale pour l'étude de la biocompatibilité des matériaux | 137 |
| III.2.2. Croissance et organisation de la population cellulaire sur les matériaux..... | 137 |
| III.2.2.1. Instabilité du tissu de cellules sur Cu _{0,5} HA..... | 151 |
| III.2.3. Activité métabolique | 152 |
| III.2.4. Mortalité des C166 | 153 |
| III.2.5. Prolifération des C166 | 156 |
| III.2.6. Relargage d'éléments chimiques par les matériaux..... | 158 |
| III.2.7. Conclusion de l'étude de la biocompatibilité en modèle statique..... | 163 |
| Partie IV. Etude <i>in vitro</i> des propriétés angiogéniques des matériaux en conditions de cultures 2D statiques | 166 |
| IV.1. Démarche expérimentale de l'évaluation des propriétés angiogéniques des matériaux | 166 |
| IV.1.1. Sécrétion de VEGF164 | 166 |
| IV.1.2. VEGFR2 | 170 |
| IV.1.3. MMP-9 | 176 |
| IV.1.4. PECAM-1 | 182 |
| IV.1.5. VE-Cadhérine | 183 |

| | |
|--|-----|
| IV.1.6. Expression de marqueurs régulateurs de l'angiogenèse | 185 |
| IV.1.6.1. eNOS..... | 185 |
| IV.1.6.2. vWF | 187 |
| IV.1.7. Evaluation de la capacité de fermeture d'une blessure au sein d'une couche de cellules endothéliales C166..... | 188 |
| IV.1.7.1. Influence des milieux conditionnés par les matériaux | 188 |
| IV.1.7.2. Effet de l'acide ascorbique sur la capacité de fermeture de blessure | 192 |
| IV.1.8. Expression <i>in situ</i> de HIF-1 α | 198 |
| IV.1.9. Mesures des espèces radicalaires intracellulaires..... | 202 |
| IV.1.10. Conclusion de l'étude <i>in vitro</i> des propriétés angiogéniques des matériaux en condition de culture statique..... | 209 |
| Partie V. Mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> d'évaluation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques dans un bioréacteur en flux par perfusion | 213 |
| V.1. Démarche expérimentale de la mise en place du modèle <i>in vitro</i> | 213 |
| V.2. Caractéristiques physico-chimiques des architectures d'hydroxyapatite | 213 |
| V.2.1. Mise en forme d'architecture macroporeuse en hydroxyapatite par micro-extrusion | 213 |
| V.2.2. Séchage et frittage | 214 |
| V.2.3. Apparence et dimension des pièces de HA ₄₀₀ | 215 |
| V.2.4. Caractéristiques chimiques de HA ₄₀₀ | 215 |
| V.2.4.1. Caractérisation chimique par DRX..... | 215 |
| V.2.4.2. Caractérisation chimique par FTIR | 216 |
| V.2.5. Caractéristiques physiques de HA ₄₀₀ | 217 |
| V.2.6. Evaluation biologiques préliminaires en 3D dynamique des architectures de HA ₄₀₀ | 220 |
| V.2.7. Etude de la colonisation des architectures HA ₄₀₀ | 220 |
| V.2.7.1. Observation de coupes de HA ₄₀₀ | 220 |
| V.2.7.2. Sécrétion de VEGF164..... | 222 |
| V.2.8. Conclusion de la mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> d'évaluation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques dans un bioréacteur en flux par perfusion | 225 |
| Conclusion | 226 |
| Références bibliographiques | 230 |
| Annexes | 252 |

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation tissulaire des artères et des veines | 21 |
| Figure 2 Anatomie simplifiée du système vasculaire sanguin & lymphatique | 25 |
| Figure 3 : Réseau d'actine de cellules endothéliales quiescentes à confluence d'après la littérature | 28 |
| Figure 4 Angiogenèse par bourgeonnement ou par intussusception | 29 |
| Figure 5 : Organisation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse par bourgeonnement sur surfaces 3D selon la littérature. | 30 |
| Figure 6: Voie simplifiée de HIF1 | 35 |
| Figure 7 Métabolisme simplifié des cellules endothéliales | 37 |
| Figure 8 : Mécanisme d'internalisation de VE-Cadhérine par VEGFA/VEGFR2 | 39 |
| Figure 9: Anatomie de l'os compact et aperçu de l'os spongieux | 44 |
| Figure 10 : Anatomie d'un trabécule d'os spongieux en remodelage | 45 |
| Figure 11 : Anatomie d'un os long | 46 |
| Figure 12 : Anatomie d'un os plat | 47 |
| Figure 13 : Différenciation et devenir final des ostéoblastes matures | 48 |
| Figure 14: Comportement de pré-ostéoblastes et temporalité d'expression de marqueurs ostéogéniques typiques..... | 49 |
| Figure 15 : Anatomie simplifiée d'une unité multicellulaire de base (UMB) et du compartiment de remodelage osseux | 52 |
| Figure 16 : Contrôle du remodelage osseux..... | 54 |
| Figure 17 : Système sanguin au sein de l'os | 59 |
| Figure 18 : Réponse immunitaire à un matériau pro-inflammatoire entraînant une inflammation chronique (encapsulation fibreuse)..... | 62 |
| Figure 19 : Réponse immunitaire à un matériau n'entraînant pas de réponse inflammatoire chronique (ostéo-intégration)..... | 63 |
| Figure 20 : Rôles de protéines adsorbées sur les cellules endothéliales | 67 |
| Figure 21 : Illustration de voies de mécanotransduction impliquées dans la signalisation de l'angiogenèse | 69 |
| Figure 22 : Impact de la rugosité sur la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales | 70 |
| Figure 23 : Illustration du système de synthèse par précipitation en voie aqueuse | 88 |
| Figure 24 : Distribution volumique des particules de Cu _{0,1} HA après 1 min ou 3 h d'attrition.. | 89 |
| Figure 25 : Granulométries en nombre de la poudre Cu _{0,1} HA après 1 min ou 3 h d'attrition . | 90 |
| Figure 26 : Distribution volumique des particules de Cu _{0,5} HA après 1 min et 3 h d'attrition... | 91 |
| Figure 27 : Granulométrie en nombre typiques de Cu _{0,5} HA après 1 min et 3 h d'attrition..... | 92 |

| | |
|---|-----|
| Figure 28 : Diffractogrammes typiques d'une poudre de HA et d'une poudre de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ calcinées à 1000°C sous air pendant 15 h..... | 94 |
| Figure 29 : Diffractogrammes typiques d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ non frittée et d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ frittée à 1100°C sous air pendant 1 h..... | 95 |
| Figure 30 : Spectres FTIR typiques de poudre de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ calcinées à 1000°C pendant 15 h sous air..... | 98 |
| Figure 31 : Distributions volumiques de poudre de HA calcinée à 1055°C pendant 1 h après 1 min ou 90 min d'attrition..... | 100 |
| Figure 32 : Profils granulométriques en nombre d'une poudre de HA calcinée à 1055°C pendant 1 h après 1 min ou 90 min d'attrition..... | 101 |
| Figure 33 : Composition d'une ligne du bioréacteur à flux..... | 108 |
| Figure 34 : Composants d'une chambre de perfusion du bioréacteur à flux..... | 109 |
| Figure 35 : Système de bioréacteur à flux en perfusion au sein de l'incubateur..... | 110 |
| Figure 36 : Scie à fil diamanté..... | 121 |
| Figure 37 : Pastilles $\phi 10$ et $\phi 13$ frittées sous air selon les paramètres du Tableau 8..... | 125 |
| Figure 38 : Diffractogrammes des pastilles frittées sous air de HA (1200°C 30 min), $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ (1100°C 1 h), $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ (1100°C 1 h) et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (1240°C 30 min)..... | 126 |
| Figure 39 : Spectres FTIR des poudres des pastilles frittées de HA (1200°C 30 min), $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ (1100°C 1 h), $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ (1100°C 1 h) et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (1240°C 30 min)..... | 128 |
| Figure 40 : Observations MEB des surfaces des pastilles..... | 130 |
| Figure 41 : Profils types des surfaces des pastilles..... | 133 |
| Figure 42 : Densités cellulaires à la surface des matériaux après 1, 4 et 7 jours de culture..... | 138 |
| Figure 43 : Densité des cellules C166 à la surface des matériaux..... | 139 |
| Figure 44 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 3 jours de culture à la surface des pastilles..... | 141 |
| Figure 45 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 3 jours de culture à la surface des pastilles, observations au grossissement 400X..... | 142 |
| Figure 46 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux..... | 144 |
| Figure 47 : Visualisation du réseau d'actine au niveau des structures circulaires formées par les C166 après 4 jours de culture à la surface des pastilles..... | 146 |
| Figure 48 : Observations 3D (biphoton) des noyaux de C166 à la surface de pastilles après 4 jours de culture..... | 149 |
| Figure 49 : Observation 3D (biphoton) des noyaux de C166 à la surface d'une pastille de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 4 jours de culture..... | 150 |
| Figure 50 : Décollement des C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 4 jours de culture..... | 151 |
| Figure 51 : Activité métabolique des cellules C166 exprimée en pourcentage de la moyenne des valeurs obtenues pour les cellules cultivées sur le matériau HA..... | 152 |

| | |
|---|-----|
| Figure 52 : Localisation de la mortalité des cellules C166 après 7 jours de culture sur les matériaux | 154 |
| Figure 53 : Mortalité des cellules C166 à la surface des pastilles exprimée en pourcentage de cellules mourantes sur la population cellulaire totale mesurée par contre-marquage nucléaire au Hoechst 33342 | 155 |
| Figure 54 : Localisation des noyaux de C166 proliférantes après 3 jours de culture sur les matériaux | 156 |
| Figure 55 : Taux de prolifération des cellules C166 sur les matériaux | 157 |
| Figure 56 : Concentrations de calcium en solution en présence de pastilles | 159 |
| Figure 57 : Concentrations de phosphore en solution en présence de pastilles..... | 160 |
| Figure 58 : Concentrations de cuivre en solution en présence de pastilles | 161 |
| Figure 59 : Sécrétion de VEGF par les C166 après 4 et 7 jours de culture sur les matériaux | 167 |
| Figure 60 : Observation <i>in situ</i> de la localisation de l'expression du VEGF164 dans les populations de C166 après 4 jours de culture sur les matériaux, images composites..... | 168 |
| Figure 61 : Expression <i>in situ</i> de VEGFR2 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux | 171 |
| Figure 62 : Expression <i>in situ</i> de VEGFR2 dans les C166 formant des amas cellulaires après 4 jours de culture sur les matériaux..... | 172 |
| Figure 63 : Expression <i>in situ</i> de VEGFR2 dans les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux. Images combinées..... | 173 |
| Figure 64 : Expression <i>in situ</i> du récepteur membranaire VEGFR2 dans les C166 formant des amas cellulaires après 7 jours de culture sur les matériaux | 175 |
| Figure 65 : Expressions relatives de MMP-9 dans les C166 après 1, 4 et 7 jour(s) de culture sur pastille | 177 |
| Figure 66 : Expression <i>in situ</i> de MMP-9 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux. | 179 |
| Figure 67 : Expression <i>in situ</i> de MMP-9 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux | 180 |
| Figure 68 : Observation <i>in situ</i> de PECAM-1 dans les C166 formant des amas après 4 jours de culture sur les matériaux..... | 182 |
| Figure 69 : Expression <i>in situ</i> de VE-Cadhérine dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux..... | 184 |
| Figure 70 : Expression d'eNOS par les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux.... | 186 |
| Figure 71 : Expression de vWF par les C166 après 7 jours de culture sur matériaux | 187 |
| Figure 72 : Test de fermeture de blessure dans une population de C166 exposées à des milieux conditionnés par les matériaux | 188 |
| Figure 73 : Taux de fermeture d'une blessure par une population de C166 exposées à des milieux conditionnés | 189 |

| | |
|---|-----|
| Figure 74 : Activité métabolique de C166 après 3 jours d'exposition à des milieux conditionnés | 191 |
| Figure 75 : Test de fermeture de blessure par les C166 exposées à des milieux conditionnés par les matériaux et en présence d'acide ascorbique | 193 |
| Figure 76 : Taux de fermeture d'une blessure par une population de C166 exposées à des milieux conditionnés et en présence d'acide ascorbique | 194 |
| Figure 77 : Activité métabolique de C166 après 3 jours d'exposition à des milieux conditionnés en présence d'acide ascorbique. | 197 |
| Figure 78 : Expression <i>in situ</i> de HIF-1 α dans les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux | 198 |
| Figure 79 : Localisation de HIF-1 α dans des C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux en absence d'acide ascorbique..... | 200 |
| Figure 80 : Localisation de HIF-1 α dans des C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux après ajout d'acide ascorbique..... | 201 |
| Figure 81 : Génération d'espèces radicalaires dans les C166 après 4 h d'exposition à des milieux conditionnés | 203 |
| Figure 82 : Génération d'espèces radicalaires dans les C166 après 24 h d'exposition à des milieux conditionnés | 204 |
| Figure 83 : Architecture HA ₄₀₀ après extrusion | 214 |
| Figure 84 : Photographie d'architectures HA ₄₀₀ frittées à 1200°C pendant 1 h avec des rampes à 10°C/min après un déliantage à 500°C avec une rampe de 1°C/min | 215 |
| Figure 85 : Diffractogramme typique de HA ₄₀₀ frittée sous air à 1200°C pendant 1 h..... | 216 |
| Figure 86 : Spectre FTIR de HA ₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h | 217 |
| Figure 87 : Observation MEB de la surface de HA ₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h..... | 218 |
| Figure 88 : Coupes de HA ₄₀₀ après 21 jours de culture..... | 221 |
| Figure 89 : Etudes préliminaires du développement cellulaire à la surface de HA ₄₀₀ | 222 |
| Figure 90 : Sécrétion de VEGF164 de cellules cultivées sur HA ₄₀₀ en bioréacteur à flux | 223 |
| Figure 91 : Illustration du marquage calcéine de C166 cultivées à la surface de Cu _{0,1} HA après 4 jours de culture | 253 |
| Figure 92 : Illustrations de test de fermeture de blessure sur pastilles..... | 254 |
| Figure 93 : marquage <i>in situ</i> typique de Ki67 dans des C166 après 3 jours de culture sur les matériaux | 255 |

Table des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : fiches ICDD-PDF utilisées pour la caractérisation des matériaux..... | 94 |
| Tableau 2 : Bandes vibrationnelles communes utilisées pour la caractérisation de la poudre de HA et de Si _{0.4} HA | 96 |
| Tableau 3 : Bandes vibrationnelles spécifiques utilisées pour la caractérisation de Si _{0.4} HA.. | 97 |
| Tableau 4 : Conditions du Wound Healing assay | 118 |
| Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés pour l'analyse de l'expression et de la localisation de marqueurs | 122 |
| Tableau 6 : Anticorps secondaires utilisées pour l'analyse de l'expression protéique | 122 |
| Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour l'analyse de la localisation de marqueurs . | 122 |
| Tableau 8 : Paramètres de frittage des pastilles | 124 |
| Tableau 9 : Bandes vibrationnelles spécifiques aux Cu _x HA | 127 |
| Tableau 10 : Taille des grains des pastilles | 130 |
| Tableau 11 : Densité et taux de densification des pastilles | 132 |
| Tableau 12 : Rugosité des pastilles mesurée par profilométrie..... | 133 |
| Tableau 13 : Surface spécifique mesurée par la méthode de la BET 8 points | 134 |
| Tableau 14 : Caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés en culture 2D statique | 135 |
| Tableau 15 : Dimensions internes de HA ₄₀₀ | 219 |
| Tableau 16 : Densification de HA ₄₀₀ | 219 |

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ALP** (Alkaline Phosphatase) : Phosphatase alcaline
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **BMP** (Bone Morphogenetic Protein) : Protéine morphogénétique osseuse
- **BSA** (Bovine Serum Albumin) : Albumine sérique bovine
- **BSP I/II** (Bone sialoprotein I/II) : sialoprotéine osseuse de type 1 et 2
- **CCS** : Copper chaperone for superoxyde dismutase 1
- **CE** : Cellule endothéliale
- **C-Fms** également appelée **CSF1R** : Colony stimulating factor 1 receptor
- **COUP-TFII** : Chicken ovalbumin UP-transcription factor II
- **CSH** : Cellule souche hématopoïétique
- **CSM** : Cellule stromale mésenchymateuse
- **Ct** (Cycle threshold) : Cycle seuil
- **CuHA** : Hydroxyapatite substituée au cuivre
- **DCF** : 2', 7' dichlorodihydrofluorescéine
- **DC-STAMP** : Dendrocyte expressed seven transmembrane protein
- **DII4** : Delta-like 4
- **Dlx5** : Distal-less homeobox 5
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium) : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
- **DMP1** : Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
- **DRX** : Diffraction des Rayons X
- **EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- **EGF** (Epidermal Growth Factor) : Facteur de croissance de l'épiderme
- **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) : Technique immuno-enzymatique sur support solide
- **eNOS** (endothelial Nitric Oxide Synthase) : Oxyde Nitrique Synthase endothéliale
- **EphB4** : Erythropoietin-producing hepatoma receptor B4
- **ERO1** : Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1
- **FGF** (Fibroblast Growth Factor) : Facteur de croissance des fibroblastes
- **FIH-1** (Factor inhibiting HIF-1) : facteur inhibiteur de HIF-1
- **FTIR** : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
- **HA** : Hydroxyapatite

- **hCTR1** : High affinity copper uptake protein 1
- **HIF-1** (Hypoxia Inducible Factor-1) : Facteur induit par l'hypoxie 1
- **HRP** (Horseradish peroxidase) : Peroxydase de raifort
- **HUAEC** (Human Umbilical Artery Endothelial Cells) : Cellules endothéliales humaines de l'artère ombilicale
- **HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) : Cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale
- **IGF-1** (Insulin-like Growth Factor-1) : Facteur de croissance similaire à l'insuline 1
- **IL** (interleukin) : Interleukine
- **M-CSF** (Macrophage colony-stimulating factor) : Facteur stimulateur des colonies de macrophages
- **MEM- α** (Minimal Essential Medium alpha) : Milieu minimum essentiel alpha
- **MMA** : Méthyl Méthacrylate
- **MMP** (Matrix Metalloprotease) : Métalloprotéase matricielle
- **NFATc1** : Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
- **NO** (Nitric Oxide) : Oxyde Nitrique
- **NOX4** : NADPH Oxydase 4
- **PBMC** (Peripheral Blood Mononuclear Cell) : Cellule mononucléée du sang périphérique
- **PBS** (Phosphate Buffer Saline) : Tampon phosphate salin
- **PCR** (Polymerase Chain Reaction) : Réaction en chaine par polymérase
- **PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor) : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
- **PECAM-1** : Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
- **PHD** (prolyl hydroxylase) : Prolyl hydroxylase
- **PHOSPHO1** : Phosphoethanolamine/Phosphocholine phosphatase 1
- **Pi** : Phosphate inorganique
- **PKC** : Protéine Kinase C
- **PLC** : Phospholipase C
- **PLD** : Phospholipase D
- **PIGF** : (Placental Growth Factor) : Facteur de croissance du placenta
- **PROX1** : Prospero homeobox protein 1
- **PTH** : Hormone parathyroïdienne
- **PV-1** : Plasmalemma Vesicle associated protein 1

- **RANK** (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B) : Activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa-B
- **RANKL** (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) : Ligand de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa-B
- **ROS** (Reactive Oxygen Species) : Espèces Réactives de l'Oxygène
- **RT** (Reverse transcriptase) : Transcriptase inverse / Rétrotranscriptase
- **Runx2** (Runt-related transcription factors 2) : Facteur de transcription apparenté à Runt 2
- **SDS** : dodécylsulfate de sodium
- **SDS-PAGE** (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
- **SiHA** : Hydroxyapatite substituée au silicium
- **SOD1-2** (superoxide dismutase 1-2) : Superoxyde dismutase 1 ou Superoxyde dismutase 2
- **SVF** : Sérum de veau foetal
- **TAZ** : Transcription Activator with PDZ binding motif
- **TBHP** : Hydroperoxyde de tert-butyle
- **TBS** (Tris Buffer Saline) : Tampon Tris salin
- **TGFβ** (Transforming Growth Factor β) : facteur de croissance transformant β
- **TGS** : Tris Glycine SDS
- **Tie-1/Tie-2** : Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains -1 / -2
- **TIMP** (tissue inhibitor of matrix metalloprotease) : Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéases Matricielles
- **TNF** (Tumor Necrosis Factor) : Facteur de nécrose tumorale
- **TRAP** (Tartrate-resistant acid phosphatase) : phosphatase acide résistante au tartrate
- **VCAM** (Vascular Cell Adhesion Molecule) : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
- **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- **VEGFR2** (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) : récepteur 2 au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- **Wnt** : wingless-related integration site
- **YAP** : Yes-Associated Protein

Partie I. Introduction bibliographique

I.1. Préambule : La réparation des lacunes osseuses à fort risque de non-consolidation

Les os sont des structures solides sur lesquels sont ancrés le reste de l'organisme. Sans prendre en considération leurs fonctions biologiques complexes qui seront développées plus en aval de ce document, ils sont les supports de la morphologie, des mouvements et ils protègent l'intégrité physique des tissus mous vitaux (cerveau, cœur, poumons...). Ces fonctions mécaniques font qu'ils peuvent se retrouver amputés d'une importante partie de leur structure. A la suite de circonstances traumatiques graves (accidents...) ou dans les cas d'importants désordres organiques (infections, cancer...) de larges volumes osseux peuvent être durablement dégradés. Les opérations chirurgicales nécessaires à la suite de ces événements conduisent fréquemment à l'exérèse des débris d'os ou de l'os malade ce qui peut conduire à de larges pertes de substance osseuse.

Quand ces lacunes ne dépassent pas deux fois le diamètre de l'os lésé, elles peuvent être réparées naturellement après une immobilisation chirurgicale évitant ainsi l'apparition d'un tissu fibreux non minéralisé, qualifié de pseudarthrose, sans propriétés mécaniques satisfaisantes. Si la lacune dépasse deux fois le diamètre de l'os lésé on parle alors de défaut de taille critique et la réparation de ces lacunes ne peut pas se faire naturellement même après immobilisation complète du site lésé, la pseudarthrose est inévitable (1). Par ailleurs, des fractures des os longs de taille non critique peuvent ne pas réussir à se consolider naturellement et entraîner la persistance de la lacune osseuse. Ce phénomène peut être dû à des facteurs externes (tabagisme, infection), internes (âge, diabète) et à la nature de la fracture et/ou de la chirurgie associée (fracture ouverte, stabilité mécanique insuffisante...) (2).

Aux Etats-Unis une estimation de 100 000 fractures non consolidées par an, toutes causes confondues, a été avancée. Les personnes concernées par ces échecs thérapeutiques se retrouvent régulièrement incapables de travailler et en détresse psychologique du fait du stress, des douleurs éventuelles et de leur isolement. Ce coût humain entraîne un coût économique pour la société, il a été estimé qu'une fracture non consolidée entraîne un surcoût global allant de 11 000 \$ (en 1997) à 30 000 £ (en 2006) selon les études. Ce surcoût est lié à plus des deux tiers à l'impossibilité pour les patients de travailler pendant des périodes prolongées et d'autres surcoûts sont entraînés par l'état psychologique dégradé des malades (3).

Pour prévenir ou guérir ces fractures non consolidées et combler efficacement les lacunes osseuses, il est nécessaire d'utiliser un substitut osseux permettant de faire la liaison entre les extrémités disjointes. La méthode de référence est l'autogreffe osseuse (greffe d'un morceau d'os du patient sur le site lésé) car elle possède toutes les propriétés exigées d'un substitut : elle est biocompatible (pas de cytotoxicité, pas de rejet immunitaire), ostéoconductrice (sa structure poreuse facilite le développement de nouveau tissu), ostéoinductrice (elle stimule l'initiation de l'ostéogenèse, la croissance de l'os) et résorbable (le nouvel os formé finira par la remplacer entièrement) (4). Cependant, l'autogreffe est un morceau d'os sain prélevé au patient qui présente une autre zone osseuse à fort risque de non-consolidation et cette opération demande une chirurgie dédiée. Selon les circonstances, il n'est pas toujours souhaitable ou possible de risquer des pertes sanguines, des infections ou de rajouter des douleurs opératoires à des patients souffrants déjà de leur condition. De plus, les os disponibles pour servir d'autogreffe ne sont pas toujours de qualité ou en quantité suffisante

dans le corps. Cette disponibilité est notamment un important défi en chirurgie pédiatrique (5). Il existe donc un autre type de greffes : les allogreffes prélevées à un autre individu que le receveur. Elles doivent être stérilisées et leurs cellules doivent être retirées pour éviter les risques d'infections et de rejet immunitaire. Malheureusement les étapes nécessaires pour atteindre ces objectifs leur font perdre leur capacité à soutenir l'ostéogenèse en diminuant leurs capacités ostéoinductrice et ostéoconductrice ainsi qu'en réduisant leurs propriétés mécaniques de moitié (4). De plus, la stérilisation est rarement parfaite ce qui peut entraîner des infections osseuses, particulièrement graves et difficiles à traiter qui peuvent empêcher la consolidation des sites lésés (2).

Du fait des limitations de ces principaux substituts organiques, des alternatives inorganiques ont été recherchées et développées. L'objectif de ces alternatives est d'obtenir un matériau ayant des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices adaptées à l'ostéogenèse tout en étant biocompatible et résorbable. En conséquence de ces exigences, les matériaux étudiés comme substitut osseux pour servir d'implant dans les zones à fort risque de non-consolidation sont en partie des céramiques, majoritairement à base de calcium et phosphore (4). On retrouve principalement dans ces céramiques biocompatibles le phosphate tricalcique (TCP), l'hydroxyapatite phosphocalcique et le phosphate de calcium biphasique (un mélange d'hydroxyapatite et de TCP).

Le TCP, et notamment la forme β -TCP, de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de ratio molaire Ca/P égal à 1,5, présente une excellente ostéoconduction mais se résorbe rapidement (4 à 8 semaines) de son site d'insertion du fait d'une solubilité importante. Cependant, cette durée est trop courte, elle laisse trop peu de temps pour la formation d'un nouvel os sur un grand volume. Son utilisation est donc limitée au comblement de lacunes osseuses de petit volume.

L'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ de ratio molaire Ca/P 1,67 possède sous forme implantable macroporeuse de bonnes propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices. Ce biomatériau est a priori résorbable mais près de dix fois plus lentement que le TCP, du fait d'une très faible solubilité. Cette propriété le classe parmi les implants permanents non résorbables mais bioactifs en surface. Ses propriétés mécaniques modestes sous forme de pièce céramique macroporeuse le rendent inadapté à l'implantation dans des sites lésés sous forte contrainte mécanique.

Le phosphate de calcium biphasique tente de combiner à la fois la grande résorbabilité du TCP et la plus faible résorbabilité de l'hydroxyapatite. Ainsi ses propriétés dépendent fortement des ratios utilisés.

L'utilisation de ces substituts en tant qu'implants osseux permet d'obtenir des résultats satisfaisants pour les lacunes de taille réduite. Malheureusement, ils ne permettent pas toujours de combler les lacunes de plus grande taille, dont les dimensions dépendent du type d'os et du type de lacune. Par conséquent, les autogreffes restent la méthode de choix (6), (7), (4), (8). Il a été proposé qu'une grande partie des échecs de ces biomatériaux provienne d'un défaut de vascularisation au sein de la zone lésée entraînant la mort des cellules impliquées dans la réparation de l'os et la formation d'un tissu fibreux empêchant ensuite la croissance osseuse (9), (10), (7).

Plusieurs aspects sont donc critiques pour un implant osseux se voulant biocompatible, ostéoinducteur, ostéoconducteur et résorbable. Il doit posséder une chimie et une topographie de surface adaptées à la survie et aux fonctions des cellules environnantes. Il doit posséder une structure 3D modulable pour s'adapter à la zone lésée. Il doit être mécaniquement adapté

aux contraintes exercées sur la zone lésée pendant la réparation mais aussi adaptée aux cellules se développant à sa surface. Il doit être macroporeux avec des pores capables d'accueillir l'os en formation et les vaisseaux sanguins pour le nourrir. Enfin, il doit être capable d'adsorber des protéines à sa surface pour permettre le développement d'un tissu biologique à sa surface (8). L'hydroxyapatite possède la majeure partie de ces caractéristiques désirables avec deux exceptions : mécaniquement elle semble être inadaptée à des zones à forte contrainte mais sa résistance réelle en condition d'implantation n'a pas été évaluée, sa stabilité à long terme dans la zone lésée, qui est le facteur essentiel pour une bonne consolidation de l'os, n'est pas connue (6). L'autre exception est sa chimie, celle de l'hydroxyapatite pure lui confère des propriétés d'ostéoconduction mais manque d'un effet promouvant la vascularisation qui permettrait de nourrir les cellules colonisant l'implant (7).

Cette thèse s'inscrit dans le projet : « Plateforme de caractérisation des interfaces biomatériau-cellules dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse » (CharaBioC) financé par l'agence nationale de la recherche (ANR). Ce projet vise à mettre en place un dispositif de caractérisation *in vitro* des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques intégré à la chaîne d'élaboration des matériaux céramiques au laboratoire. Cette thèse explore la problématique de la vascularisation au sein des implants osseux à base d'hydroxyapatite en évaluant les propriétés angiogéniques et angioconductrices d'hydroxyapatite phosphocalcique pure ou partiellement substituée avec les éléments chimiques cuivre ou silicium. L'incorporation de ces éléments dans des biomatériaux orthopédiques entraîne une augmentation de la vascularisation, une accélération et une amélioration de la réparation osseuse (11) (12). Les effets favorables du cuivre sont attribués principalement à sa capacité, sous forme soluble, de stimuler directement les cellules endothéliales et favoriser l'angiogenèse (13). Quant au silicium il stimule l'ostéogenèse (14) et l'angiogenèse (12) sous forme soluble. L'objectif de cette thèse est également de comprendre en détail les effets des éléments dopants et les mécanismes biologiques à l'œuvre. De plus, l'évaluation des propriétés d'implants d'hydroxyapatite dans un modèle 3D *in vitro* de bioréacteur permettant la perfusion continue a été conjointement réalisée afin de mieux comprendre les phénomènes biologiques à l'œuvre à la surface de ces implants dans des conditions se rapprochant de la physiologie du vivant.

Une introduction bibliographique porte en premier lieu sur le système vasculaire, l'angiogenèse qui lui donne forme, le tissu osseux, l'ostéogenèse associée, afin de cerner le système dans lequel doivent évoluer les céramiques. Un second développement traite des céramiques d'hydroxyapatites substituées, notamment par les éléments silicium et cuivre qui sont utilisées dans la partie expérimentale. Ce développement contient des exemples de travaux ayant étudiés les effets biologiques et les mécanismes d'action des éléments dopants. Il contient également des études sur des biomatériaux céramiques s'intéressant à la problématique de la réparation osseuse et de l'angiogenèse. Cette dernière partie permet de montrer la nécessité des démarches expérimentales développées dans cette thèse.

I.2. Système vasculaire et angiogenèse

I.2.1. Le système vasculaire

Le système vasculaire est la structure transportant les fluides de deux systèmes ayant des fonctions distinctes mais interconnectées et complémentaires : le système vasculaire sanguin qui assure le transport du sang et le système vasculaire lymphatique qui permet le drainage des fluides interstitiels. Ces deux systèmes sont essentiels à l'homéostasie des

systèmes vivants en distribuant énergie, informations et acteurs (molécules et cellules) de la protection et de l'immunité de l'organisme. Le système vasculaire est vital et indispensable, il possède une organisation complexe et adaptée aux besoins globaux et locaux de l'organisme.

I.2.1.1. Le système vasculaire sanguin

Le système vasculaire sanguin est spécialisé dans le transport et la diffusion du sang au sein de l'organisme grâce aux flux générés par la pompe cardiaque. Ses rôles sont multiples : l'alimentation des cellules par le transport de l'oxygène et des nutriments contenus dans le sang ; la récupération du dioxyde de carbone pour son élimination dans les alvéoles pulmonaires ; le transport des déchets métaboliques vers les organes spécialisés dans leur élimination comme le foie et les reins. De plus, le sang est un milieu essentiel pour la communication intra-organisme par le biais du transport de nombreuses molécules de communication à l'instar des chimiokines : des cytokines (petites protéines solubles essentielles à la communication intercellulaire) contrôlant la migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation (ex : blessure) par chimiotaxie (attraction ou répulsion de cellules selon un gradient chimique).

Pour permettre et moduler le déplacement du sang, le système vasculaire sanguin se compose de deux classes de vaisseaux de taille variable autorisant des jeux de pressions vasculaires : les artères et les veines dont des coupes schématiques sont présentées dans la Figure 1.

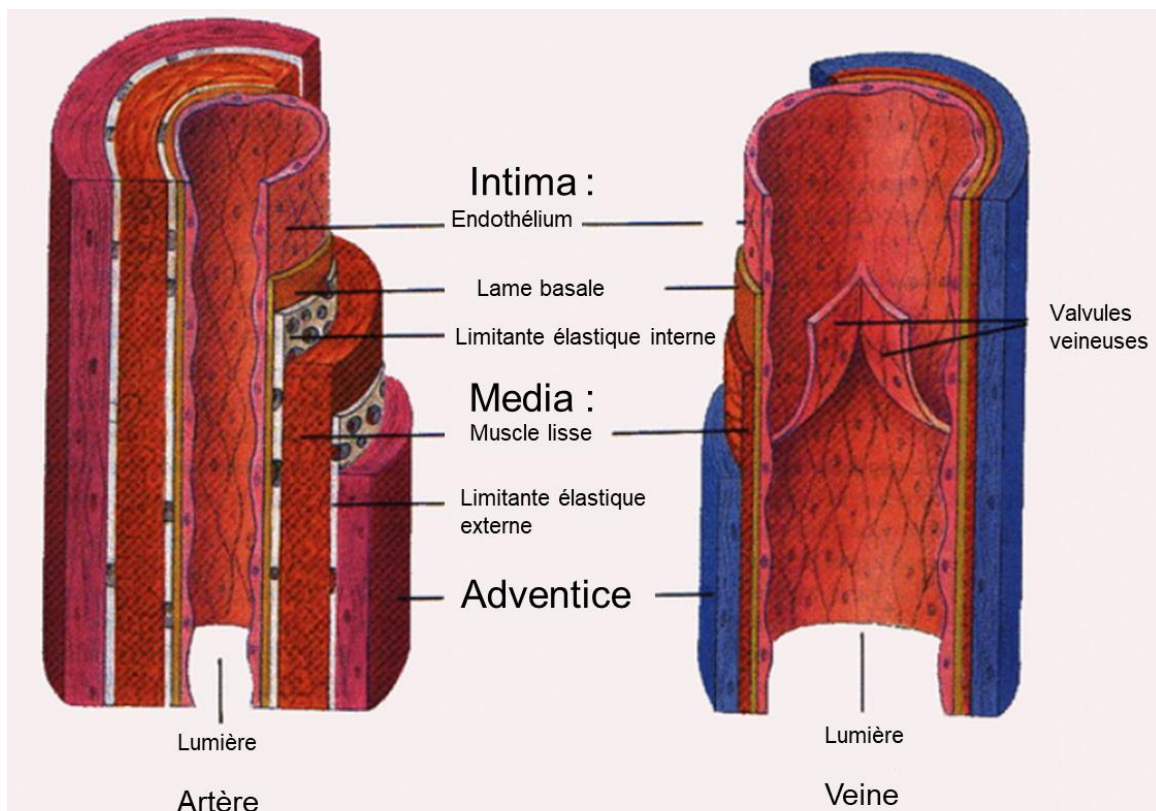


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation tissulaire des artères et des veines

Schéma adapté de (15)

Ces deux classes de vaisseaux sanguins, artères et veines (Figure 1), sont composées de trois couches tissulaires ou tuniques :

- une couche interne appelée *tunica intima*, ou intima, composée de l'endothélium et de la lame basale. L'endothélium correspond à la couche de cellules endothéliales en contact avec le sang dans la lumière du vaisseau. Cette couche de cellules endothéliales repose sur une lame basale composée de fibres de collagène et de fibres élastiques. Cette dernière couche forme dans les artères une couche distincte, appelée la limitante élastique interne, qui est absente des veines. Les veines possèdent une structure qui leur est propre car leur intima forme dans leur lumière des valves anti-retour, appelées valvules veineuses, par une protrusion de l'endothélium soutenu par la lame basale.
- La couche médiane est appelée *tunica media*, ou *media*, et est composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. Dans les artères, cette couche est généralement la plus épaisse des trois et possède de nombreuses cellules musculaires lisses, parfois sur plusieurs étages, orientées perpendiculairement par rapport au vaisseau et qui lui permettent de modifier son diamètre. Dans les artères, les nombreuses fibres élastiques forment une couche au-dessus des cellules musculaires lisses qui est appelée la limitante élastique externe. Dans les veines, les cellules musculaires lisses sont moins organisées que dans les artères. La limitante élastique externe n'y est pas une structure clairement définie et son absence est même plus souvent mise en avant comme fait caractéristique.
- La couche externe est appelée *tunica adventitia* ou adventice. C'est un tissu conjonctif avec un rôle de support reflété par une composition majoritairement de fibres de collagènes avec quelques fibres élastiques. L'épaisseur de cette couche externe représente jusqu'à la moitié de l'épaisseur de la paroi des artères et cette proportion est généralement plus importante encore dans les veines. Enfin, les plus gros vaisseaux artériels et veineux possèdent eux-mêmes dans leur adventice leur propre système sanguin appelé *vasa vasorum* et sont innervés par les nerfs du *nervi vasorum* (16).

Ces spécificités structurelles et cellulaires des artères et des veines (Figure 1) s'expliquent par des fonctions différentes : en règle générale, une artère distribue du sang récemment oxygéné depuis le cœur ; les veines ramènent vers celui-ci le sang appauvri en O₂ et enrichi en CO₂ résultant de la respiration cellulaire. Une exception à cette règle est présente au niveau du système vasculaire pulmonaire : les artères pulmonaires amènent du sang appauvri dans les alvéoles pulmonaires, celui-ci y est oxygéné et ce sont les veines pulmonaires qui emmènent le sang oxygéné dans l'oreillette gauche du cœur.

Pour ajuster l'alimentation des tissus à leur besoin, en complément de l'ajustement des pulsations cardiaques, les artères peuvent réguler le débit sanguin passant par leur endothélium en régulant le diamètre de leur lumière. Ce contrôle du diamètre est fait par les cellules musculaires lisses de leur media avec leur jeu de relaxation et de contraction. Cette capacité est conservée dans une moindre mesure par les veines du fait de leur media moins contractile. Pour assurer un retour veineux efficace, ces dernières possèdent des valves anti-retours qui en retenant le sang en place entre les pulsations cardiaques permettent de le ramener vers le cœur malgré des pressions plus faibles.

Les artères et les veines assurent le transport du sang mais pour sa diffusion, une troisième classe de vaisseaux sanguins est nécessaire. Ce sont les capillaires qui assurent la distribution de l'O₂, des nutriments, la récupération du CO₂ et des déchets métaboliques. Cette classe de très fins vaisseaux sanguins reliant une artère et une veine (souvent même une artériole, une

petite artère, et une veinule, une petite veine) est présente dans l'ensemble de l'organisme. Là où les gros vaisseaux de transport du sang sont hermétiques les capillaires eux peuvent être perméables et permettent la diffusion profonde des composés. Ils présentent une importante diversité d'identité moléculaire et fonctionnelle avec plus d'une dizaine de types différents identifiés (17).

Ces différents phénotypes s'organisent globalement selon l'une des trois organisations structurales suivantes (des schémas de ces organisations sont visibles ultérieurement dans la partie supérieure de la Figure 2) :

- les capillaires continus qui permettent le passage d'eau et de solutés de taille inférieure à 3 nm entre les jonctions serrées des cellules endothéliales. Les autres composés sont transportés à l'aide de canaux trans-endothéliaux (des canaux sélectifs situés entre les cellules endothéliales) ou par transcytose (les composés internalisés par des vésicules, généralement formées de cavéoline sur le pôle apical des cellules, sont transportés vers leur pôle basal et traversent ensuite l'endothélium). Ils se retrouvent dans le cerveau, la peau, le cœur et les poumons (18).
- Les capillaires fenestrés qui possèdent des cellules endothéliales avec des pores transcellulaires (traversant la cellule), appelés *fenestrae*, d'environ 70 nm de diamètre et qui possèdent eux-mêmes un diaphragme non membranaire de 5 à 6 nm d'épaisseur composé notamment de la protéine membranaire intégrale PV-1 (Plasmalemma Vesicle associated protein 1) (19). Ce diaphragme, absent uniquement des capillaires glomérulaires (au niveau des reins), augmenterait la sélectivité des fenestrations. Leur capacité à transporter de l'eau et des petits solutés est augmentée par rapport aux capillaires continus mais les grandes molécules sont tout autant bloquées. Le nombre des fenestrations et leur localisation dans l'endothélium dépendrait de la zone vascularisée. Ces capillaires se retrouvent dans les tissus impliqués dans la filtration ou la sécrétion comme les glandes exocrines¹, endocrines² ou les glomérules rénaux (18).
- Les capillaires discontinus formés de cellules endothéliales possèdent des fenestrations de 100 à 200 nm de diamètre sans diaphragme et des pores circulaires transmembranaires. De plus, la lame basale sous-jacente est incomplète. Ces capillaires laissent passer eau, solutés et grosses molécules aisément mais leurs cellules endothéliales possèdent souvent de nombreux puits recouverts de clathrine³(20) à leur surface. Ces puits leur permettent d'internaliser sélectivement les composés extérieurs qui sont ensuite recyclés ou dégradés. Malgré ces larges ouvertures, ces cellules endothéliales transportent également des composés par transcytose (au travers de la cellule dans leur cas, de la lumière vers le milieu extérieur). On les retrouve notamment dans les vaisseaux sinusoides

¹ Exocrine désigne une sécrétion du composé à l'extérieur de l'organisme ou dans une cavité qui y communique.

² Endocrine désigne une sécrétion où le composé est relargué dans le sang et peut rencontrer un récepteur dans tout l'organisme.

³ La clathrine est une protéine intracellulaire qui en interagissant avec la membrane plasmique forme des invaginations de cette dernière. Quand la clathrine polymérise, les invaginations sont refermées ce qui conduit à la formation de vésicules intracellulaires recouvertes de clathrine.

du foie, avec des variations de leur discontinuité selon la région du foie considérée (18), et dans les vaisseaux de la moelle osseuse.

Les capillaires ne possèdent pas de tunique mais sont entourés d'une lame basale et de péricytes. Ces derniers sont des cellules murales ayant une importante fonction dans la stabilité structurelle des capillaires et la régulation du transport de composés au travers de l'endothélium. De plus, certains des péricytes pourraient posséder des fonctions contractiles, notamment au niveau de la barrière hémato-encéphalique pour y réguler le débit sanguin (17). Les péricytes sont des cellules dont la différenciation peut être annulée *in vitro* pour obtenir des cellules multipotentes. Il n'est pas certain qu'ils possèdent ces propriétés de cellules souches multipotentes *in vivo* mais ils jouent un rôle dans la régénération des tissus (21), (22).

La conséquence de la porosité variable des capillaires est que la phase liquide du sang se perd petit à petit dans les tissus perfusés. Cela est nécessaire pour leur hydratation, leur nutrition et parfois pour les fonctions sécrétrices ou filtrantes de certains organes. Ces pertes, de l'ordre de plusieurs litres par jour, doivent être compensées et une récupération est nécessaire pour éviter la survenue d'œdème et pour maintenir une volémie fonctionnelle pour le système circulatoire (23).

I.2.1.2. Le système vasculaire lymphatique

La récupération de la phase liquide du sang diffusée dans les tissus et les fluides interstitiels, est réalisée par le système vasculaire lymphatique. C'est un système similaire au système vasculaire sanguin auquel il est principalement connecté au niveau des veines sous-clavières, là où la majeure partie des liquides collectés est remise en circulation. Pour accomplir leur fonction, les vaisseaux lymphatiques, comme les vaisseaux sanguins, présentent une grande hétérogénéité de structures selon les organes connectés. Toutefois tous possèdent une couche de cellules endothéliales formant un endothélium au niveau de leur lumière et deux types principaux de vaisseaux peuvent être identifiés :

- les vaisseaux lymphatiques initiaux qui ont une extrémité ouverte de quelques dizaines de micromètres (jusqu'à 50 μm). Leur endothélium est entouré d'une lame basale discontinue et ils n'ont pas de cellule musculaire lisse. Ils peuvent posséder des valves anti-retours formées par leur endothélium qui permettent de ramener la lymphe⁴ à leur autre extrémité connectée au second type de vaisseau :
- les vaisseaux lymphatiques collecteurs qui possèdent une lame basale continue recouverte de cellules musculaires lisses autour de leur endothélium. Ils sont organisés en courts segments appelés lymphangions. Ces segments sont séparés entre eux par des valves anti-retours formées par l'endothélium et ils possèdent une tunique plus épaisse bordée de cellules musculaires lisses.

Pour transporter la lymphe, les vaisseaux initiaux et les vaisseaux collecteurs utilisent le pompage extrinsèque. Ce terme définit des jeux de pressions générés par des structures externes au système lymphatique comme les mouvements musculaires, la respiration, les mouvements des vaisseaux sanguins ou du tube digestif et les compressions extérieures. Les vaisseaux collecteurs utilisent également un mécanisme actif de contraction appelé pompage

⁴ La lymphe désigne les fluides interstitiels récupérés par le système lymphatique, elle est une version du sang sans globule rouge, appauvrie en O_2 et nutriments et enrichie en déchets métaboliques.

intrinsèque grâce à leur tunique bordée de cellules musculaires lisses et aux valves anti-retours au sein de leur endothélium (23).

La Figure 2 schématise les principaux types de vaisseaux sanguins et lymphatiques :

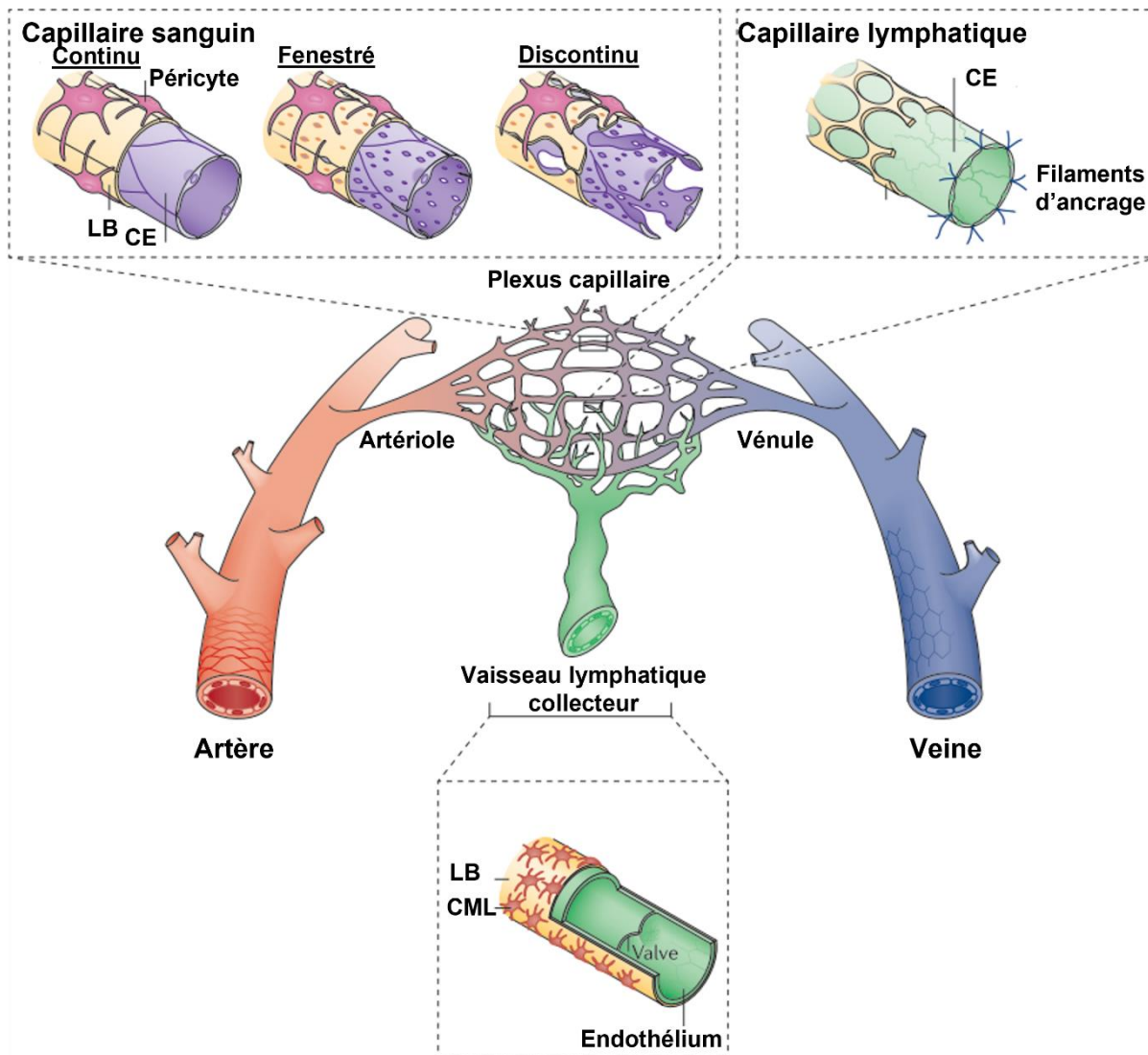


Figure 2 Anatomie simplifiée du système vasculaire sanguin & lymphatique

En haut à gauche : capillaires sanguins continus, fenestrés et discontinus. LB : lame basale ; CE : cellule endothéliale. En haut à droite : capillaire lymphatique. Les filaments d'ancrage, représentés en bleu, servent à ancrer le capillaire dans son environnement. Centre : arbre vasculaire schématisé : les artères précèdent les veines, ces vaisseaux sont connectés par des capillaires.

Les vaisseaux lymphatiques transportent les fluides interstitiels à proximité des capillaires. Bas : coupe schématisée de vaisseau lymphatique. CML : cellule musculaire lisse.

Figure adaptée depuis (17)

Les vaisseaux sanguins présentent donc une très grande hétérogénéité phénotypique, résumée en Figure 2. Cette diversité découle des besoins fonctionnels des tissus et organes irrigués. Cette hétérogénéité se retrouve également au niveau cellulaire et moléculaire où les endothéliums et les lames basales sont spécifiques à chaque type de vaisseau (24).

I.2.2. La première brique du système vasculaire : la cellule endothéliale

I.2.2.1. Généralités sur les cellules endothéliales

Le composant commun et essentiel à toutes les structures vasculaires est la cellule endothéliale. Ce type cellulaire est capable de migrer et d'organiser son cytosquelette de sorte à ce qu'une population de cellules endothéliales peut s'assembler en tubules creux. Ces cellules forment ainsi les endothéliums avec des caractéristiques adaptées aux fonctions du vaisseau qu'elles composent. Il n'existe qu'un seul type de cellules endothéliales mais elles présentent des phénotypes différents en fonction du vaisseau qu'elles constituent et des besoins environnants. C'est un type cellulaire majoritairement quiescent en condition physiologique et dont la durée de vie moyenne dépasse 1 an. Leur forme dépend fortement du vaisseau duquel elles font partie : généralement plates, elles peuvent adopter une forme cuboïde dans certaines veinules alors qu'elles sont typiquement longues et étroites dans l'artère aorte, qu'elles deviennent rectangulaires dans l'artère pulmonaire, rondes dans la veine pulmonaire, longues et rectangulaires dans la veine cave et irrégulières dans les capillaires et les veinules à leur proximité. Leur longueur et leur surface totale sont généralement plus importantes dans les artères que dans les veines. La surface d'une cellule endothéliale d'artériole est en moyenne de $1200 \mu\text{m}^2$ contre $600 \mu\text{m}^2$ au sein d'une veinule. De plus, leur épaisseur peut varier $0,1 \mu\text{m}$ dans les capillaires jusqu'à $1 \mu\text{m}$ dans l'aorte (18).

Il est désormais admis que lors du développement, les cellules endothéliales ne deviennent pas « artérielles » ou « veineuses » qu'en fonction du contexte mécanique dans lequel elles se trouvent mais que leur spécification dépend de l'expression de marqueurs clefs lors du développement embryonnaire. Les cellules endothéliales veineuses sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription COUP-TFII (Chicken ovalbumin UP-transcription factor II). Les cellules endothéliales artérielles sont caractérisées par l'expression du récepteur 2 au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2), de la protéine Notch et de Dll4 (Delta-like 4). Les vaisseaux lymphatiques sont définis par l'expression de la protéine Prox1 (Prospero homeobox protein 1). Ces spécificités de marqueurs sont en partie conservées dans les organismes adultes avec notamment une expression importante du récepteur des éphrines EphB4 (Erythropoietin-producing hepatoma receptor B4) dans les veines et de la protéine éphrine-B2 dans les artères (25). Cette spécification n'est cependant pas figée chez l'adulte et dépend du contexte physiologique, par exemple au niveau des fistules artérioveineuses (la connexion d'une artère et d'une veine sans passer par des capillaires), on retrouve des cellules endothéliales avec une expression veineuse d'EphB4 et une expression artérielle d'éphrine-B2 concomitante. Le flux sanguin et les signaux paracrines⁵ sont notamment capables d'influencer le phénotype des cellules qui y sont exposées (16).

Les cellules endothéliales sont particulièrement sensibles au contexte mécanique les entourant, le stress de cisaillement au sein d'un vaisseau définissant la forme qu'elles adoptent. Dans les artères où le flux est fort (stress de cisaillement de 1-4 Pa) et principalement non turbulent les cellules endothéliales sont allongées et orientées le long de celui-ci, sauf dans les zones de branchements typiquement turbulentes où les cellules endothéliales ne sont plus orientées. Similairement, dans les veines où le flux est plus faible (stress de cisaillement de 0,1-0,5 Pa) et turbulent, les cellules endothéliales sont arrondies et non orientées. Pour être affectées par le stress de cisaillement exercé par le flux, certaines

⁵ Signaux échangés d'une cellule à une autre cellule dans sa proximité immédiate

cellules endothéliales sont par ailleurs équipées de cils cellulaires à même de repérer les faibles contraintes de cisaillement de petits flux turbulents (16), (18).

Ces différences de phénotypes sont également observées au niveau des jonctions cellulaires, les cellules endothéliales utilisent les jonctions adhérentes et les jonctions serrées pour maintenir une cohésion de l'endothélium. Les jonctions adhérentes jouent un rôle d'ancrage des cellules entre elles et avec la lame basale. Les jonctions serrées rapprochent et peuvent imperméabiliser les vaisseaux en scellant l'espace entre les cellules endothéliales à l'aide de réseaux de protéines transmembranaires transcellulaires. Ces deux types de jonctions cellulaires sont plus fortement exprimées dans toutes les artères que dans les veines, et les jonctions serrées sont notoirement peu organisées dans les veinules (16).

1.2.2.2. Le cytosquelette d'actine dans les cellules endothéliales

Le cytosquelette d'actine est un des réseaux de filaments intracellulaires avec les filaments intermédiaires et les microtubules, constituant le cytosquelette. Ce dernier permet l'ancrage et la mobilité des cellules dans leur environnement mais aussi de vésicules et d'organites intracellulaires. Le cytosquelette d'actine est essentiel aux premières fonctions à savoir la motilité et l'ancrage des cellules. Les filaments d'actine sont formés par la polymérisation d'actine globulaire et traversent de part en part les cellules. Ils permettent la génération de force motrice à l'aide du déplacement de protéines appelées myosines à leur surface et cet ensemble moteur est appelé fibre de stress. Des filaments d'actine servant à l'ancrage des cellules, sont également positionnés sous la membrane plasmique où ils sont connectés à des ensembles protéiques reliés à l'environnement extracellulaire. L'état de tension d'une cellule endothéliale est un indicateur de son état physiologique : les cellules d'un endothélium quiescent sont faiblement contractiles par rapport à celles d'un endothélium activé par des signaux inflammatoires ou angiogéniques. Lorsque l'activation provient de signaux pro-angiogéniques comme un gradient du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor), les cellules endothéliales vont développer des fibres de stress permettant leur migration (26). Lorsque les signaux sont inflammatoires, des fibres de stress sont créées pour générer des ouvertures par contraction de l'endothélium ce qui permet la diffusion des facteurs inflammatoires et le passage des cellules immunitaires par extravasation⁶ (27). *In vivo* la répartition, l'orientation et la taille des filaments d'actine sont spécifiques d'un vaisseau. Par exemple, les cellules endothéliales constitutives des veines et des veinules possèdent des réseaux d'actine dispersés de faible longueur (~20 µm) formés de nombreuses fibres de stress orientées le long de l'axe du vaisseau. Les cellules endothéliales constitutives des artérioles et des capillaires sont composées d'un réseau ininterrompu de fibres de stress présentes sur toute la longueur du vaisseau et orientées le long de son axe (28).

In vitro, les cellules endothéliales au sein d'un endothélium non soumis à un stress de cisaillement sont peu contractiles et possèdent un important réseau d'actine sous-membranaire. La Figure 3 présente des images extraites d'articles, (27), (29), étudiant le réseau d'actine de cellules quiescentes à confluence.

⁶ Désigne ici le passage de fluides ou de cellules en dehors d'une paroi qui les contient, en condition physiologique

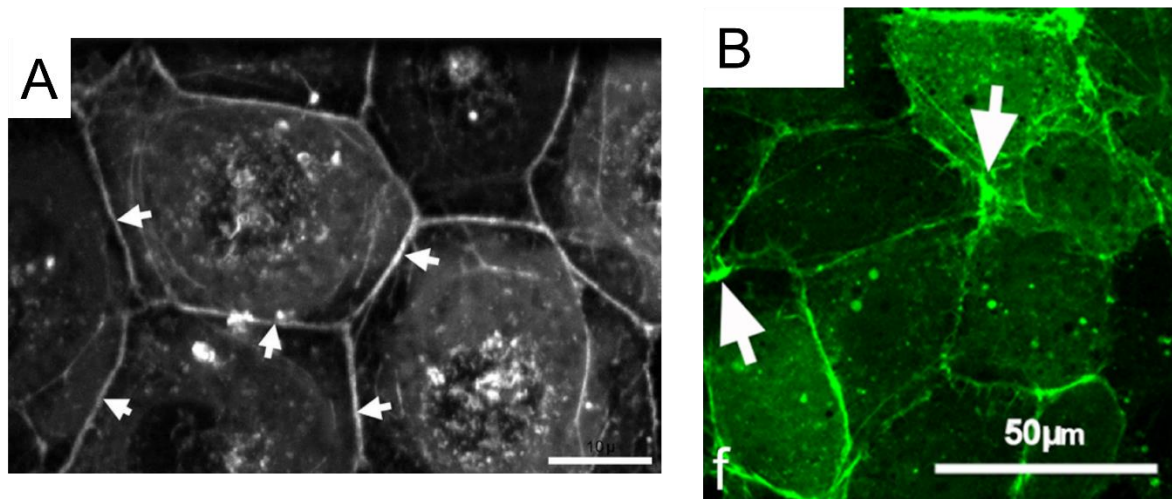


Figure 3 : Réseau d'actine de cellules endothéliales quiescentes à confluence d'après la littérature

A : Image extraite de la figure 2 B de (27). Population de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires à confluence. Visualisation de l'actine β -GFP. Flèches blanches : actine du cortex cellulaire. Barre d'échelle = 10 μ m. B : image extraite de la figure 5f de (29). Population de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) à confluence. Visualisation de l'actine filamentaire à l'aide de la molécule LifeAct-EGFP. Flèches blanches : structure d'actine en remodelage. Barre d'échelle = 50 μ m

Les cellules endothéliales quiescentes (Figure 3) sont ovales ou piriformes et peu de filaments d'actine les traversent. Les filaments d'actine des cellules quiescentes sont principalement situés sous la membrane plasmique.

I.2.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus biologique entraînant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Elle diffère sur ce point de la vasculogenèse embryonnaire qui est la création de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs dérivés du mésoderme : les angioblastes. L'angiogenèse est réalisée selon deux mécanismes : le bourgeonnement et l'intussusception qui sont schématisés dans la Figure 4.

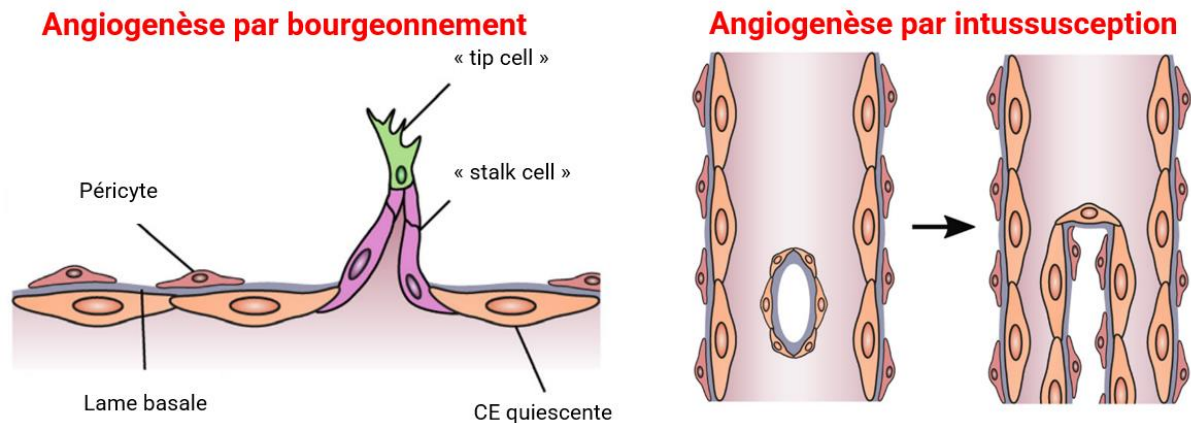


Figure 4 Angiogenèse par bourgeonnement ou par intussusception

Adaptée depuis (24)

Lors du bourgeonnement (Figure 4 gauche), les cellules endothéliales sont activées et forment une dérivation depuis un vaisseau sanguin en migrant vers la zone à vasculariser. Les cellules endothéliales qui dirigent la migration sont appelées « tip cells » tandis que celles qui forment le nouveau vaisseau en sécrétant la future lame basale et en proliférant sont appelées « stalk cells ». Ces deux phénotypes sont contrôlés dynamiquement et les rôles peuvent s'inverser, ce mécanisme est décrit ultérieurement en sous-partie I.2.4.2. Lors de l'intussusception (Figure 4 droite), c'est la division d'un vaisseau préexistant qui entraîne l'apparition de nouveaux vaisseaux avec ou sans croissance préalable du vaisseau d'origine.

I.2.3.1. L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement *in vivo* est réalisée par la migration de cellules endothéliales à partir d'un vaisseau sanguin préexistant et est le phénomène initiateur de l'angiogenèse (30). Comme schématisé en Figure 4, des cellules endothéliales guides appelées « tip cells » dirigent la migration. Les « tip cells » sont activées en réponse aux signaux pro-angiogéniques qui proviennent principalement du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF. En réponse au signal pro-angiogénique les cellules endothéliales s'extraient de leur vaisseau d'origine ce qui nécessite la perte de l'intégrité physique de la lame basale et le retrait des péricytes. Les péricytes bordant la lame basale s'en détachent en réponse au signal pro-angiogénique. La lame basale est dégradée par des métalloprotéase matricielles (MMP : Matrix Metalloprotease), notamment MMP1, MMP2 et MMP9 sécrétées par les cellules endothéliales (31). Les « tip cells » vont alors progresser vers le signal pro-angiogénique et entrainer d'autres cellules endothéliales dites « stalk cells », schématisées en Figure 4, qui vont quant à elles former le *lumen* du nouveau vaisseau en proliférant et en sécrétant des protéines de la matrice extra-cellulaire qui formeront la future lame basale. Ces deux phénotypes sont constamment en compétition en fonction des signaux reçus, une « tip cell » pouvant devenir « stalk cell » et vice-versa (ce phénomène est décrit plus en détails ultérieurement dans la partie I.2.4.2) (32). Un moyen d'identifier les « tip cells » serait d'observer CD34 qu'elles expriment contrairement aux « stalk cells » (33). En arrivant au site initiateur de l'angiogenèse, les « tip cells » peuvent s'anastomoser avec d'autres bourgeonnements ou avec des vaisseaux préexistants à proximité. Quand le signal pro-

angiogénique devient insuffisant, par exemple suite au rétablissement d'une perfusion en oxygène satisfaisante dans le tissu, la progression des « tip cells » s'arrête. Ensuite, une lumière est formée entre les cellules endothéliales grâce au flux sanguin par un procédé appelé « *blebbing inversé* » (34). La perfusion induit la maturation du vaisseau avec le recrutement de péricytes, la sécrétion d'une membrane basale et le passage des cellules endothéliales vers un phénotype quiescent (35)(24).

L'angiogenèse par bourgeonnement *in vitro* n'est pas tout à fait comparable au phénomène *in vivo* dans la mesure où la majeure partie des études se font en monoculture sans vaisseau préexistant. Le bourgeonnement de cellules endothéliales *in vitro* est visualisé par la formation de tubules sur des substrats supportant une croissance des cellules en 3D (Matrigel™, gel de collagène, gélatine...). Ce phénomène est illustré dans la Figure 5.

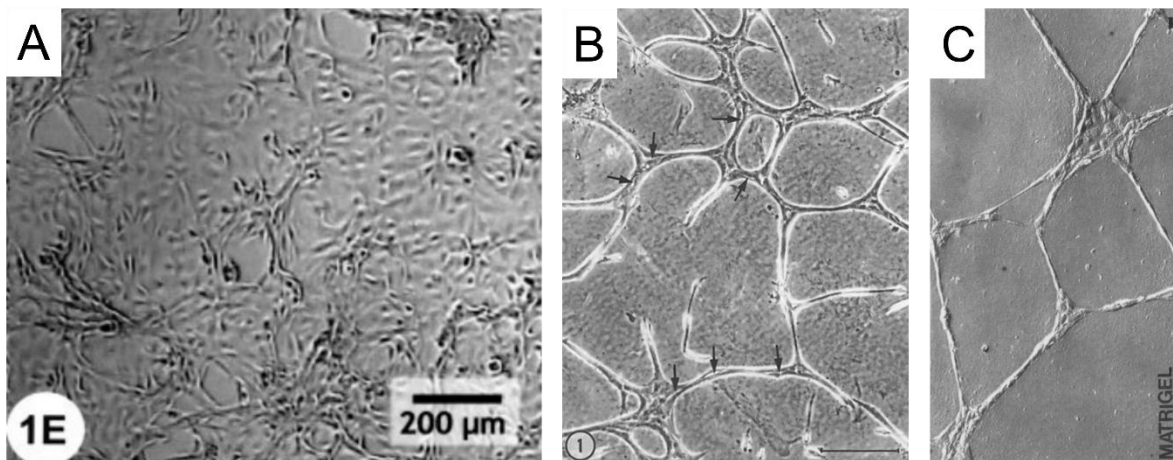


Figure 5 : Organisation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse par bourgeonnement sur surfaces 3D selon la littérature.

Toutes les images sont issues d'observation par microscopie photonique à contraste de phase. A : image extraite de la figure 1E de (36). Population de cellules endothéliales microvasculaires bovines à 100% de confluence cultivées sur une surface recouverte de gélatine avec des organisations circulaires typiques du bourgeonnement. Barre d'échelle = 200 µm. B : image extraite de la figure 1C de (37) illustrant des cellules endothéliales de capillaires bovins à une confluence de 60% puis cultivées deux jours entre deux couches de gel de collagène. Les cellules endothéliales s'arrangent en structures circulaires avec des parois tubulaires creuses (flèches noires). Barre d'échelle = 200 µm. C : image extraite de la figure 2 de (38) illustrant des HUVECs ensemencées à 100% de confluence sur du Matrigel™ pendant 24 h et s'organisant en un réseau de structures circulaires aux parois creuses. Barre d'échelle (trait noir en haut à droite) = 10 µm.

L'organisation des cellules endothéliales diffère selon le milieu qu'elles colonisent *in vitro* (Figure 5). Un revêtement de gélatine utilisé dans la Figure 5 A (protocole d'après (39)) entraîne, après la prolifération des cellules jusqu'à une confluence totale, l'apparition de structures circulaires formées de parois de cellules endothéliales organisées en fuseaux. Cette organisation est similaire à celles retrouvées dans les cultures où les cellules endothéliales sont emprisonnées dans un gel (Figure 5 B) ou se développent à la surface d'un gel (Figure 5 C). Dans ces modes de culture, les cellules endothéliales forment en quelques jours des tubules avec une lumière. Ces méthodes 3D (Figure 5 B et C) sont communément utilisées pour évaluer la capacité de cellules endothéliales à former des capillaires et par extension pour évaluer l'angiogenèse par bourgeonnement *in vitro* (40). Une étude décrit étape par étape

l'évolution morphologique attendue d'une population de cellules endothéliales microvasculaires bovines cultivées dans un milieu stimulant l'angiogenèse sur une couche de gélatine (36). Ces étapes, simplifiées, sont les suivantes :

- 1) : formation d'une couche de cellules à confluence où le pavage caractéristique des cellules endothéliales est conservé (cellules rondes ou ovoïdes).
- 2) : début du bourgeonnement où une partie des cellules s'allongent, cette étape est considérée terminée quand plus de la moitié des cellules se sont allongées.
- 3) : organisation des cellules allongées en structures linéaires (fuseaux) et circulaires, cette étape est considérée terminée quand plus de la moitié des cellules font partie des structures.
- 4) : formation d'un réseau stable où les cellules s'allongent encore davantage et s'alignent sur plusieurs rangs qui sont superposées sur d'autres cellules (et donc non attachées au substrat).
- 5) : Réorganisation des cellules, les fuseaux s'agrandissent, une lumière est créée en leur sein et de moins en moins de cellules supportant les fuseaux sont attachées au substrat.

A l'issue de ce processus les cellules endothéliales forment un réseau de tubules creux et interconnectés.

L'allongement des cellules endothéliales est provoqué au moins en partie par l'activation de VEGFR2, le récepteur principal au VEGF. L'expression basale de VEGFR2 dans une population de cellules endothéliales à confluence est hétérogène ce qui explique que le bourgeonnement ne survient pas en tout point et que seules certaines cellules forment des tubules (Figure 5 A) (41). L'élongation est permise par l'action conjointe de fibres de stress orientées dans le sens de migration et des jonctions adhérentes ancrant les cellules entre elles.

I.2.3.2. L'angiogenèse par intussusception

L'intussusception est un processus permettant d'augmenter la quantité de vaisseaux sans augmenter la quantité de cellules endothéliales. Cela permet de générer rapidement de nouveaux vaisseaux en utilisant ceux existants, ce qui économise également de l'énergie en se passant de division cellulaire qui demande de doubler le matériel génétique. La première étape est la mise en contact des cellules opposées d'un endothélium jusqu'à ce que les cellules endothéliales opposées se touchent. La zone de contact entre les cellules est ensuite perforée et les jonctions cellulaires remodelées pour créer une ouverture appelée pilier intraluminal. Cette cavité (le pilier étant un cylindre creux) est colonisée par des cellules musculaires lisses et des péricytes. Ces cellules et les cellules endothéliales se réorganisent et déposent du collagène pour agrandir le pilier et aboutir à la formation de deux vaisseaux distincts.

Ce mécanisme est utilisé pour ajuster et remodeler les besoins des réseaux capillaires existants. Il permet notamment d'accroître rapidement la surface d'un plexus capillaire (ensemble de vaisseaux anastomosés ⁷ entre eux) pour faciliter les échanges métaboliques. L'intussusception est également essentielle pour ajuster la taille, la forme et la position des capillaires existants afin d'optimiser le flux sanguin aux besoins environnants. C'est notamment par ce mécanisme que les capillaires en surplus ou devenus inutiles sont supprimés au profit d'autres.

⁷ Décrits des vaisseaux étant connectés et partageant la même lumière

C'est un mécanisme essentiel pour le remodelage et la maturation des réseaux vasculaires lors du développement, de la vascularisation de zones lésées ou l'adaptation aux besoins métaboliques en conditions physiopathologiques (42). Par conséquent, il est moins pertinent à étudier dans le contexte de la réparation osseuse car la perfusion initiale au sein de l'implant dépendra du bourgeonnement de vaisseaux préexistants. Cet aspect de l'angiogenèse n'est pas plus développé dans ces travaux de thèse.

I.2.4. La signalisation de l'angiogenèse par bourgeonnement

I.2.4.1. Le VEGF-A et ses récepteurs

Le VEGF est l'acteur central et principal de l'angiogenèse qu'il active et dirige au moyen de gradients de concentration. Il existe plusieurs isoformes du VEGF, parmi celles-ci le VEGF-A est le principal déclencheur de l'angiogenèse. Il existe également plusieurs récepteurs VEGFR, codés par différents gènes, qui sont numérotés 1 (Flt-1 : fms related receptor tyrosine kinase 1), 2 (Flk-1/KDR : Fetal liver kinase 1/ Kinase insert domain receptor) ou 3 (Flt-4 : fms related receptor tyrosine kinase 4). De ces trois récepteurs, VEGFR2 est considéré comme le principal car il transmet plus fortement le signal pro-angiogénique suite à la liaison de VEGF-A. VEGFR1 transmet moins efficacement le signal pro-angiogénique et possède une forme membranaire et une forme soluble. Cette efficacité réduite et ces deux formes suggèrent que VEGFR1 a une fonction inhibitrice et régulatrice de l'angiogenèse en régulant notamment grâce à sa forme soluble la quantité de VEGF disponible pour les autres récepteurs. VEGFR3 n'est lui exprimé que pendant le bourgeonnement ou dans les cellules endothéliales lymphatiques(43).

VEGF-A est, chez la souris⁸, exprimé sous trois isoformes : VEGF120, VEGF164 et VEGF180 (44). Chez l'humain, le VEGF possède 1 acide aminé supplémentaire, les trois isoformes du VEGF-A sont donc notés VEGF121, VEGF165 et VEGF181. VEGF120 diffuse facilement au sein des tissus, VEGF180 est essentiellement séquestré dans la matrice extracellulaire et VEGF164 présente un profil intermédiaire. La combinaison de leur relargage différé notamment lors de la dégradation de la lame basale des vaisseaux sanguins (45) permet d'avoir un gradient de VEGF contrôlé pour guider le bourgeonnement (46) (47).

En dehors de l'angiogenèse le VEGF-A est sécrété en permanence par les cellules endothéliales en quantité limitée mais essentielle à la maintenance du réseau vasculaire (48)

I.2.4.2. La compétition dynamique entre les cellules endothéliales

Cette compétition dynamique où des « tip cells » peuvent devenir des « stalk cells » et vice-versa est réalisée suite à l'activation de la voie Notch par le VEGF dans les cellules endothéliales. La voie Notch est une voie de signalisation juxtacrine⁹ qui régule de nombreux processus biologiques. L'acteur principal de cet équilibre dynamique est le ligand Dll4 du récepteur Notch. Dans les cellules endothéliales, Dll4 est surexprimé suite à la liaison entre VEGF et son récepteur principal VEGFR2. Cette protéine Dll4 est exprimée à la surface des cellules et peut alors se lier à Notch présent sur les cellules endothéliales environnantes. Cette liaison inhibe l'expression de VEGFR2 et du récepteur auxiliaire VEGFR3 tout en augmentant l'expression de VEGFR1, l'inhibiteur des deux autres récepteurs au VEGF. Par conséquent,

⁸ La voie de signalisation murine (souris) est décrite en raison de l'utilisation dans la partie expérimentale de la lignée cellulaire murine C166 comme modèle de cellule endothéliale.

⁹ Décrit un mode de communication entre deux cellules en contact physique

cette voie de signalisation exerce un rétrocontrôle négatif où les premières cellules qui répondent au VEGF inhibent la réponse des cellules voisines. Seules les cellules les mieux positionnées par rapport au signal VEGF adoptent le phénotype pro-migration des « tip cells » et orientent le futur vaisseau vers l'origine du signal. Les autres cellules, les « stalk cells » participent alors à l'élaboration du corps du vaisseau (32, 49).

I.2.4.3. Les métalloprotéases matricielles

Les MMPs sont des endopeptidases (des enzymes dégradant les protéines en permettant l'hydrolyse des liaisons peptidiques au sein des chaînes d'acides aminés) utilisant les ions Zn^{2+} ou Ca^{2+} comme cofacteur. Elles sont traduites à l'état de proenzymes inactives en raison de la présence d'un propeptide inhibiteur. Elles sont activées en condition physiologique lors de la perte de ce propeptide. Leur activité est également finement régulée par des inhibiteurs appelés inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP : tissue inhibitor of matrix metalloprotease) pour ne pas dégrader la matrice extra-cellulaire en excès (50). En plus de leur fonction de dégradation de la matrice extra-cellulaire, les MMPs modulent le signal de nombreuses voies impliquées dans l'inflammation et la migration cellulaire en retirant des domaines à des cytokines ou à des récepteurs de ces voies tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF : Tumor Necrosis Factor), l'interleukine-6 (IL-6), le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), VEGF ou Notch (51). La majorité des MMP sont sécrétées mais certaines sont retrouvées au niveau des membranes dont MMP-2 (52). Certaines de ces MMP transmembranaires sont retrouvées au niveau de vésicules extracellulaires permettant vraisemblablement d'exercer leur fonction à distance de la cellule (53).

Leur fonction dans l'angiogenèse est triple : dégradation de la matrice extra-cellulaire pour permettre la migration des cellules, relargage de facteurs solubles (pro- et anti- angiogenèse) et modulation de certaines voies de signalisation de l'angiogenèse (PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes et VEGF notamment).

La modulation de la signalisation par les protéines MMP-2, MMP-9 et MMP-14 est essentielle au signal transmis par VEGF. L'absence de ces MMP entraîne une absence de signal associé à VEGF malgré la présence de VEGFR2 (51). MMP-14 se lie physiquement à PDGF- β et son absence dans des souris transgéniques entraîne une diminution de sa signalisation ce qui entraîne un phénotype de vaisseau sanguin anormal avec des péricytes et cellules musculaires lisses insuffisamment développés (54).

La protéine MMP-9 est importante pour l'angiogenèse et l'homéostasie des tissus vasculaires. Elle est notamment capable de cliver le VEGF en séparant son domaine de liaison à la matrice extra-cellulaire de celui permettant sa liaison à ses récepteurs. Ce clivage modifie sa signalisation en facilitant l'agrandissement de vaisseaux préexistants plutôt qu'en augmentant l'angiogenèse par bourgeonnement (52). La protéine MMP-9 est synthétisée sous une forme inactive et est stockée dans des vésicules cytoplasmiques. Quand les cellules endothéliales sont quiescentes, la majeure partie des vésicules accumulent MMP-9 en vue d'une sécrétion importante et localisée tandis qu'une petite partie des vésicules sécrètent une faible quantité de MMP-9 nécessaire à l'homéostasie des cellules endothéliales et des tissus environnant (55). Lors d'un signal pro-angiogénique, la sécrétion de MMP-9 est accrue et elle est activée par TIMP-1 dans le milieu extra-cellulaire. Cette forme clivée exerce son activité protéolytique sous forme soluble ou s'ancre sur des protéines de la matrice extra-cellulaire (52). Dans les cellules endothéliales en migration MMP-9 est parfois stockée dans une forme active clivée dans ses vésicules intracellulaires de stockage avant sa sécrétion (56).

I.2.4.4. Les angiopoïétines

Les angiopoïétines sont des protéines essentielles au bon déroulement de l'angiogenèse et à la maintenance des vaisseaux. Elles sont au nombre de 4 (Ang1-4) et sont les ligands des protéines Tie-1 et Tie-2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains -1 / -2). Tie-1 a pour seule fonction identifiée de former un hétérodimère avec Tie-2 pour moduler le signal de ce dernier. Les 4 angiopoïétines se lient à Tie-2 et déclenchent une signalisation qui leur est propre. Les plus importantes dans l'angiogenèse sont Ang-1, principalement sécrétée par les péricytes et les cellules musculaires lisses ; et Ang-2, principalement sécrétée par les cellules endothéliales en réponse à VEGF-A et à l'hypoxie. La signalisation associée à la liaison d'Ang-1 à Tie-2 est centrée sur la stabilisation des vaisseaux. Tie-2 activée par Ang-1 se relocalise aux jonctions cellules-cellules et inhibe l'apoptose, augmente l'expression de Dll4 et la sécrétion de collagène IV (pour reformer la lame basale) et favorise l'accumulation de la molécule d'adhérence cellule-cellule VE-Cadhérine (Vascular-Endothelial Cadherin) aux jonctions cellulaires. Ang-2 serait un agoniste¹⁰ faible de Tie-2 et aurait de fait un rôle d'antagoniste compétitif de la voie Ang-1 en cas d'activation des cellules endothéliales par un signal pro-angiogénique. La faible activation de Tie-2 par Ang-2 limite notamment le recrutement de péricytes par les cellules endothéliales et facilite de ce fait leur migration, promouvant l'angiogenèse par bourgeonnement (57). Le niveau d'expression de Tie-2 semble également directement corrélé avec l'intensité des contraintes de cisaillement au sein des vaisseaux (58).

I.2.4.5. Le Facteur de von Willebrand

Le Facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine soluble de 220 kDa stockée avant sa sécrétion dans le cytoplasme au sein des corps de Weibel-Palade, des vésicules recouvertes de clathrine. vWF est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, l'inflammation et l'hémostase¹¹. Son inhibition *in vivo* chez la souris entraîne une augmentation de leur vascularisation. Son inhibition *in vitro* entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Cet effet serait provoqué par une modification de la signalisation de la voie VEGF-VEGFR2, au moyen d'une perturbation de l'activité de l'intégrine $\alpha\beta3$ connue pour ses effets pro- ou anti-angiogéniques selon le contexte. De plus, l'inhibition de vWF augmente le niveau de sécrétion d'Ang-2 (un facteur pro-angiogénique agissant en synergie avec le VEGF-A comme décrit dans le paragraphe précédent) probablement car vWF recrute les corps de Weibel-Palade dans lesquels sont stockées vWF et Ang-2. En l'absence de ces corps de Weibel-Palade Ang-2 est sécrétée immédiatement après sa synthèse (59).

vWF a un rôle de régulateur de la bonne organisation vasculaire mais des différences liées au type de cellules et au contexte vasculaire ne sont pas exclues (60),(61),(62). De plus, l'expression de vWF est dépendante de la localisation des cellules endothéliales avec une expression accrue dans les veines. Son expression est stimulée par l'hypoxie et le VEGF (60).

I.2.4.6. Le rôle de l'hypoxie, des radicaux libres de l'oxygène et de l'enzyme eNOS

La concentration en oxygène est un régulateur central de l'angiogenèse. La concentration physiologique d'O₂ d'un tissu varie de 3% à 5%, lorsque celle-ci diminue elle entraîne immédiatement une activité accrue du facteur induit par l'hypoxie 1 (HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1) (63). Ce facteur de transcription va induire l'angiogenèse en promouvant

¹⁰ Désigne une molécule activatrice du récepteur qu'elle lie

¹¹ Désigne les mécanismes permettant le retour à un écoulement sanguin normal

la transcription de gènes codant pour des facteurs angiogéniques (VEGF, Tie-2, MMP-2, MMP-9...). Cette transcription accrue est permise par la liaison de HIF-1 à des séquences dites de réponses à l'hypoxie (HRE : Hypoxia Response Element) (64). La voie de signalisation simplifiée d'HIF1 est schématisée dans la Figure 6.

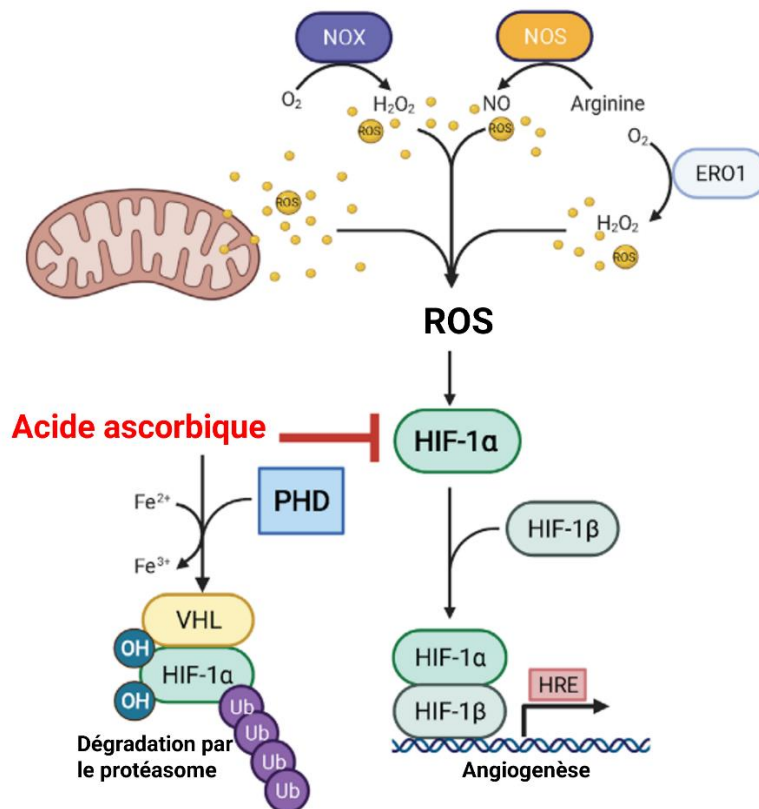


Figure 6: Voie simplifiée de HIF1

NOX : NADPH oxydase ; NOS : oxyde nitrique synthase, ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1). Ces trois protéines et la chaîne respiratoire mitochondriale sont les principaux générateurs d'espèces radicalaires entraînant l'apparition de radicaux libres de l'oxygène. VHL = Von Hippel-Lindau une protéine impliquée dans l'ubiquitinylation de HIF-1α ; HRE (Hypoxia Response Element) : élément de réponse à l'hypoxie. – Adaptée de (64)

L'effet promoteur de HIF-1 est régulé par l'état redox des cellules concernées (Figure 6). L'activation de HIF-1 se fait par la liaison entre les sous-unités HIF-1α et HIF-1β, la sous-unité HIF-1α en condition normale est constamment hydroxylée par la prolyl hydroxylase (PHD) puis dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (Figure 6). En condition hypoxique, la PHD a une activité diminuée, n'ayant pas d'oxygène disponible, HIF-1α échappe à la dégradation et peut se lier à son partenaire HIF-1β puis activer les gènes de facteurs angiogéniques notamment VEGF (64).

Les conditions redox affectent cette interaction, l'acide ascorbique par exemple, semble abolir l'activité de HIF-1 *in vitro* en maintenant l'activité de la PHD en conditions hypoxiques (Figure

6)(65). A l'inverse, une concentration élevée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) peut affecter l'état redox du fer du site catalytique de la PHD et par conséquent augmenter l'activité de HIF-1. Il a été démontré *in vivo* qu'un stress oxydatif bref engendré par la reperfusion d'un tissu cardiaque placé en hypoxie pendant une courte durée (5 à 10 min) est directement responsable d'une augmentation de l'angiogenèse (66). Au sein de la cellule, la protéine ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1) et la NADPH oxydase 4 (NOX4), sont d'importants générateurs de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Leur activité et celle de la chaîne de transport des électrons au sein des mitochondries apparaissent comme les plus importantes sources de ROS contribuant à l'angiogenèse physiologique (Figure 6 haut) (64).

L'oxyde nitrique (NO), produit dans les cellules endothéliales par le biais de l'enzyme eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) est un important messenger secondaire en tant que radical libre à l'état gazeux capable de diffuser librement entre les cellules depuis son site de production. Son rôle dans l'angiogenèse repose dans son interaction avec les résidus cystéines des protéines. Ceux-ci subissent l'ajout du NO sur leur groupe sulfhydryle lors d'une réaction de S-nitrosylation. Cette modification post-traductionnelle des protéines entraîne une modification de l'activité des protéines cibles (67). Le NO module fortement la voie pro-angiogénique de HIF-1 vraisemblablement grâce à cette réaction en interagissant directement sur la stabilité finale de HIF-1 α en modifiant sa Cys⁵³³ et peut-être sa Cys⁸⁰⁰. Son effet serait toutefois dépendant de la régularité du signal et des concentrations en oxygène du milieu : les flux ponctuels de NO seraient stabilisateurs alors que les flux chroniques seraient déstabilisateurs. De plus, en normoxie, le NO serait stabilisateur de HIF-1 α alors qu'il serait déstabilisateur en condition hypoxique. Les mécanismes d'actions exacts et leur chronologie ne sont pas complètement élucidés, mais il apparaît que le NO est capable d'inhiber directement la PHD probablement du fait de sa nature de radical (Figure 6) lui permettant d'augmenter l'angiogenèse par l'action de HIF-1. Paradoxalement, le NO peut également faciliter l'action de PHD en lui rendant accessible l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'action de NO entraîne le désassemblage des jonctions adhérentes des cellules favorisant ainsi l'initiation de l'angiogenèse en permettant la migration des cellules endothéliales. (64). Signe de son implication étroite avec la situation oxydative de la cellule, la transcription de eNOS est augmentée en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (68). Le NO est également essentiel à la dissociation de l'endothélium vasculaire lors de l'angiogenèse induite par le VEGF. Une S-nitrosylation de la Cys⁶¹⁹ de la β -caténine est provoquée suite à la production de NO par eNOS et provoque la dissociation de la β -caténine avec les jonctions adhérentes permettant la perméabilisation des vaisseaux et donc la migration des cellules endothéliales (69). eNOS est surexprimée lors de la liaison du VEGF-A à son récepteur VEGFR2 (70).

I.2.4.7. Voie YAP/TAZ

Dans les cellules endothéliales, le tandem de la protéine YAP (YES-associated protein) et TAZ (Transcription Activator with PDZ binding motif) régule l'expression d'Ang-2 et permet le transport de VEGFR2 à la membrane plasmique. Le rôle de YAP/TAZ dans les cellules endothéliales est cependant très variable selon l'organe considéré avec une influence probable des concentrations en oxygène disponible. Par exemple, son inactivation diminue l'angiogenèse dans la rétine alors qu'elle stimule la croissance de vaisseaux sanguins dans les os longs en empêchant l'inhibition de HIF-1 α qu'il réalise en temps normal (24).

I.2.4.8. Le métabolisme des cellules endothéliales

Le métabolisme des cellules endothéliales est particulièrement spécialisé, la génération d'adénosine triphosphate (ATP) se réalise principalement (>80%) par glycolyse anaérobie(71) car la génération d'ATP par voie oxydative dans les mitochondries est utilisée pour générer des signaux par l'intermédiaire des ROS produits (72). Ces aspects sont résumés dans la Figure 7.

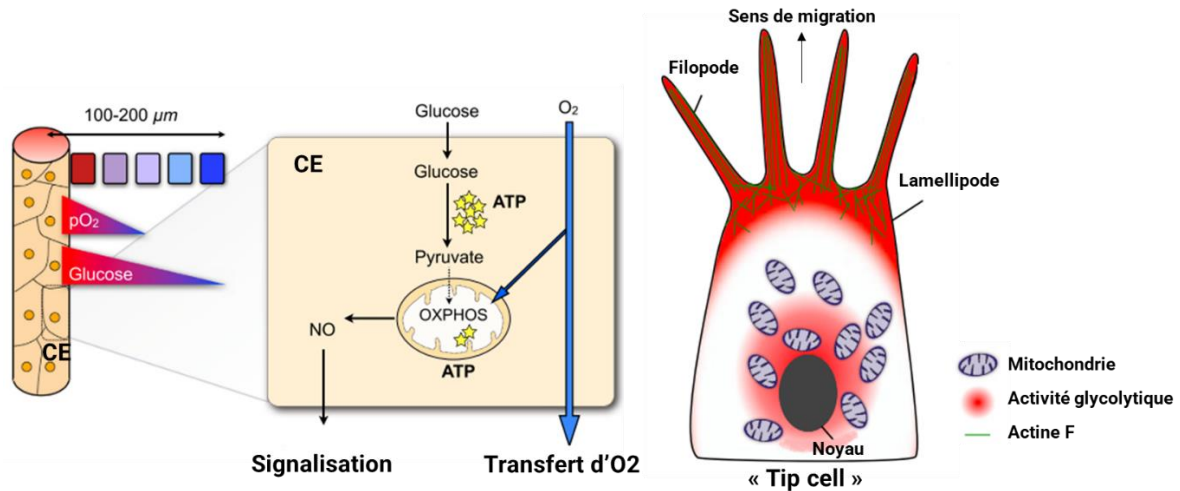


Figure 7 Métabolisme simplifié des cellules endothéliales

Adaptée de (73)

CE : cellule endothéliale. OXPHOS (OXydatiVe PHOSphorylation) : Phosphorylation oxydative. Les cellules endothéliales utilisent principalement la glycolyse pour produire leur ATP en conditions quiescente ou active (« Tip cells » ici en guise d'illustration mais les « stalk cells » le sont également), vraisemblablement afin de faciliter le transfert d'O₂ aux tissus environnants et de réserver le métabolisme oxydatif à des fins de signalisation pro-angiogénique par le biais de la voie HIF-1.

La faible consommation d'O₂ par les cellules endothéliales facilite sa diffusion en profondeur dans les tissus vascularisés (Figure 7 à gauche). Pour subvenir aux besoins énergétiques des cellules pendant leur migration, la glycolyse est particulièrement active à leur membrane sous les prolongements cellulaires servant à la mobilité (Figure 7 à droite). La glycolyse permet de fournir de l'ATP là où les mitochondries sont absentes par le biais d'une cascade enzymatique qui se met en place le long des lamellipodes et filopodes entre les filaments d'actine. Le blocage de cette cascade entraîne un phénotype de cellule quiescente pour les « tip cells » ; ce qui montre l'importance de la glycolyse dans leur fonctionnement normal (73). De plus, la réponse des cellules endothéliales aux signaux environnants entraîne des modifications profondes de leur métabolisme nécessaires à leur bonne fonction (74).

I.2.5. Les molécules d'adhésion de la cellule endothéliale

L'organisation structurale des cellules endothéliales est essentielle au bon fonctionnement du système vasculaire, par conséquent des protéines régulent fortement les capacités de liaisons des cellules endothéliales dans l'espace.

I.2.5.1. VE-Cadhérine

La VE-Cadhérine est une molécule transmembranaire ayant un rôle structural pour les cellules endothéliales en réalisant des liaisons homophiliques permettant d'assurer la cohésion des vaisseaux sanguins dans les jonctions adhérentes (75). Son expression totale dans les cellules endothéliales varie peu ou pas et c'est sa localisation qui est modifiée lors de la migration des cellules endothéliales en réponse à un signal pro-angiogénique. L'élongation des cellules suite à la stimulation angiogénique entraîne la diminution de la concentration locale de VE-Cadhérine et la perte de jonctions adhérentes. En l'absence de ces jonctions, des lamellipodes formés par la polymérisation du cytosquelette d'actine protrudent de la cellule et enclenchent la formation de nouvelles jonctions adhérentes quand ils rencontrent une autre cellule. Ces jonctions adhérentes ne sont pas permanentes et évoluent selon la progression de la migration, tant que les cellules sont allongées, la concentration locale de VE-Cadhérine ne peut pas être stable tout le long de la cellule ce qui assure une bonne capacité de migration des cellules tant que le signal pro-angiogénique est présent. Dans les cellules endothéliales en migration les lamellipodes, et donc les jonctions adhérentes, se positionnent principalement au niveau des extrémités de ces cellules polarisées. Cette localisation préférentielle aux extrémités permet le maintien des cellules entre elles lors de la progression du fuseau (41).

De plus, lors d'un signal pro-angiogénique induit par le VEGF en concentration suffisante, la VE-Cadhérine peut être internalisée. Cette internalisation survient suite à l'activation de VEGFR2 par le VEGF comme schématisé dans la Figure 8.

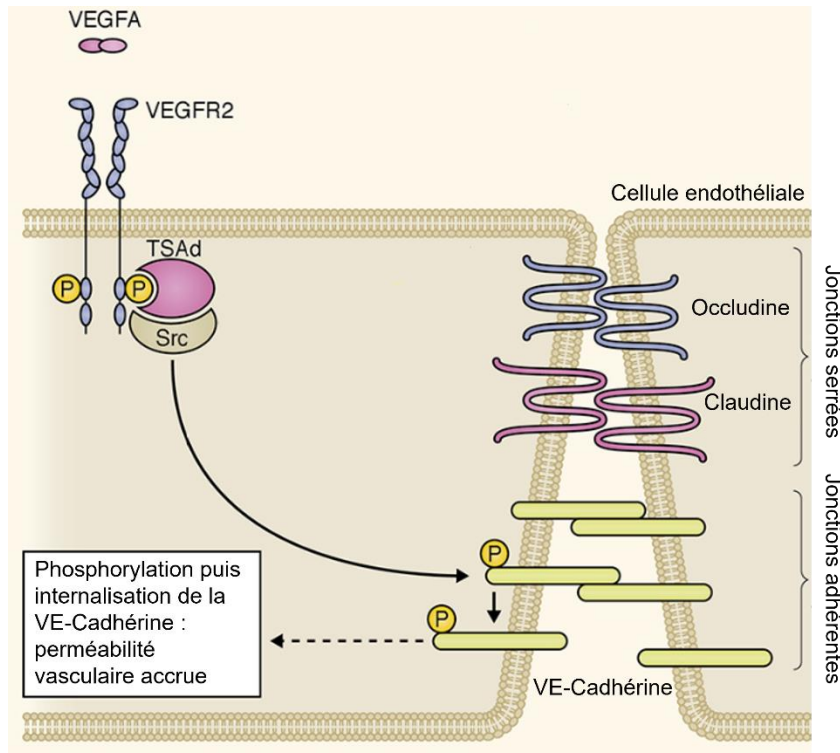


Figure 8 : Mécanisme d'internalisation de VE-Cadhérine par VEGFA/VEGFR2

Figure adaptée de (76). Suite à la liaison de VEGFA sur VEGFR2, celui-ci se dimérise et s'autophosphoryle. Cela entraîne par le biais de la protéine adaptatrice des cellules T (TSAAd) l'activation de la tyrosine kinase Src (abréviation de Sarcoma). Src va phosphoryler VE-Cadhérine, ce qui entraîne son internalisation et contribue ainsi à la perméabilité des vaisseaux sanguins en désassemblant les jonctions adhérentes. La famille des protéines claudines et l'occludine sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'étanchéité des espaces entre les cellules.

L'internalisation de la VE-Cadhérine suite à la liaison de VEGFA sur VEGFR2 (Figure 8), favorise la perte des jonctions adhérentes et accroît la perméabilité vasculaire et la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse (76). La présence membranaire de VE-Cadhérine est essentielle à l'anastomose des « tip cells » en fin de migration. Elle est également indispensable dans la maturation normale des vaisseaux sanguins pendant l'angiogenèse (43).

Une forte expression membranaire, non polarisée, de VE-Cadhérine est généralement une indication de vaisseaux matures quiescents (77). Elle peut réprimer les signaux angiogéniques induits par le VEGF, si ce dernier est peu concentré, car elle est capable de former un complexe avec VEGFR2 et de recruter des phosphatases le déphosphorylant. Cela l'inactive et inhibe l'action du VEGF sur les cellules endothéliales quiescentes.

La VE-Cadhérine peut être inactivée par différents mécanismes. L'activation de la migration des cellules endothéliales entraîne une forte glycolyse qui favorise l'endocytose de VE-Cadhérine ce qui diminue son expression à la membrane sans avoir recours à la signalisation par le VEGF (78). L'enzyme MMP-9 est capable de cliver la VE-Cadhérine et accroît ainsi la perméabilité de vaisseaux sanguins *in vitro* et *ex vivo* (79).

I.2.5.2. PECAM-1

La protéine PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) également identifiée comme CD31 est une protéine transmembranaire de 130 kDa de la famille des immunoglobulines formant des liaisons homophiliques avec son extrémité extra-cellulaire. C'est la protéine la plus importante en nombre dans les jonctions cellulaires des cellules endothéliales. Elle est essentielle au fonctionnement vasculaire normal, son absence entraînant une perte de l'étanchéité des vaisseaux mais également, paradoxalement, des défauts majeurs de migration des cellules endothéliales. Cette dernière fonction provient d'une action déphosphorylante des kinases des adhésions focales (FAK) que son domaine cytoplasmique, quand il est phosphorylé, réalise en combinaison avec la phosphatase à tyrosine SHP-2. La déphosphorylation des FAK modifie l'activité de la protéine G RhoA et permet la mobilité des cellules endothéliales. En conséquence, l'absence de PECAM-1 inhibe *in vitro* la formation de tubules multicellulaires par des cellules endothéliales cultivées sur du Matrigel™ dans un milieu pro-angiogénique. Le domaine intracellulaire de PECAM-1 jouerait également un rôle dans leur survie en inhibant une voie apoptotique intrinsèque (80). C'est une protéine importante pour la transmission des forces mécaniques, comme le stress de cisaillement du flux sanguin, aux cellules endothéliales et à leur adaptation à ces forces (81). Elle diffuse librement dans la membrane et son accumulation aux jonctions cellulaires serait essentiellement passive. De grandes zones enrichies en PECAM-1 se forment petit à petit aux zones de contact cellules-cellules et leur présence est proportionnelle à l'état de maturité du vaisseau (82). Ces zones enrichies en PECAM-1 sont généralement dénuées d'actine, de myosine et de VE-Cadhérine (81).

I.2.6. Une signalisation riche

De très nombreux facteurs de croissance et voies de signalisation ont des fonctions dans l'angiogenèse, bien que non étudiées dans les présents travaux les acteurs suivants présentent une importance particulière au sein de l'angiogenèse :

I.2.6.1. Endomucine

L'endomucine, aussi appelée sialomucine, endomucine- 1/2 ou mucine-14, est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales et qui selon sa glycosylation peut être pro ou antiadhérente (83). Elle est également essentielle au signal pro-angiogénique transmis par VEGF : son absence inhibe la prolifération, la migration et la tubulogénèse induite par VEGF *in vitro* et entraîne un défaut d'angiogenèse *in vivo* (84). Son domaine extra-cellulaire aurait notamment pour fonction de permettre l'internalisation de VEGFR2 suite à sa liaison avec le VEGF (85).

I.2.6.2. VCAM-1

La molécule d'adhérence des cellules vasculaires 1 (VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule. Aussi appelée CD106) est une protéine transmembranaire qui permet l'adhésion des cellules immunitaires à l'endothélium vasculaire pendant l'inflammation. Elle permet de réguler la migration des lymphocytes B et T ainsi que celle des précurseurs hématopoïétiques. Elle existe également sous forme soluble où elle sert de gradient chimiotactique positif pour les monocytes (83). Lors de la réponse à l'inflammation, son expression est augmentée par le TNF- α sécrété par les lymphocytes se dirigeant vers la zone d'inflammation. Sa liaison avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ des lymphocytes entraîne un remodelage des adhérences cellulaires et une

sécrétion de MMP permettant la perméabilisation de l'endothélium vasculaire et la migration des lymphocytes (86).

I.2.6.3. Des voies complémentaires au VEGF : PDGF et FGF

La voie de signalisation du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), et celle du facteur de croissance des fibroblastes (FGF : Fibroblast Growth Factor) sont deux voies de signalisation distinctes mais participant à la régulation de l'angiogenèse en activant une signalisation proche de la voie VEGF.

PDGF est composé de 5 membres : les homodimères de PDGF- A à -D et un hétérodimère AB. Ils se lient aux récepteurs à activité tyrosine kinase PDGFR- α ou - β et stimulent la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Une suractivation de cette voie PDGF est suffisante pour enclencher l'angiogenèse tumorale.

La famille protéique des FGF est composée de 18 membres capables de se lier aux 4 récepteurs à activité tyrosine kinase FGFR-1 à -4 qui une fois activés ont une fonction de stimulation de la prolifération, de la migration et d'autres effets pro-angiogéniques chez les cellules endothéliales où l'on retrouve principalement FGFR-1 et un peu de FGFR-2. La voie FGF fonctionne généralement en synergie avec VEGF et PDGF pour amplifier l'angiogenèse (87).

I.2.6.4. EphrinB2/EphB4

Le récepteur B4 des hépatomes produisant de l'érythropoïétine (EphB4), et son ligand EphrinB2 sont deux protéines transmembranaires de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ils forment une importante voie de communication bidirectionnelle cellule-cellule qui joue un rôle dans le développement du système vasculaire, la spécification veine/artère, la réparation des vaisseaux et l'angiogenèse pathologique. Ils jouent également une importante fonction dans l'induction de l'angiogenèse par le VEGF en étant essentiels à la bonne fonction de la voie VEGF-Dll4/Notch décrite en partie I.2.4.2 (88).

I.2.7. Le rôle des contraintes mécaniques dans l'angiogenèse

Les contraintes mécaniques générées par le flux sanguin sont responsables en partie d'une grande diversité de phénotypes de la cellule endothéliale. Elles sont également essentielles à la maturation des vaisseaux sanguins notamment lors du remodelage par intussusception qu'elles régulent. Ces contraintes ont également une influence sur l'angiogenèse par bourgeonnement où le stress de cisaillement exercé dans et autour d'un vaisseau joue un rôle significatif (17). Il a par exemple été montré qu'un stress de 1 Pa au sein de la lumière du vaisseau ou transmural (contre son enveloppe extérieure, par exemple en cas de fuite de fluide interstitiel autour du vaisseau) entraîne son bourgeonnement indépendamment de l'état de maturation du vaisseau préexistant. En plus d'initier le phénomène, le maintien de ce stress de cisaillement est nécessaire à la poursuite du bourgeonnement, son arrêt entraînant celui du processus. Le flux transmural dirigerait également le bourgeonnement le long du gradient de pression généré. Le stress de cisaillement appliqué par le flux sanguin est également capable de réguler négativement le bourgeonnement induit par le VEGF en supprimant le signal pro-angiogenèse dans des vaisseaux nouvellement formés et perfusés avec succès (89). Les caractéristiques d'un flux auquel des cellules endothéliales sont exposées peuvent avoir une influence majeure sur leur signalisation. Un flux laminaire continu diminue les signaux inflammatoires, inhibe l'apoptose

de cellules endothéliales et entraîne une sécrétion accrue de NO. Un flux turbulent discontinu entraîne quant à lui un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales avec une expression importante de molécules d'adhérence comme VCAM-1 servant à l'extravasation des cellules immunitaires à travers l'endothélium (90).

Similairement, le rôle mécanique de l'environnement extracellulaire des cellules endothéliales est essentiel dans toutes les étapes de la vie d'un endothélium :

- la force de l'adhérence des cellules endothéliales est liée à la rigidité de l'environnement (matrice extra-cellulaire) avec, à priori, une force d'adhérence croissante avec la rigidité. L'adhérence en retour influence directement le comportement cellulaire : apoptose si trop faible, « différenciation » si moyenne (acquisition d'un phénotype de « tip cell »), prolifération si forte (comme pour les « stalk cells » lors du bourgeonnement lorsqu'une nouvelle matrice extracellulaire est formée autour du bourgeon). Des excès de rigidité peuvent cependant conduire à des inhibitions de l'angiogenèse mais la réponse des cellules endothéliales est fortement dépendante du tissu dans lequel elles forment un vaisseau (91).
- La vitesse de migration des cellules endothéliales est directement liée à la rigidité de leur environnement. Un équilibre dans sa rigidité est nécessaire, s'il est trop souple, les mouvements des cellules sont ralentis et si celui-ci est trop rigide, leur capacité à s'organiser en réseau complexe est diminuée. Les gradients de rigidité générés pendant la dégradation de la matrice extracellulaire par les « tip cells » favorisent et orientent la migration du bourgeon. La diminution de la rigidité promeut la migration des cellules endothéliales et leur acquisition du phénotype de « tip cell ». La matrice nouvellement générée autour de l'axe de migration permet de fournir aux « stalk cells » une force d'adhérence satisfaisante pour proliférer (91).
- Lors de la maturation du vaisseau, la rigidité environnante impacte le recrutement des cellules murales supportrices. Une rigidité accrue augmente le nombre de péricytes et de cellules musculaires lisses se positionnant autour du nouvel endothélium (91).

I.3. Le tissu osseux

I.3.1. Généralités sur le tissu osseux

Le tissu osseux forme des organes, les os, qui sont un mélange de matrice minérale et organique. Ils sont créés et entretenus par les cellules osseuses. Le tissu osseux dans son ensemble est extrêmement dynamique avec des fonctions variées et complètement indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, le tissu osseux joue un rôle dans :

- la mobilité de l'organisme en fournissant un ancrage aux muscles squelettiques par les tendons afin de permettre des mouvements complexes.
- La protection physique des organes vitaux avec des structures spécialisées, notamment la boîte crânienne pour le cerveau, la colonne vertébrale pour la moelle épinière et la cage thoracique pour le cœur et les poumons.
- La production de composés essentiels à la survie en servant de refuge pour les cellules souches hématopoïétiques, responsables notamment de la production des globules rouges, globules blancs et plaquettes.

- L'équilibre métabolique et énergétique. D'une part, Il sert de réservoir de métabolites grâce à sa composition riche en minéraux, permettant un accès aisé aux ions calciums et phosphates. D'autre part, il régule des mécanismes comme la thermogénèse dans les adipocytes ou la sécrétion d'insuline dans le pancréas au moyen de sécrétions endocrines (92).

I.3.2. Organisation générale du tissu osseux

On retrouve un total de plus de 200 os dans le corps humain adulte. Ceux-ci se rencontrent sous diverses formes décrites anatomiquement en tant qu'os longs (tibia, radius...), plats (côtes, plaques crâniennes...), courts (métacarpes...), sésamoïdes (patella...), ou encore irréguliers (vertèbres...).

Ces différentes formes d'os sont la résultante de l'organisation spatiale des deux types d'os composant le tissu osseux : l'os compact, aussi appelé cortical (lamellaire ou haversien) et l'os spongieux ou trabéculaire (93). Ces types d'os bien que d'organisation différente sont composés de deux phases :

- une phase organique faite de protéines de la matrice extracellulaire essentiellement (90%) de type collagènes (majoritairement de type 1). Le reste des protéines matricielles étant constitué de protéoglycanes (protéines sur lesquelles sont greffés des sucres) tels que la décorine, le biglycane, le lumican ou l'ostéoadérine. Enfin, on retrouve des protéines essentielles aux fonctions du tissu osseux comme l'ostéocalcine (OCN), l'ostéonectine, l'ostéopontine (OPN), et des facteurs de croissance dont la famille des protéines morphogénétiques osseuses (BMP : Bone Morphogenetic Protein) (94).
- Une phase inorganique principalement faite d'ions calciums et phosphates sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite carbonatée et avec des substitutions de monohydrogénophosphate, de formule chimique approchée $\text{Ca}_{8.3}(\text{PO}_4)_{4.3}(\text{CO}_3)_x(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0.3}$ avec $(x + y) = 1,7$ et x augmentant avec l'âge de l'individu. Le pourcentage massique de CO_3 varie de 5% à 9% selon l'os et l'âge de l'individu (95). On retrouve dans cette phase de nombreux autres ions sous forme de traces : hydrogénocarbonate, sodium, potassium, citrate, magnésium, carbonate, fluor, zinc, baryum, strontium... (94), (96).

Les cristaux de la phase inorganique se présentent sous forme de plaquettes nanométriques (environ 15-20 nm de long pour 7-15 nm de large avec une épaisseur de 2 à 4 nm) et s'orientent le long des fibres de collagène (97), (98). Le dépôt de l'hydroxyapatite s'initie au sein des fibres de collagène au niveau d'une séquence de répétition longitudinale présente tous les 670 Å. La croissance de la phase minérale autour du germe initial finit par occuper tout l'espace disponible autour de la phase organique. Ces deux phases forment un tissu composite minéralisé quand l'échafaudage créé par les fibres de collagènes est rempli d'hydroxyapatite (99).

I.3.2.1. L'os compact

L'os compact représente environ 80% du squelette total, c'est un type d'os dense (porosité habituelle <5%) et solide qui recouvre l'os spongieux situé au cœur des os. Son organisation et son positionnement dans un os est représenté dans la Figure 9 :

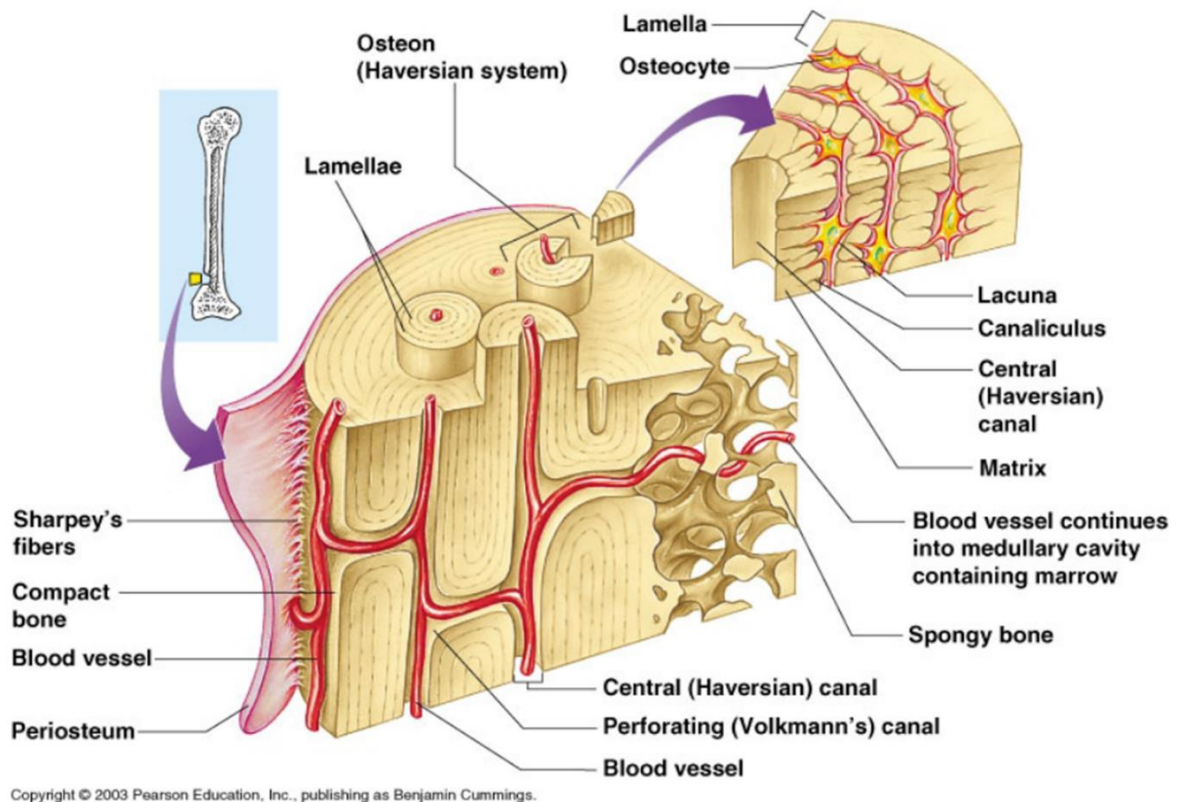


Figure 9: Anatomie de l'os compact et aperçu de l'os spongieux
 Gauche : os compact. Droite : aperçu de l'os spongieux décrit en partie I.3.2.2
 Adaptée de (100)

L'os compact vu dans la Figure 9 en coupe schématisée s'organise en sous-unités appelées ostéons, ostéones ou systèmes de Havers. Ces sous-unités sont des structures cylindriques de 400 nm de long et 200 nm de large et au nombre estimé de 21×10^6 chez l'adulte. Elles sont composées de lamelles de matrice minéralisée concentriques et sont connectées entre elles longitudinalement par un canal en leur centre appelé canal de Havers et transversalement par les canaux de Volkmann. Ces deux types de canaux sont traversés de capillaires et de terminaisons nerveuses (non représentées dans la Figure 9) permettant le transport de nutriments et l'innervation des os. On retrouve entre les lamelles osseuses des ostéocytes (Figure 9 en haut à droite) qui sont des cellules spécialisées dans la maintenance et la veille de l'os. Ces cellules sont connectées entre elles grâce à des canaux appelés canalicules où des prolongements cytoplasmiques se positionnent et se connectent avec ceux des cellules voisines au moyen de jonctions communicantes, ces cellules forment ainsi un syncytium fonctionnel. Les os compacts sont recouverts d'une couche fibreuse appelée périoste présente sur toute leur surface externe (Figure 9 à gauche) à l'exception des zones de cartilage articulaire (101).

Ce périoste est particulièrement important pour la croissance osseuse et la réparation de fracture. Il est composé de deux couches tissulaire (non représentées sur la Figure 9), une externe fibreuse et une interne appelée cambium, comportant de nombreuses cellules en contact avec l'os compact sous-jacent. La couche externe est elle-même composée de deux sous-couches : une inélastique externe composée de collagène, de fibroblastes et d'un important réseau neurovasculaire qui vient alimenter et innerver la surface et l'intérieur de l'os

sous-jacent. La sous-couche interne est quant à elle fortement élastique dû à sa composition majoritairement faite de fibres élastiques et de collagène. Le cambium possède des cellules souches mésenchymateuses, des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoblastes, des fibroblastes et un important réseau vasculaire qui apporte avec lui des péricytes ayant un potentiel ostéoblastique. Enfin, toutes les couches du périoste sont ancrées à la surface de l'os compact par de grandes fibres de collagènes appelées fibres de Sharpey (102).

Similairement, l'endoste (non représenté sur la Figure 9) est un tissu conjonctif situé sur l'intégralité de la surface interne de l'os au sein des canaux de Havers, des canaux de Volkmann, de la niche de la moelle osseuse et de l'os spongieux. Il est composé de nombreuses cellules avec un potentiel ostéoblastique important permettant une réparation efficace de l'os.

I.3.2.2. L'os spongieux

L'os spongieux représente environ 20% du squelette total, il s'organise en structures ressemblant à des nids d'abeille offrant un important espace au sein des os qu'il compose tout en offrant une résistance à la compression en toute direction (visible à droite de la Figure 9). La Figure 10 présente schématiquement l'os spongieux.

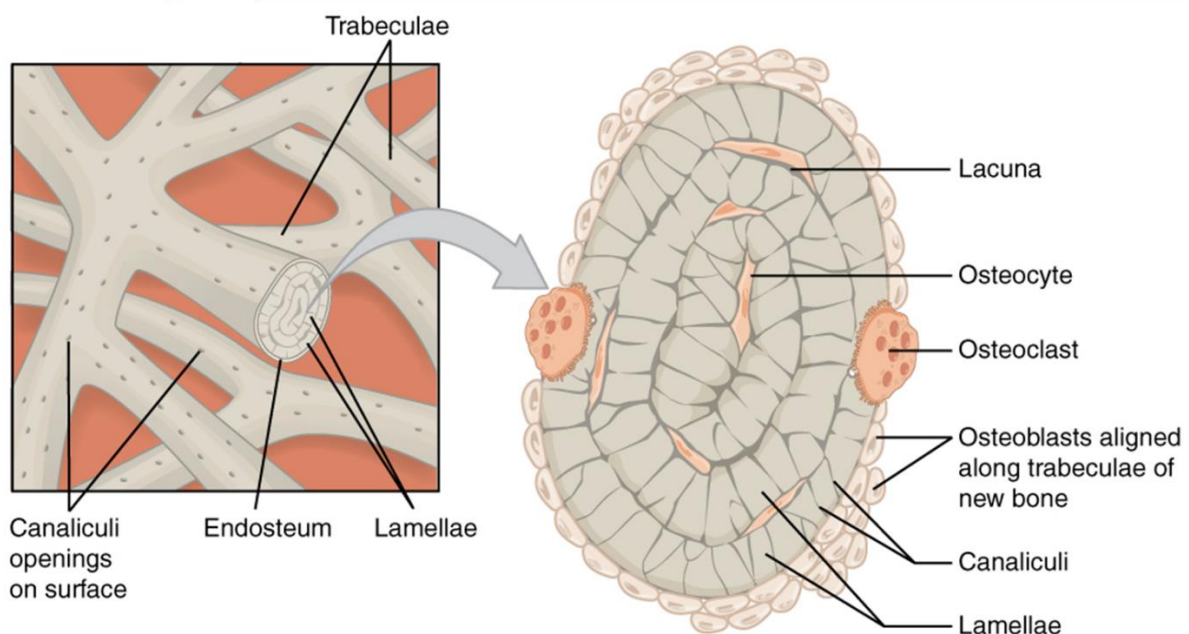


Figure 10 : Anatomie d'un trabécule d'os spongieux en remodelage

Figure adaptée de (103)

L'os spongieux (Figure 10 à gauche) est formé de sous-unités appelées trabécules allant d'une taille de 50 nm à 400 nm et constituées de lamelles de matrice minéralisée concentriques séparées par des canalicules et organisées en demi-lune, vues en coupe (Figure 10 à droite). Ces trabécules seraient environ 14×10^6 chez l'adulte et possèderaient une surface totale d'environ 7 m² au sein des os et à la surface de laquelle est présent l'endoste (101).

I.3.2.3. Description d'un os long

Les os longs sont généralement ceux le plus soumis au stress mécanique et donc ceux qui possèdent la meilleure résistance aux tensions. Leur fonction dans la motricité en fait aussi les os les plus fréquemment endommagés lors de traumatismes (104). Pour ces raisons ce sont des os très étudiés car leur bonne réparation est une condition essentielle à un regain de leurs propriétés mécaniques ainsi qu'à un retour à une qualité de vie normale suite à un traumatisme osseux important.

La Figure 11 présente schématiquement un os long (ici un fémur) :

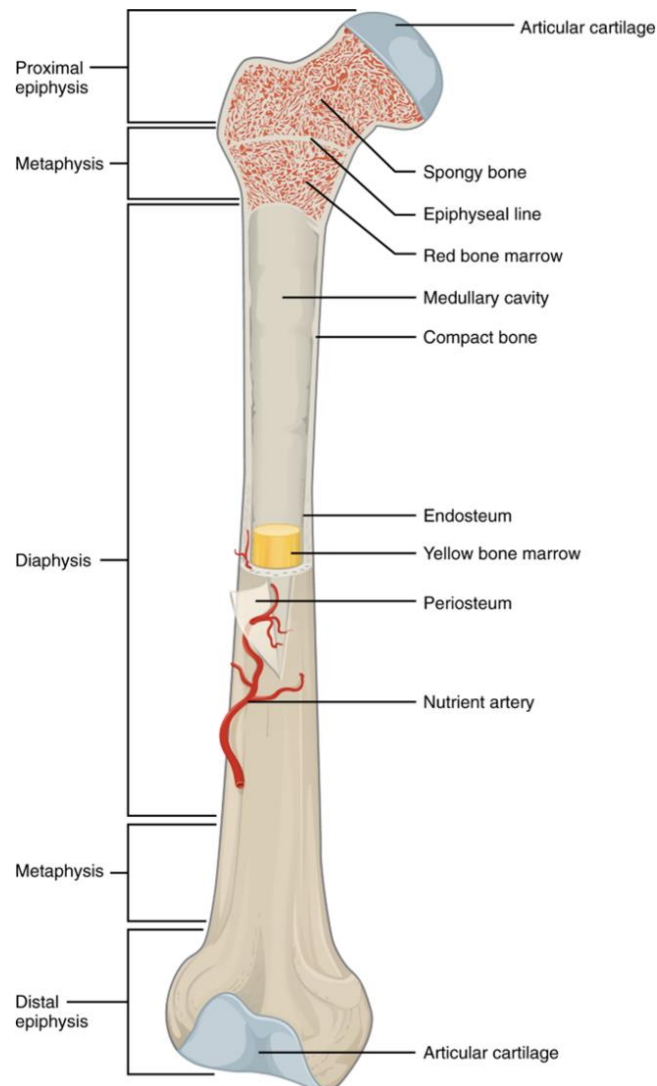


Figure 11 : Anatomie d'un os long

Figure adaptée de (103)

Les os longs (Figure 11) sont composés de trois zones :

- une partie centrale creuse appelée diaphyse.
- Deux parties médianes en cône appelées métaphyses.
- Deux parties distales arrondies que sont les épiphyses.

La diaphyse est essentiellement de l'os compact alors que les métaphyses et les épiphyses sont essentiellement de l'os spongieux recouvert d'une fine couche d'os compact. L'intérieur de la diaphyse est un long conduit appelé canal médullaire. Il est tapissé d'endoste et contient de la moelle osseuse jaune ayant peu de cellules souches hématopoïétiques car essentiellement composée d'adipocytes, de vaisseaux sanguins et de nerfs connectés. L'os spongieux des métaphyses et des épiphyses accueille principalement de la moelle rouge impliquée notamment dans la production d'hématies (101).

I.3.2.4. Description d'un os plat

Les os plats sont schématisés dans la Figure 12 :



Figure 12 : Anatomie d'un os plat

Figure adaptée de (103)

La composition d'un os plat (Figure 12) se résume à deux couches :

- un os compact fin formant une coque autour de l'os,
- une zone centrale d'os spongieux.

Dans un être humain adulte, les os les plus nombreux sont les os plats (côtes, plaques crâniennes...) et ils accueillent environ 80% de la moelle osseuse rouge produisant notamment les hématies (101).

I.4. Les cellules du tissu osseux

Un tissu osseux est formé et entretenu par les interactions de quatre types de cellules : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules bordantes de l'os et les ostéocytes. Les cellules bordantes de l'os et les ostéocytes sont des ostéoblastes en veille et dans un état de différenciation avancée situés respectivement à la surface de l'os ou au sein de l'os (94).

I.4.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdes capables de créer de l'os. Elles sont dérivées des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) et représentent de 4 à 6% de

toutes les cellules nichant dans et sur l'os. Ce sont des cellules au phénotype typique de cellules polarisées sécrétrices de protéines : elles possèdent un réticulum endoplasmique rugueux¹² très développé et un important appareil de Golgi¹³. On observe sous la membrane plasmique de nombreuses vésicules sécrétoires orientées vers la surface de l'os. Une fois matures, certains ostéoblastes ont des prolongements cytoplasmiques s'enfonçant dans l'os et atteignant les ostéocytes présents au cœur du tissu osseux sous-jacent. Après cette maturation, les ostéoblastes peuvent emprunter trois voies : la mort par apoptose, devenir des cellules bordantes de l'os ou devenir des ostéocytes (94).

La différenciation de CSM en ostéoblastes est un phénomène essentiel pour le modelage, remodelage et la réparation osseuse. Des gènes spécifiques sont activés pour diriger la différenciation des CSM vers les progéniteurs ostéochondraux. Les gènes nécessaires aux différents devenir des CSM sont illustrés dans la Figure 13.

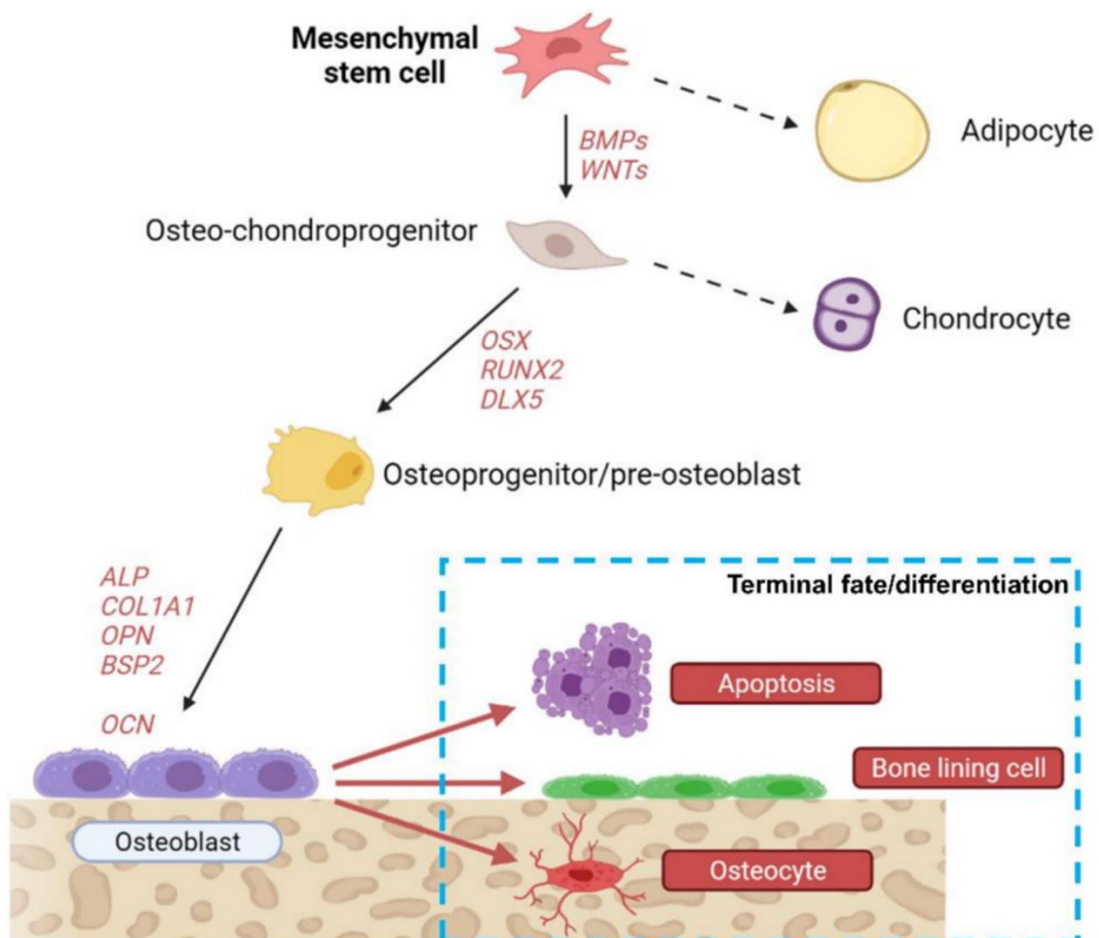


Figure 13 : Différenciation et devenir final des ostéoblastes matures

OSX : ostérix ; DLX5 (Distal-less homeobox 5) ; BSP2 (Bone sialoprotein II) : sialoprotéine osseuse de type II. Adaptée de (105)

La différenciation des CSM en pré-ostéoblastes (Figure 13) se fait en réponse, dans la majorité des cas, à l'activation de la voie des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) ou de la

¹² Le réticulum endoplasmique rugueux est un organite orienté vers la production de protéines

¹³ L'appareil de Golgi est un organite de tri, de modification et de sécrétion des protéines

voie de Wnt (wingless-related integration site) : Wnt/ β -Caténine. La signalisation par la voie Wnt est un acteur essentiel du remodelage osseux en empêchant la différenciation des CSM vers les lignées adipocytaires et chondrocytaires. Pour diriger les progéniteurs vers le stade de pré-ostéoblaste, l'expression des protéines ostérix, Dlx5 (Distal-less homeobox 5) et le facteur de transcription apparenté à Runt 2 (Runx2 : Runt-related transcription factors 2) est nécessaire (105). Runx2 est par ailleurs un facteur de transcription indispensable à cette différenciation, son absence entraînant une absence d'ostéoblastes (94)(105). Une fois à l'état de pré-ostéoblastes, ces cellules vont se différencier en ostéoblastes matures en exprimant séquentiellement différentes protéines qui sont schématisées sur la Figure 14. Les ostéoblastes matures peuvent ensuite mourir par apoptose, devenir des cellules bordantes de l'os ou des ostéocytes qui sont des cellules détaillées ultérieurement dans les parties 0 et 1.4.3 respectivement.

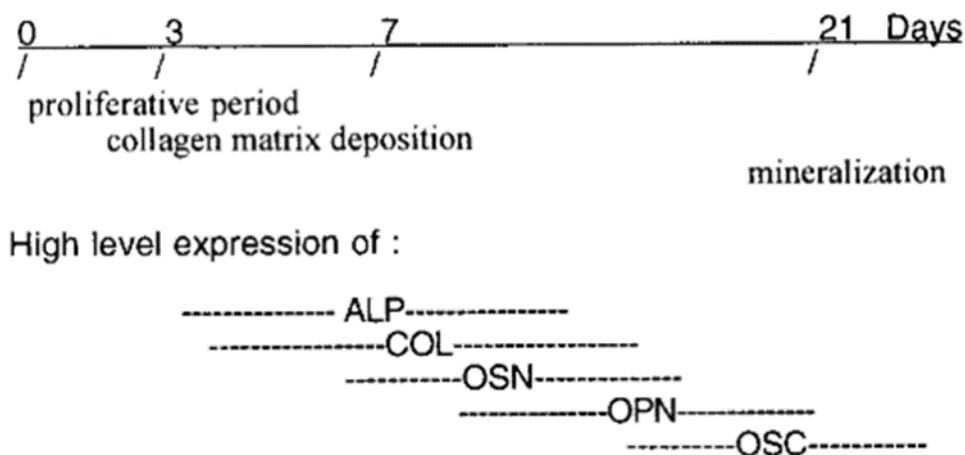


Figure 14: Comportement de pré-ostéoblastes et temporalité d'expression de marqueurs ostéogéniques typiques

Figure extraite de (106). ALP = Phosphatase Alcaline, COL = Collagène 1, OSN = Ostéonectine, OPN = Ostéopontine, OSC = Ostéocalcine

Un pré-ostéoblaste (Figure 14) entame une phase de prolifération puis de différenciation. Au cours de leur différenciation, ces pré-ostéoblastes expriment *Col1A1* et mûrissent jusqu'à produire de la phosphatase alcaline (ALP : Alkaline Phosphatase). Au cours de la maturation, ces cellules s'agrandissent et prennent leur forme cuboïde typique. Elles augmentent leur expression de la protéine ostérix, sécrètent des protéines de la matrice organique de l'os comme l'OCN, l'OPN, la sialoprotéine osseuse de type I et II (BSP I/II), l'ostéonectine et le collagène de type 1. L'OPN possède un domaine de liaison à l'hydroxyapatite et un domaine de liaison à motif RGD (Arginine – Glycine – Acide aspartique). Ce motif peptidique permet sa liaison aux cellules par le biais des intégrines $\alpha\beta3$ et par conséquent des cellules à l'os (107). L'OPN augmente donc l'adhérence des ostéoblastes et ostéoclastes à l'os. Sa présence augmente l'activité des ostéoclastes par sa liaison avec l'intégrine $\alpha\beta3$ (108). Elle agit aussi en tant que facteur régulateur de la minéralisation osseuse en limitant la cristallisation de l'hydroxyapatite (109), (110). L'OCN est la protéine la plus abondante de la matrice organique de l'os après le collagène. Elle est exprimée uniquement par les ostéoblastes et sa fonction précise dans l'os est encore mal connue mais des études suggèrent un rôle régulateur de la minéralisation en limitant la vitesse de minéralisation. Une étude récente renforce cette

hypothèse en montrant qu'elle est essentielle à la bonne orientation des cristaux d'hydroxyapatite et donc renforce la résistance mécanique de l'os (111). De plus, elle agirait de concert avec l'OPN et le collagène en formant des réseaux protéiques capables de stabiliser les sites de fractures et de prévenir leur agrandissement (112).

En plus de ces protéines sécrétées, la présence de la protéine connexine 43 qui permet aux ostéoblastes de former des jonctions communicantes est essentielle à leur maturation, à la synchronisation des cellules lors du remodelage osseux et à la formation des ostéocytes (94).

I.4.2. Les cellules bordantes de l'os

Les cellules bordantes de l'os sont des ostéoblastes redevenus quiescents qui se sont aplatis et recouvrent la surface de l'os en l'absence de résorption ou de formation osseuse. Leur phénotype est typique de cellules quiescentes avec un noyau lui-même aplati, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi peu développés. Elles conservent leurs jonctions communicantes grâce à la connexine 43 et certaines de ces cellules sont en contact avec les ostéocytes situés au cœur de l'os grâce à des prolongements cytoplasmiques formant un réseau connecté de cellules osseuses en veille. Elles joueraient un rôle de gestion de l'activité des ostéoclastes. Elles serviraient en effet de protection de la surface de l'os contre l'agression incontrôlée des ostéoclastes en leur en empêchant l'accès. Elles peuvent également moduler leur différenciation en étant capable de sécréter de l'OPG et le ligand de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa-B (RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) comme évoqué ultérieurement (I.4.4) (94). Lors du remodelage osseux elles sont responsables de la formation de la canopée qui isole la zone remodelée (99). Elles sont également essentielles à la résorption osseuse en dégradant les fibrilles de collagène après le passage des ostéoclastes ce qui est une étape nécessaire à la déposition d'os nouveau par les ostéoblastes (113).

I.4.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont d'anciens ostéoblastes matures redevenus partiellement quiescents une fois encastrés dans le tissu osseux qu'ils synthétisaient. Ils expriment des protéines caractéristiques comme la sclérostine ou la protéine de la matrice de la dentine 1. La sclérostine, codée par le gène *SOST* est sécrétée par les ostéocytes, c'est une protéine centrale dans l'homéostasie du tissu osseux. Elle inhibe la voie Wnt et donc la différenciation de CSM en précurseur ostéoblastique (voie de signalisation normale en Figure 13), ce qui limite l'ostéogenèse dans leur environnement (114). Les ostéocytes représentent de 90 à 95% des cellules présentes au sein de l'os avec une durée de vie très élevée, des cellules âgées de 25 ans ayant été identifiées. Ce sont des cellules d'apparence dendritiques (avec de nombreux et fins prolongements) mais dont la morphologie précise dépend du type d'os qu'elles occupent (94). Le cloisonnement imposé aux ostéoblastes par l'os nouvellement formé serait un signal essentiel à l'induction de la différenciation en ostéocyte. Les mécanismes responsables ne sont pas encore identifiés mais un rôle de l'hypoxie, de l'arrêt de la prolifération et d'une signalisation par les intégrines sur toute la surface de la cellule sont des hypothèses envisagées (115). Suite à cet encastrement dans l'os, les ostéoblastes en cours de différenciation diminuent leur activité sécrétrice et développent des prolongements cytoplasmiques se connectant aux ostéocytes préexistants et aux cellules à la surface de l'os grâce aux jonctions communicantes permises par la connexine 43.

L'os est par conséquent traversé en toute part d'un réseau cellulaire capable d'échanger rapidement des petites molécules. De plus, les lacunes dans lesquelles sont situées les ostéocytes se trouvent à proximité des capillaires pour leur permettre de recevoir nutriments et oxygène. Ces lacunes permettent aussi le mouvement de fluides interstitiels. La mort par apoptose des ostéocytes signalant un tissu dégradé ou mal alimenté est un signal déclencheur de la résorption osseuse. Les ostéocytes sont capables de ressentir les forces mécaniques exercées sur eux, supposément par un complexe protéique spécialisé ou/et par les déformations de leur cytosquelette. Suite au signal ressenti, ils réguleraient l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes environnants permettant, par exemple, le renforcement d'un tissu osseux fortement sollicité mécaniquement (94).

I.4.4. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées au bout de leur voie de différenciation et sont issues des cellules souches hématopoïétiques. La différenciation de pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures capables de fusionner entre eux passe par le facteur central connu sous le nom de ligand de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa-B (RANKL) identifié en 1999 (116), (117). Il est indispensable tant *in vitro* qu'*in vivo* pour la différenciation de pré-ostéoclaste en ostéoclaste mature (118, 119). RANKL est exprimé, entre autres, à la surface d'ostéoblastes et interagit avec l'activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa-B (RANK : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B) à la surface des pré-ostéoclastes. Ce dernier est exprimé en présence du facteur stimulateur des colonies de macrophages (M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor) et stimule leur différenciation en ostéoclastes. La différenciation peut être inhibée par l'ostéoprotégérine (OPG) qui se lie à RANKL et l'empêche d'activer RANK. L'OPG est exprimée par les ostéoclastes matures mais également par les ostéoblastes et les cellules bordantes de l'os et participe à la communication juxtacrine entre ces cellules.

RANKL peut être clivé par des MMPs ce qui génère une forme soluble (120, 121) qui conserve une activité (122) (121). Une inhibition du clivage par knock-out (KO) de MMP14 dans une coculture ostéoblastes/ostéoclastes conduit à une augmentation de l'ostéoclastogénèse suggérant que la forme soluble est moins efficace que la forme membranaire (120), (94).

RANKL est exprimé principalement dans des cellules mésenchymateuses et dans les ostéocytes, qui l'expriment environ 10 fois plus que les ostéoblastes. L'ostéoclastogénèse, la formation d'ostéoclastes matures, n'est pas contrôlée exclusivement par les ostéocytes malgré cette forte expression de RANKL car l'expression d'OPG par les ostéoblastes et les cellules bordantes de l'os doit être réprimée. L'ostéoclastogénèse est un processus impliquant toutes les cellules osseuses d'une zone à remodeler (123). Le contrôle de cette régulation évolue avec l'âge de l'individu. Des travaux supprimant l'expression de RANKL dans différents types cellulaires chez la souris, montrent que chez les individus jeunes, les sources de RANKL sont aussi des chondrocytes hypertrophiques présents dans les plaques de croissance (structure à l'extrémité des os longs où celui-ci gagne en taille), et des ostéoblastes mais pas des ostéocytes. Chez des souris âgées, les ostéoblastes ne participent plus à la présentation de RANKL et les ostéocytes prennent le relais (123–125).

L'interaction RANKL/RANK promeut l'expression de NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), qui est le facteur de transcription central de l'ostéoclastogénèse, et de la protéine DC-STAMP (Dendrocyte expressed seven transmembrane protein). Ces deux facteurs centraux stimulent des voies de transcription nécessaires à l'expression de gènes

spécifiques des ostéoclastes comme la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase) et la cathepsine K (126).

I.4.5. Interactions entre cellules osseuses

I.4.5.1.1. Le remodelage osseux et l'unité multicellulaire de base

Malgré son apparence minérale et figée dans le temps, les os sont en constant remodelage grâce à l'action simultanée des unités multicellulaires de base (UMB, BMU en anglais : Basic Multicellular Unit) permettant de renouveler jusqu'à 10% du tissu osseux chaque année (127). Ces UMB sont des petites structures couplant l'activité de résorption des ostéoclastes à l'activité de déposition de l'os des ostéoblastes lors du cycle de remodelage. Ce cycle se réalise en cinq étapes : l'activation, la résorption, l'inversion, la formation et la terminaison. Ce cycle est réalisé petit à petit à différents endroits simultanément (sans coordination temporelle des phases du remodelage) sur l'ensemble du tissu osseux par les UMB. Cela permet son renouvellement constant, entraînant sa réparation, son renforcement et la libération des espèces chimiques de la phase minérale en fonction des besoins (99). La structure schématisée d'une UMB est présentée dans la Figure 15 :

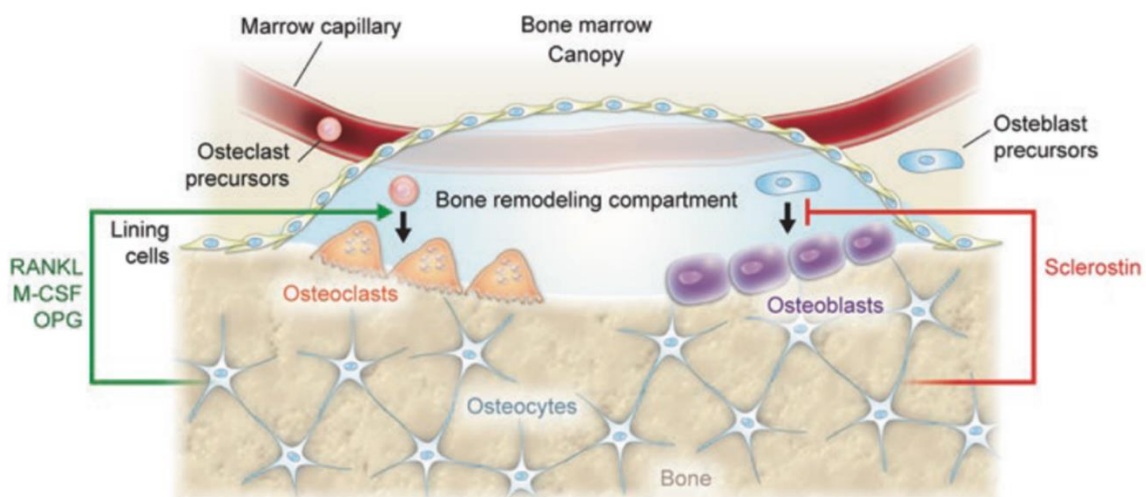


Figure 15 : Anatomie simplifiée d'une unité multicellulaire de base (UMB) et du compartiment de remodelage osseux

Extraite depuis (128)

La composition d'une UMB (Figure 15) est faite d'ostéoclastes, d'ostéoblastes et est alimentée par un capillaire sanguin. Elle est cloisonnée dans l'espace par un tissu conjonctif la recouvrant, appelé canopée, formé par les cellules bordantes de l'os et délimitant un compartiment de remodelage osseux. Structuellement, on peut identifier trois « régions » au sein d'une UMB. Premièrement, la canopée formée par des cellules bordantes de l'os et connectée à un capillaire de la moelle osseuse. Ce capillaire permet l'alimentation des cellules de l'UMB et permet aux précurseurs ostéoclastiques d'atteindre le site de remodelage. Deuxièmement, la surface de l'os où sont situés les ostéoclastes matures et les ostéoblastes. Les premiers résorbent l'os et sont suivis par les seconds qui déposent de l'os néoformé. Troisièmement, l'intérieur de l'os en remodelage et les ostéocytes qui régulent le processus en participant au recrutement des ostéoclastes grâce à M-CSF et à leur maturation avec la

signalisation RANKL et OPG (évoqué en partie I.4.4). En parallèle, la sécrétion de la sclérostine par les ostéocytes limite la formation osseuse en bloquant la voie Wnt essentielle à la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes comme évoqué en partie I.4.1. La sclérostine est essentielle au bon remodelage osseux (129), (114).

Le mode d'action d'une UMB dépend de l'os en remodelage, sur l'os compact elle forme un cylindre sur l'ostéon alors qu'elle forme une tranchée sur l'os spongieux, s'étale sur 4 mois pour le premier et sur près de 9 mois pour le second. Cette longue période dépasse la durée de vie des cellules la composant et nécessite donc de former de nouveaux ostéoclastes et ostéoblastes pendant son action. Cette formation se fait sous le contrôle des ostéocytes environnants dans les 2 types d'os.

La sélection de la zone de remodelage peut se faire par les ostéocytes, comme évoqué en partie I.4.3, qui en cas d'apoptose vont sécréter des facteurs pro-remodelage. Une sélection aléatoire des zones à remodeler se fait également sous le contrôle de l'hormone parathyroïdienne (PTH) dans sa participation à l'homéostasie du calcium (99).

Le cycle détaillé d'après (99) et (130) s'effectue comme suit :

- L'activation des précurseurs ostéoclastiques qui sont recrutés depuis la circulation sanguine. Ils se positionnent sur l'os que les cellules bordantes viennent de libérer pour délimiter la zone d'action de l'UMB. Les pré-ostéoclastes se différencient et fusionnent pour former des ostéoclastes matures.
- La résorption, pendant 2 semaines en moyenne, où les ostéoclastes matures dégradent la matrice minérale puis la matrice organique. Les ostéoclastes meurent ensuite par apoptose évitant ainsi une trop importante résorption.
- L'inversion qui dure de 4 à 5 semaines pendant lesquelles la surface de l'os fraîchement dégradée est nettoyée de ses débris par des macrophages. En parallèle, elle est préparée par des cellules de la lignée ostéoblastique qui retirent la matrice de collagène non minéralisée et déposent une couche de matrice minéralisée sans collagène. Cette matrice augmente l'adhérence des ostéoblastes à cette zone.
- La formation qui peut durer jusqu'à 4 mois pendant lesquels les ostéoblastes matures sécrètent d'abord une matrice organique riche en collagène de type 1 puis assistent à la minéralisation de cette matrice.
- La terminaison où les ostéoblastes vont soit mourir par apoptose, se transformer en cellules bordantes de l'os ou devenir des ostéocytes s'ils ont été inclus dans l'os. Cette phase est réalisée grâce à la sécrétion de facteur anti-ostéogéniques comme la sclérostine.

I.4.5.1.2. Contrôle du remodelage osseux.

Le remodelage osseux est finement contrôlé au niveau cellulaire local mais sa régulation est opérée à l'échelle de l'organisme entier. La Figure 16 ci-dessous résume les nombreux acteurs principaux de la régulation du remodelage osseux.

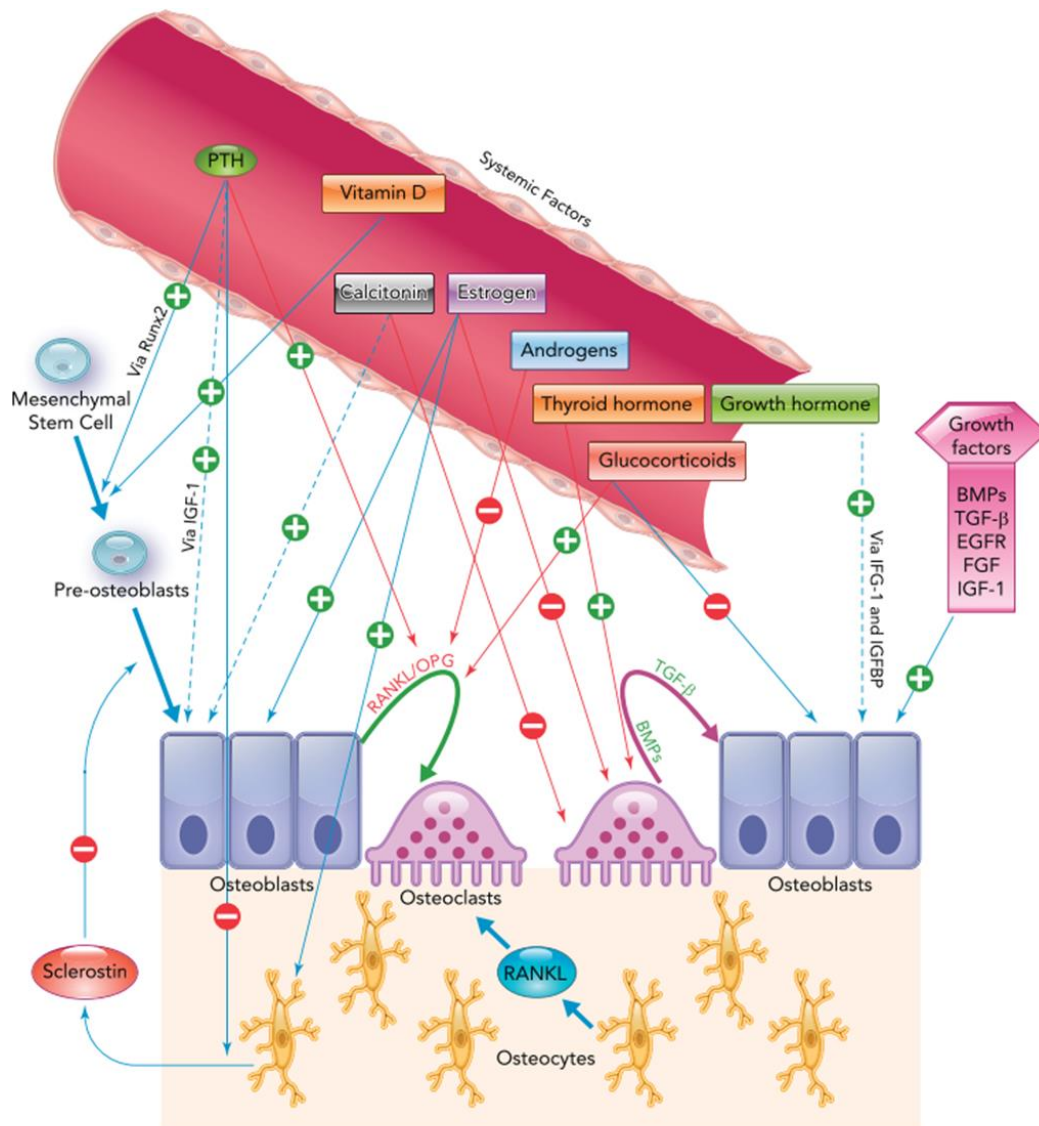


Figure 16 : Contrôle du remodelage osseux

+ = stimulation, - = inhibition. Extraite depuis (131)

La régulation du remodelage osseux à l'échelle de l'organisme (Figure 16) est effectuée par de nombreuses hormones, molécules sécrétées principalement par des glandes endocrines, et par des facteurs de croissance.

Les hormones ont des fonctions pro-formation osseuse ou pro-résorption osseuse et certaines sont capables d'exercer les deux fonctions selon le contexte. Ces fonctions synthétisées en Figure 16 sont détaillées par la suite grâce à l'exploitation des données d'un article de synthèse (131).

L'hormone parathyroïdienne (Figure 16, « PTH, ») a pour fonction de maintenir l'homéostasie du calcium dans le sang. Elle agit sur la lignée ostéoblastique et peut être pro-formation à petites doses intermittentes ou pro-résorption à forte dose constante. La stimulation de la résorption se réalise en stimulant l'expression de RANKL et inhibant celle d'OPG chez les ostéoblastes, ce qui entraîne la maturation des ostéoclastes. La stimulation de la formation

osseuse se fait en promouvant la prolifération et la différenciation de la lignée ostéoblastique notamment par l'activation de la voie Wnt et l'inhibition de l'expression de la sclérostine par les ostéocytes.

La vitamine D (Figure 16) est également impliquée dans l'homéostasie du calcium en agissant sur son assimilation et maintien dans l'organisme. Dans l'os, elle a un rôle pro-formation osseuse par une action autocrine¹⁴ promouvant la différenciation des ostéoblastes et le couplage de la résorption à la formation osseuse. Des taux élevés de vitamine D peuvent entraîner une hypercalcémie en raison d'une plus grande absorption par l'alimentation et par la sur-mobilisation du tissu osseux (132).

La calcitonine (Figure 16) est une hormone exerçant une fonction pro-formation par inhibition de la formation de la bordure en brosse des ostéoclastes (une structure cellulaire essentielle à la résorption) et en réduisant leur nombre. La calcitonine favoriserait la différenciation des ostéoblastes et inhibe également leur apoptose ainsi que celle des ostéocytes.

Les œstrogènes (Figure 16, « Estrogen ») sont des hormones pro-formation en inhibant la différenciation des ostéoclastes et en stimulant leur apoptose. Elles agiraient en bloquant la signalisation RANKL chez les ostéoclastes, en modulant l'expression de cytokines pro-résorption comme l'interleukine (IL)-1, IL-6, le TNF- α et M-CSF. Les œstrogènes inhiberaient l'apoptose des ostéoblastes.

Les androgènes (Figure 16) sont des hormones pro-formation qui inhibent la différenciation des ostéoclastes. Elles agissent par deux méthodes : par inhibition directe des ostéoclastes et par interaction avec le système RANKL/RANK/OPG par le biais des ostéoblastes et ostéocytes. De plus, chez les ostéoblastes, ils augmentent la sécrétion de collagène de type 1, d'OCN et l'activité de l'ALP et donc augmentent l'activité pro-formation.

L'hormone thyroïdienne triiodothyronine (Figure 16) est une hormone pro-résorption qui a néanmoins un effet stimulant sur la différenciation des ostéoblastes mais inhibe leur prolifération. Son principal effet est de stimuler l'activité ostéoclastique directement et indirectement en modulant l'expression de cytokines pro-résorption.

Les glucocorticoïdes (Figure 16) sont des hormones pro-résorption en promouvant la différenciation des ostéoclastes par augmentation de l'expression de RANKL et inhibition de l'expression d'OPG. Une exposition prolongée peut également directement inhiber la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. Ils diminuent la sécrétion des œstrogènes et des androgènes, deux familles d'hormones pro-formation comme évoqué précédemment ce qui renforce encore leurs effets pro-résorption.

L'hormone de croissance GH (Figure 16) est une hormone pro-formation qui agit directement sur les ostéoblastes car elle stimule leur prolifération et la production de collagène. Elle agit également de concert avec l'hormone PTH où cette action combinée diminue la résorption.

De nombreux facteurs de croissance non hormonaux (Figure 16) ont également d'importantes fonctions sur le remodelage osseux avec des fonctions variées et contrastées soulignant d'importants rôles régulateurs. Les données présentées sont également issues de l'exploitation des données de l'article de synthèse précédent (131).

La famille des BMP (Figure 16) qui comprend de nombreux membres orientant la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique : BMP-2, -4, -5, -6 et -7 qui ont un fort

¹⁴ Dans une sélection autocrine la cellule qui sécrète le composé en possède un récepteur

effet pro-formation en augmentant l'expression de Runx2 et Ostérix. Par exemple, une des actions de BMP-2 est d'augmenter très fortement l'expression d'OCN au point qu'une courte expression transitoire de BMP-2 suffise à entrainer la formation osseuse.

Les 2 facteurs de croissance transformant β (TGF β : Transforming Growth Factor β) TGF β 1 et 2 (Figure 16) sont impliqués dans le remodelage osseux. TGF β 1 est pro-formation en stimulant l'apoptose des ostéoclastes tandis que TGF β 2 est pro-résorption en stimulant l'activité des ostéoclastes. De plus les TGF β ont des effets qui peuvent apparaitre opposés sur les ostéoblastes. Ils stimulent les premières étapes de leur différenciation et le dépôt de protéines dans la phase organique de l'os puis inhibent leur maturation complète. Les TGF β agissent également en opposition avec la voie des BMP et travaillent de concert avec l'hormone PTH dans ses rôles pro-formation et pro-résorption. Le dépôt de TGF β dans la phase organique de l'os est un important facteur pro-formation. Quand les ostéoclastes le libèrent de l'os il peut stimuler la différenciation de CSM en pré-ostéoblastes.

Les facteurs de croissance de l'épiderme (EGF : Epidermal Growth Factor) et leur récepteur EGFR (Figure 16) ont des fonctions à priori contradictoires : l'absence d'EGFR entraine des défauts de formation osseuse et une résorption trop importante suggérant que son activation est pro-formation. Pourtant, ses ligands EGF sont des inhibiteurs de la différenciation des ostéoblastes et diminuent l'expression des facteurs de transcription clefs Runx2 et Ostérix. De plus, ils diminuent la production d'OPG par les ostéoblastes ce qui favorise la différenciation des ostéoclastes. Le système EGFR/EGF serait au final stimulateur du remodelage osseux et favorise l'ostéogénèse.

Les facteurs de croissance des fibroblastes dont les membres FGF-2 et FGF-18, ont des fonctions pro-formation (Figure 16). FGF-2 est notamment essentiel à l'action pro-formation de l'hormone PTH et de BMP-2 et il stimule la différenciation de CSM en pré-ostéoblastes. FGF-18 est un régulateur de cette différenciation et son absence entraine un retard d'ossification. Un autre membre, FGF-23, est impliqué dans l'homéostasie du phosphate de manière endocrine, (133), et a une fonction qui dépend du contexte, avec une régulation par l'hormone PTH et la vitamine D. De plus, leur récepteur FGFR1 est un inhibiteur de la maturation des ostéoblastes alors que FGFR2 régule positivement l'activité ostéogénique de ces derniers.

Le facteur de croissance similaire à l'insuline 1 (IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1) (Figure 16) est le facteur de croissance le plus déposé dans la phase organique du tissu osseux et son activité est nécessaire au maintien d'un équilibre entre résorption et formation. Il stimule la différenciation de CSM en ostéoblastes mais également celle des ostéoclastes notamment en maintenant à un niveau physiologique l'expression du système RANKL/RANK. C'est un facteur de croissance qui agit également de concert avec l'hormone PTH dans son rôle pro-formation.

Malgré cette régulation déjà très complexe, de nombreux autres mécanismes de régulation existent. Par exemple les ostéoclastes sécrètent le micro-ARN¹⁵ (ARN : Acide ribonucléique) miR-214-3p qui réduit l'activité ostéogénique des ostéoblastes en entrainant une diminution de l'expression d'ALP, d'OPN et de BSP II, et donc conduit à une plus faible formation de tissu osseux (134). Les ostéoclastes peuvent aussi sécréter le composé 3a du complément¹⁶ qui

¹⁵ Les micro-ARN sont de petites séquences d'ARN qui se lient et bloquent la traduction de l'ARN messenger en protéine.

¹⁶ Le complément est un système protéique jouant un rôle important dans l'immunité innée.

stimule la formation d'os et qui pourrait servir à stimuler les ostéoblastes sur le site de résorption osseuse pour assurer le renouvellement du tissu (135).

I.4.5.1.2.1. Mécanisme de la résorption osseuse

Pour leur activité de résorption osseuse, les ostéoclastes doivent adhérer au tissu osseux et former un anneau d'actine au niveau de leur pôle basal pour sceller la zone à résorber. Cette zone, au-dessous de laquelle l'os sera résorbé, est isolée pour protéger l'environnement extérieur et concentrer les acteurs de la dégradation de la matrice osseuse. Le mécanisme contrôlant la polymérisation de l'anneau d'actine passe par une forte adhérence de l'ostéoclaste à la surface de l'os grâce à l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Cette liaison active la protéine c-Src et permet la formation d'un important réseau dynamique de podosomes¹⁷ (136–138). Pour augmenter la sécrétion de facteurs de dégradation de la matrice osseuse, la membrane au sein de la fosse de résorption devient circonvoluée et développe de nombreuses microvillosités. Cette structure est appelée la bordure en brosse (94). Pour dégrader la matrice inorganique de l'os, les ostéoclastes sécrètent des protons via des canaux ioniques spécialisés appelés V-ATPases situés sur la bordure en brosse (139). Dans le même temps, le canal ionique ClC-7 (Chloride channel 7 alpha subunit, ou canal chlorure) et sa sous-unité Ostm1 (Osteopetrosis-associated transmembrane protein 1) ont pour fonction la neutralisation des charges positives au sein de la chambre de résorption en y déplaçant du Cl⁻. En parallèle, l'enzyme CA2 catalyse une réaction produisant HCO₃⁻ et H⁺ à partir d'acide carbonique, le proton est sécrété par les V-ATPases dans la lacune de résorption et HCO₃⁻ est utilisé par des échangeurs d'anions pour ramener Cl⁻ dans le cytosol (140). D'autres enzymes de la dégradation du tissu osseux sont également sécrétées comme la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), la cathepsine K et MMP-9. Cette combinaison de produits sécrétés permet la dégradation de la phase organique après la dissolution de la phase inorganique par les protons (94). La lacune présente dans l'os suite à cette action est appelée lacune de Howship.

I.4.5.1.2.2. Mécanisme de la synthèse osseuse

La synthèse de l'os est réalisée par les ostéoblastes qui déposent tout d'abord la phase organique, souvent appelée ostéoïde, puis minéralisent celle-ci. Les protéines sécrétées sont principalement des fibres de collagène, majoritairement de type 1, des protéoglycanes comme la décorine, le biglycane et l'ostéoadérine et des protéines comme l'OCN, l'ostéonectine, l'ostéopontine et la BSP II.

Les mécanismes précis de la minéralisation ne sont pas encore complètement élucidés mais elle s'effectuerait de deux manières complémentaires :

- Une minéralisation vésiculaire qui débute par la sécrétion de vésicules de 30 à 200 nm de diamètre depuis la face apicale des ostéoblastes sur la matrice organique récemment déposée. Ces vésicules riches en ions calciums se lient à la matrice organique pendant que les protéoglycanes immobilisent ces ions grâce à leurs charges négatives. La subséquente dégradation de ces protéoglycanes par les ostéoblastes entraîne la libération des ions calciums et leur concentration dans les vésicules grâce à une internalisation par la protéine annexine. En parallèle, l'action

¹⁷ Les podosomes sont des prolongements coniques de la membrane plasmique contenant de nombreux filaments d'actine et retrouvés principalement aux extrémités de la cellule. Ils sont impliqués dans la motilité des cellules.

d'enzymes de type phospholipase cliverait des phospholipides pour les transformer en phosphocholine, elle-même clivable par l'enzyme PHOSPHO1 (Phosphoethanolamine/Phosphocholine phosphatase 1) afin de libérer du phosphate inorganique P_i . La concentration croissante de Ca^{2+} et de P_i conduirait à la précipitation de cristaux d'hydroxyapatite « biologique » au sein de ces vésicules qui finiraient par éclater sous la pression des cristaux formés(94) (96).

- Une minéralisation s'effectuant entre les fibres de collagène de type 1 suite à la dégradation du pyrophosphate inorganique par l'ALP. Le P_i et les ions Ca^{2+} extracellulaires précipitent au sein des fibrilles de collagène de type 1 dans des zones inaccessibles aux inhibiteurs de la minéralisation grâce à des espaces nanométriques existants dans l'arrangement spécifique des multimères de ces fibres de collagène. Pour cette minéralisation la dégradation du pyrophosphate inorganique est une étape essentielle car la déposition d'hydroxyapatite est dépendante du ratio molaire pyrophosphate inorganique/phosphate inorganique. Une étude *in vivo* de la minéralisation de cartilage d'embryon de poulet montre que la déposition est optimale lorsque le ratio dépasse 140 et complètement inhibée lorsqu'il est inférieur à 70 (141).

I.4.6. Le système vasculaire dans l'os long :

Le tissu osseux comprend de nombreuses cellules, il doit être approvisionné en nutriments, en oxygène et se débarrasser de ses déchets grâce à la circulation du sang. Le réseau vasculaire des os est similaire au reste des organes irrigués avec des capillaires les traversant. Cependant, dans l'os long normal le réseau vasculaire est un peu différent, il est illustré dans la Figure 17.

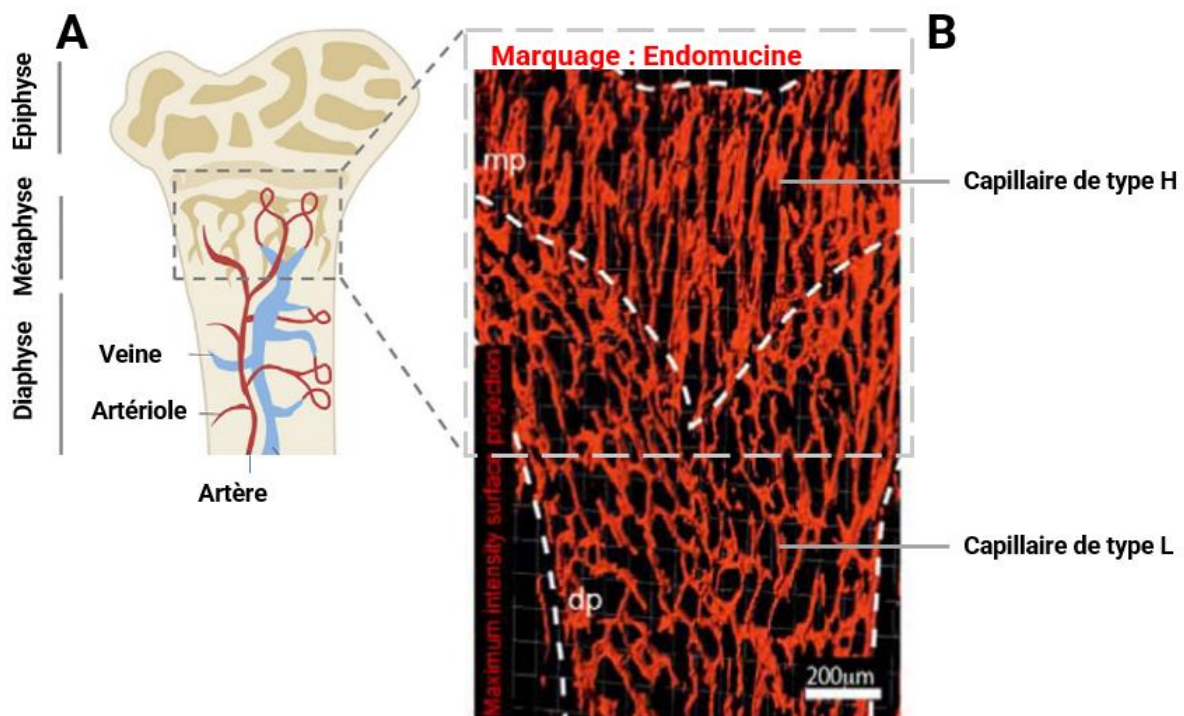


Figure 17 : Système sanguin au sein de l'os

A : schématisation générale d'un os long, les points d'entrée des veines et des artères (non représentés) se trouvent généralement au niveau de la métaphyse. Chez les petits rongeurs, la plaque de croissance épiphysaire (non représentée) subsiste à l'âge adulte et est irriguée par les capillaires de type H ; B : coupe observée par microscopie confocale de fémur de souris âgée de deux semaines. Les pointillés délimitent les zones de l'os observées : mb = métaphyse, dp = diaphyse. Adaptée de (47) & (142)

Le système vasculaire d'un os long (Figure 17) est le suivant : les artères entrent par les extrémités distales sous l'épiphysaire à travers l'os compact pour venir irriguer la plaque épiphysaire. Quelques autres artères traversent l'os de la métaphyse à la diaphyse pour irriguer l'endoste. Les veines occupent une position centrale et sont reliées aux capillaires environnants puis passent généralement au centre de la diaphyse et sortent par l'os compact sous l'épiphysaire. Les capillaires au sein des os longs sont organisés en deux types labélisés « H » et « L », distincts dans leur organisation et leur identité moléculaire mais reliés ensemble au sein d'un même réseau. Les type H expriment fortement PECAM-1 et l'Endomucine là où les type L les expriment moins ou peu. Les type H sont situés au niveau de la métaphyse et sont organisés en colonnes parallèles avec des branchements en arc entre eux. Les type L quant à eux forment un réseau vasculaire branché sinusoïdal plus classique. Malgré l'abondance de capillaires, la diaphyse est hypoxique avec notamment un fort signal HIF-1 α au sein du noyau des cellules osseuses présentes là où l'os de la métaphyse jusqu'à l'épiphysaire apparaît normalement oxygéné (142). Cette hypoxie pourrait avoir plusieurs origines non mutuellement exclusives : un flux sanguin moins important dans la diaphyse à cause de l'organisation branchée du réseau vasculaire ; une importante consommation d'oxygène par les cellules souches hématopoïétiques locales ; l'existence de capillaires moins fenestrés à cause de la barrière sang/moelle osseuse proche de l'endoste (47).

I.4.7. L'angiogenèse au sein du tissu osseux

Au sein du tissu osseux l'angiogenèse obéit vraisemblablement aux mêmes règles que dans le reste de l'organisme avec un fort rôle du taux d'oxygène. Elle est aussi étroitement liée aux sécrétions des cellules composant le tissu osseux car les chondrocytes, les ostéoblastes et les progéniteurs osseux sécrètent notamment du VEGF (143). Une différence notable est à souligner dans la voie Notch décrite plus haut dans la partie I.2.4.2 et dont l'activation inhibe le phénotype de « tip cell » et est essentielle à l'angiogenèse par bourgeonnement. Dans les cellules endothéliales au sein des os longs, l'activation de la voie Notch est à l'inverse un activateur de l'angiogenèse en stimulant la prolifération et la croissance des vaisseaux sanguins. L'absence de cette voie entraîne des défauts dans le tissu osseux qui seraient notamment dus à l'absence de Noggin, un facteur soluble consécutif à l'activation de la voie Notch et dont la sécrétion par les cellules endothéliales est capable de stimuler la croissance osseuse, la minéralisation, la maturation des chondrocytes et d'augmenter le nombre d'ostéoprogéniteurs. La communication entre les cellules endothéliales et les cellules du tissu osseux est donc essentielle au bon fonctionnement du squelette des os longs (144). Cette interaction expliquerait que lors du vieillissement, la perte de masse osseuse est également associée à une diminution de la circulation sanguine osseuse. Pour le système vasculaire, une diminution du nombre d'artères et une quasi-disparition des capillaires de type H sans modification du nombre de cellules endothéliales est observée avec l'âge. Ce changement pourrait provenir d'une diminution globale de la signalisation de Notch entraînée par une diminution du débit sanguin suite à la perte d'efficacité du système circulatoire liée à l'âge (47).

Les cellules osseuses et les cellules endothéliales sont capables de se renforcer mutuellement. Des travaux montrent qu'en coculture avec des ostéoblastes, les cellules endothéliales survivent grâce à l'action des premiers, possiblement grâce à leur sécrétion de VEGF et d'OPN. Cette dernière, sécrétée par les ostéoblastes mais également par les ostéoclastes, est un facteur anti-apoptotique chez les cellules endothéliales (110). Ces interactions ne seraient pas à sens unique puisque les cellules endothéliales sont connues pour sécréter BMP-2, Endotheline-1 et IGF qui ont un effet positif sur la prolifération des ostéoblastes et la différenciation des ostéoprogéniteurs mais aussi des pré-ostéoclastes comme évoqué plus haut en partie I.4.5.1.1 pour BMP-2 et IGF (145).

I.4.8. La réponse du tissu osseux à la suite d'un traumatisme

I.4.8.1. Réponse immunitaire

Tout traumatisme physique entraîne une inflammation. L'inflammation est un état impliquant des cellules immunitaires locales ayant pour fonction de préparer l'environnement concerné à l'action du système immunitaire environnant et de combattre d'éventuels pathogènes ou d'effectuer des tâches de nettoyage des tissus lésés.

Les macrophages sont essentiels dans cette réponse car ils régulent la nature de la réponse à l'environnement local. Ils peuvent orienter les cellules d'un environnement lésé à poursuivre l'état inflammatoire ou à enclencher des mécanismes de réparation. Les macrophages peuvent être majoritairement pro-inflammation ou pro-réparation mais leur classification n'est pas binaire. Une classification simplifiée des types de macrophages considère qu'il existe au moins 9 phénotypes différents (146). Malgré tout, il est généralement admis que deux grands types de macrophages existent : des macrophages pro-inflammatoires dits « M1 » et des

macrophages anti-inflammatoires (pro-réparation tissulaire) dits « M2 ». Cette différence s'exprime par des voies de signalisations spécifiques et par la sécrétion de cytokines pro ou anti-inflammatoires (147). Les macrophages M1 produisent de l'interféron gamma (IFN- γ), de l'IL-12 en grande quantité et de l'IL-10 en faible quantité alors que les macrophages M2 produisent de l'IL-10 en grande quantité et IL-12 en faible quantité (148).

I.4.8.2. Réponse immunitaire et biomatériaux

Les biomatériaux pour la réparation osseuse sont implantés au niveau de la zone lésée par des moyens chirurgicaux, ce qui entraîne une réponse immunitaire en deux temps.

Une réponse primaire à l'acte chirurgical qui détruit le tissu environnant entraîne l'activation du système immunitaire ce qui conduit à la formation d'un hématome à la surface du biomatériau. Cet hématome est issu de l'activation et l'agrégation des plaquettes par le facteur tissulaire (aussi appelé thromboplastine), une protéine transmembranaire présente dans les tissus conjonctifs et maintenue éloignée du sang en conditions normales. Cet agrégat plaquettaire et les débris cellulaires activent l'immunité et des cellules spécialisées sont recrutées au niveau du site d'implantation à la suite de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules immunitaires locales. Les principaux médiateurs sécrétés sont des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6, IL-11, IL-18 et le TNF- α , ce qui entraîne le recrutement des lymphocytes, des granulocytes, des macrophages et des progéniteurs mésenchymateux.

Suite à cette réponse initiale se produisant en général en 24 h, les macrophages recrutés sur le matériau vont moduler l'immunité. Si le matériau est perçu comme pro-inflammatoire, des macrophages maintiennent une polarisation M1. Cette inflammation prolongée entraîne l'apparition de macrophages pro-réparation de type M2 destinés à contrôler la formation d'une capsule fibreuse autour du matériau. Cela induit un défaut d'implantation par l'absence de formation de tissu osseux et par la suite de remodelage osseux (130), (149). Ce phénomène est illustré dans la Figure 18.

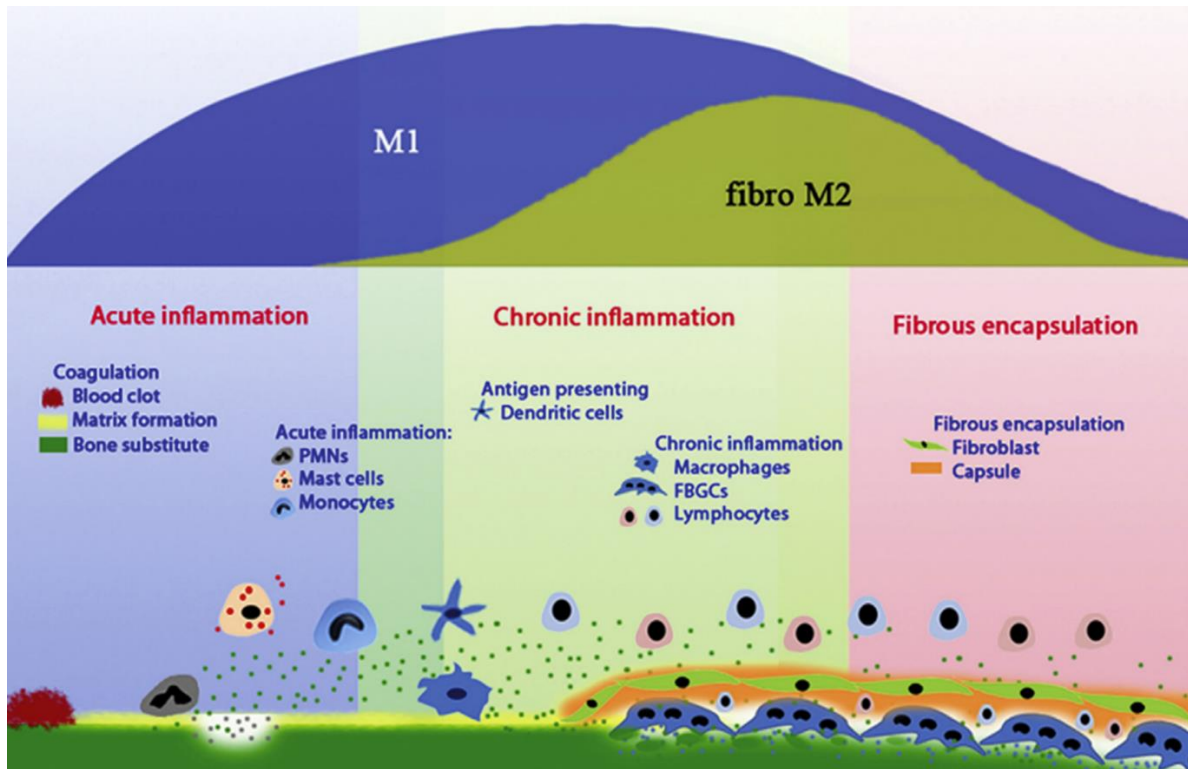


Figure 18 : Réponse immunitaire à un matériau pro-inflammatoire entraînant une inflammation chronique (encapsulation fibreuse)

Extraite depuis (149)

Lorsqu'un matériau entraîne une inflammation chronique (Figure 18), il y a d'abord une inflammation aiguë liée à l'acte chirurgical (Figure 18 gauche). Ensuite, lors de la résorption du caillot sanguin, des granulocytes (PMNs pour polymorphonuclear leukocyte) dégradent la surface du matériau en sécrétant des ROS et des enzymes protéolytiques. Ces dernières, en dégradant le caillot sanguin libèrent des fragments du matériau emprisonné. Des mastocytes (mast cell) et des monocytes attirent des macrophages et des cellules dendritiques. Si le matériau est pro-inflammatoire (Figure 18 centre), l'inflammation sera chronique. Les macrophages vont internaliser les fragments de matériau s'ils font moins de 5 μm , dans le cas où les fragments sont plus grands, les macrophages fusionnent et forment des cellules géantes multinucléées (FBGC : Foreign Body Giant Cell). En parallèle, des cellules dendritiques peuvent phagocyter des fragments du matériau et peuvent déclencher une réaction de rejet immunitaire si celui-ci présente des sites antigéniques. Dans le cas présent, les macrophages et les cellules dendritiques vont orienter des lymphocytes pour qu'ils supervisent l'encapsulation fibreuse du matériau (Figure 18 droite). De nombreuses cellules immunitaires signalent à des fibroblastes de recouvrir la surface du matériau d'une capsule fibreuse l'isolant de l'organisme (150).

Si le matériau n'entraîne pas une inflammation continue, les macrophages M1 laissent leur place à des macrophages pro-réparation M2 spécialisés dans le contrôle du modelage osseux. Ces macrophages M2 vont permettre la vascularisation de l'implant après environ 4 semaines. Des progéniteurs ostéoblastiques permettant la formation d'un nouvel os sont ensuite recrutés. Ce cas de figure est schématisé en Figure 19.

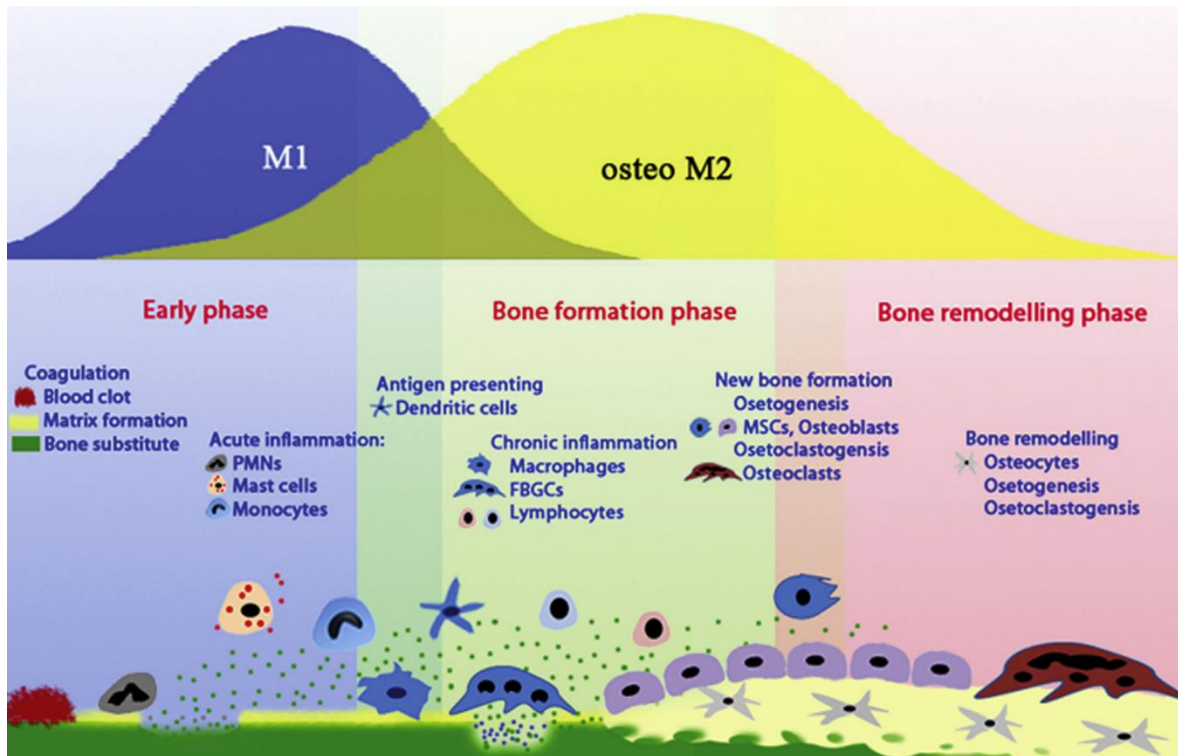


Figure 19 : Réponse immunitaire à un matériau n'entraînant pas de réponse inflammatoire chronique (ostéo-intégration)

Extraite depuis (149)

Lorsqu'un matériau n'entraîne pas d'inflammation chronique (Figure 19), il y a premièrement une inflammation aiguë liée à l'acte chirurgical (Figure 19 gauche). Ensuite, lors de la résorption du caillot sanguin, des granulocytes (PMNs) dégradent la surface du matériau en sécrétant des ROS et des enzymes protéolytiques. Des fragments du matériau emprisonnés dans le caillot sont ainsi libérés. Des mastocytes (mast cell) et des monocytes attirent des macrophages et des cellules dendritiques qui dans le cas d'un matériau non inflammatoire (Figure 19 milieu) vont créer un environnement favorable à la production d'os primaire en recrutant des progéniteurs osseux. L'os primaire formé précédemment est remplacé par un os mature suite à la signalisation des ostéocytes enfermés dans l'os primaire (Figure 19 droite) (150).

L'os primaire formé possède des fibres de collagène désorganisées et peu minéralisées ce qui en fait un os mécaniquement fragile (101). Cet os primaire est remplacé par de l'os lamellaire en 6 à 12 mois suite au remodelage osseux décrit en partie I.4.5.1.1 (130), (149).

I.4.8.3. L'angiogenèse dans l'os suite à un traumatisme :

En conséquence de la formation d'un hématome au niveau du site impacté, l'environnement du tissu lésé devient hypoxique. Cette hypoxie entraîne une forte réponse pro-angiogénique par la sécrétion de VEGF, cette réponse est essentielle pour assurer une réparation osseuse complète (151). La sécrétion de VEGF proviendrait majoritairement des ostéoblastes suite à l'activation de HIF-1 α en raison de l'hypoxie (mécanisme évoqué dans la partie I.2.4.6) (152). Le VEGF a des fonctions diverses et importantes qui dépendent de la phase dans laquelle se trouve la zone lésée. Au moment de la blessure le VEGF est concentré

dans le caillot sanguin d'où il attire les cellules immunitaires dont des macrophages qui vont orchestrer le processus de réparation (comme décrit dans la sous-partie précédente). La zone lésée est progressivement comblée par du cartilage et le VEGF en régule la quantité en inhibant la différenciation des progéniteurs osseux en chondrocytes. Les chondrocytes hypertrophiques se développant dans le cartilage sécrètent de grande quantité de VEGF. Le VEGF sécrété permet la pénétration du cartilage par des vaisseaux sanguins qui permettent le recrutement de cellules dégradant le cartilage et des pré-ostéoblastes qui vont synthétiser le nouvel os. La différenciation de ces pré-ostéoblastes est stimulée par le VEGF qu'ils sécrètent en grande quantité. Cette sécrétion de VEGF attire des vaisseaux sanguins qui apportent nutriments et minéraux. Ces nouvelles cellules endothéliales sécrètent BMP-2 qui stimule la différenciation des pré-ostéoblastes et leur capacité de minéralisation au niveau du site reperfusé. Cette relation paracrine se poursuit jusqu'à la fin du remodelage osseux (153).

Par ailleurs, l'angiogenèse est régulée par la sécrétion de la cytokine TNF- α qui possède un effet de préparation à l'angiogenèse. Quand TNF- α est présente sur une durée de 2 à 3 jours, elle bloque la migration des cellules endothéliales en stimulant l'expression de la protéine Jagged-1. Jagged-1 est un ligand de Notch et les cellules l'exprimant peuvent inhiber la migration des autres cellules environnantes comme évoqué en partie 1.2.4.2. De plus, la signalisation par le VEGF est inhibée car TNF- α entraîne la surexpression de VEGFR2 tout en bloquant sa signalisation, piégeant le VEGF sans entraîner d'effet. Par conséquent, le TNF- α retarde l'angiogenèse et quand il n'est plus exprimé suite à la diminution de l'inflammation, l'angiogenèse peut démarrer(154).

De plus, pour permettre la progression des cellules endothéliales au cœur de la zone lésée les MMPs sont essentielles. Leur absence, par exemple celle de MMP-9 (155), entraîne des anomalies de la réparation osseuse à cause d'une vascularisation insuffisante. Leur activité doit être régulée pour permettre le dépôt des éléments de la matrice extra-cellulaire nécessaire au nouveau tissu. Ce contrôle est réalisé par les inhibiteurs de MMP TIMP-1 et TIMP-2 qui sont exprimés après la reperfusion des tissus (51), (47).

Par ailleurs, plusieurs autres facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance du placenta PIGF (Placental Growth Factor), FGF 2, FGF9 et Dj-1 joueraient un rôle pro-réparation dans l'os sans que leur fonction précise et leur origine ne soient élucidées (156).

La réponse angiogénique à un traumatisme osseux est donc plus complexe que sa forme physiologique puisque son couplage avec l'immunité est essentiel et que le tissu osseux dégradé transmet lui-même des signaux aux cellules endothéliales.

I.5. Stratégies de développement pour des céramiques adaptées aux problématiques de la réparation du tissu osseux

I.5.1. Généralités sur les céramiques adaptées aux problématiques de la réparation du tissu osseux

Suite à ces informations, et comme évoqué dans le préambule, il apparaît clair que promouvoir la réparation d'un tissu osseux à l'aide d'une céramique exige d'elle :

- d'être biocompatible vis-à-vis des cellules osseuses, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires et ne pas inhiber leurs fonctions cellulaires principales.
- De favoriser l'apparition d'un phénotype anti-inflammatoire.

- De ne pas inhiber la minéralisation à sa surface.
- De ne pas inhiber les interactions cellulaires contribuant à la stabilité du système (sécrétion de facteurs paracrines stabilisateurs...).

De plus, la réparation d'un tissu osseux ayant d'importantes lacunes demande une stimulation de l'angiogenèse afin d'amener une vascularisation au sein de l'implant céramique. Or, pour rappel l'hydroxyapatite seule ne possède pas d'effet stimulateur sur les cellules endothéliales et sa capacité à réparer par elle-même de grandes lacunes osseuses est par conséquent limitée. Différentes stratégies cherchent à conférer aux implants cet aspect stimulateur avec des implants qualifiés de « bio-instructeurs », car possédant des éléments transmettant une information au tissu environnant, (157). Les grands axes de cette stratégie sont la fonctionnalisation (la modification chimique de la surface du matériau), la micro- ou nano-structuration (la modification de la topographie ou la réalisation de motifs physiques spécifiques à la surface du matériau), l'imprégnation (l'ajout en surface ou dans la structure physique du matériau de molécules ensuite libérées dans son environnement) et le dopage (l'ajout d'espèces chimiques au sein de la structure chimique du matériau).

Au sein de ces travaux de thèse, c'est l'option du dopage chimique qui a été étudiée où des hydroxyapatites dopées au cuivre (158) ou au silicium (159) ont vu leurs propriétés angiogéniques (leur capacité à promouvoir l'angiogenèse) et angioconductrices (la capacité à permettre aux vaisseaux sanguins de se développer et se maintenir à la surface du matériau) évaluées.

Ces dopages prennent la forme de substitutions au sein de la structure chimique de l'hydroxyapatite. Ceci explique le développement d'une bibliographie spécifique aux produits dopants.

I.5.2. Effets biologiques des paramètres physico-chimiques de céramiques phosphocalciques sur les types cellulaires au sein de l'os

I.5.2.1. Paramètres physiques

Les paramètres physiques par lesquels un matériau céramique est susceptible de modifier le comportement de cellules à sa surface sont ceux interagissant avec ses protéines d'adhérence et/ou modulant ses voies de mécanotransduction. Les paramètres physiques susceptibles d'agir sur ces aspects sont la rigidité, la surface spécifique et la topographie.

I.5.2.1.1. Rigidité

La rigidité d'une céramique est très élevée, de l'ordre de 100 GPa ce qui est bien au-delà du niveau de rigidité des tissus osseux qui oscillent autour de quelques centaines de MPa à quelques GPa pour l'os spongieux et à quelques dizaines de GPa pour l'os compact (160), (161). Le tissu osseux est par ailleurs très rigide par rapport aux tissus biologiques mous où la rigidité varie de quelques Pa à quelques kPa. Les cellules cultivées directement à la surface d'une céramique vont donc toutes subir un biais qui peut être une contractilité exacerbée et/ou un métabolisme plus énergivore. Cet effet est vraisemblablement le même entre toutes les céramiques phosphocalciques car la réponse de cellules à la rigidité de leur substrat est généralement maximisée avant même d'atteindre des valeurs de l'ordre du MPa (162).

I.5.2.1.2. Surface spécifique

La surface spécifique peut moduler l'effet biologique d'un matériau en modifiant la quantité de protéines adsorbées à sa surface. Cette quantité augmente généralement avec l'hydrophobicité et la surface spécifique avec un taux maximal d'adsorption de protéines d'une taille supérieure au kDa estimé entre 2 et 10 mg/m² pour les surfaces hydrophobes (163). Cependant, une quantité accrue de protéines adsorbées n'est pas systématiquement associée à un effet biologique accru. Les effets biologiques sont dépendants de la nature des protéines adsorbées et de la conformation qu'elles adoptent à la surface (164). Des protéines impliquées dans l'adhérence des cellules vont moduler leur mobilité et leur capacité de prolifération (165). Des protéines de type facteurs de croissances vont moduler le phénotype des cellules à proximité selon les voies de signalisation qu'ils régissent (166). En guise d'exemple, les effets de protéines adsorbées à la surface d'un matériau et impliquées dans des voies de signalisation pouvant affecter des cellules endothéliales d'après (166) sont présentées dans la Figure 20.

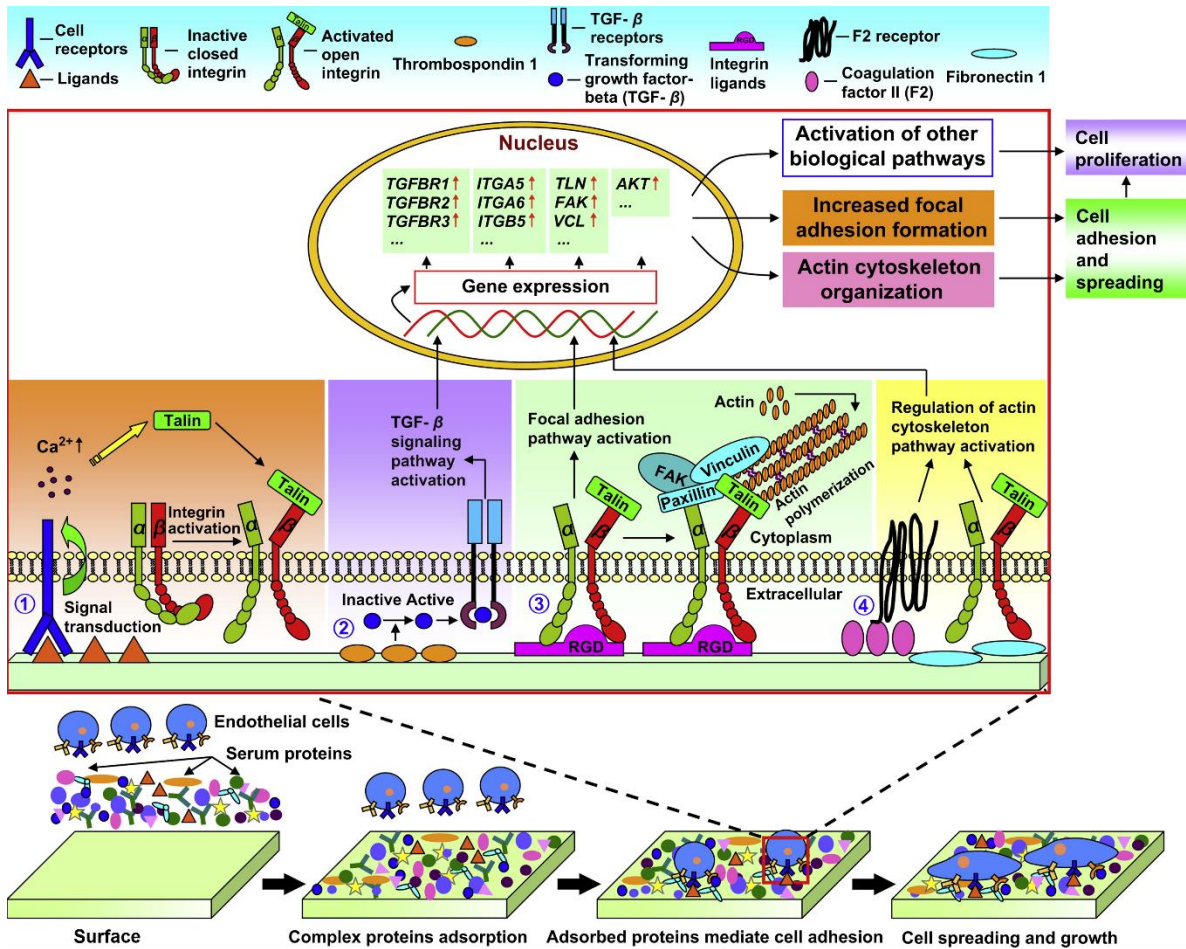


Figure 20 : Rôles de protéines adsorbées sur les cellules endothéliales

Figure adaptée de (166). Les 4 voies de signalisation proposées sont les suivantes : Case 1 (marron) : des protéines adsorbées (schématisés par le symbole « ligands ») telle que l'adiponectine sont responsables d'une augmentation du niveau de calcium intracellulaire après leur liaison avec les récepteurs cellulaires les reconnaissant à la manière du récepteur à l'adiponectine 1 ou 2. L'augmentation du niveau de calcium intracellulaire permet l'activation des intégrines en surface des cellules. Case 2 (violet) : La thrombospondine 1 adsorbée peut activer le TGF- β et activer sa voie de signalisation entraînant la surexpression de ses récepteurs. Case 3 (vert) : des protéines adsorbées comme la vitronectine sont reconnues par les intégrines actives qui s'y lient et déclenchent leur cascade de signalisation. Case 4 (jaune) : le facteur de coagulation 2 et la fibronectine 1 adsorbées en surface sont reconnues par le récepteur du facteur de coagulation F2 ou les intégrines et entraînent le remodelage du cytosquelette d'actine. Les effets de ces différentes voies de signalisation sont multiples. Le TGF- β stimule l'expression des intégrines (surexpression des gènes des intégrines ITGA5, ITGA6, ITGB5...) et promeut l'angiogenèse. Les intégrines activant la voie de signalisation des adhésions focales vont promouvoir l'adhérence (surexpression des gènes des protéines des adhésions focales comme la Taline TLN, la kinase des adhésions focales FAK, la vinculine VCL) et la prolifération des cellules en développant les fibres de stress et en activant des facteurs de survie et de prolifération comme Akt.

L'effet, simplifié, de nombreuses protéines adsorbées sur des cellules est principalement de faciliter leur adhérence et leur prolifération comme illustré en Figure 20. Ces fonctions sont essentielles à la croissance d'une population cellulaire à la surface d'un matériau. La surface spécifique est donc un paramètre important dans la biocompatibilité d'un biomatériau (164).

I.5.2.1.3. Taille des grains

La taille des grains d'une céramique phosphocalcique peut influencer le comportement de cellules en modifiant l'agencement de protéines adsorbées et/ou en contraignant leur conformation. Ces contraintes peuvent ensuite moduler des voies de signalisation membranaire et/ou utilisant la mécanotransduction en modifiant les sites d'ancrages des cellules.

Quand les grains d'un matériau sont de dimension comparable ou inférieure à des protéines l'adsorption de celles-ci à sa surface peut être significativement diminuée (164). Les protéines sur lesquelles les cellules vont adhérer ont des dimensions ne dépassant pas quelques dizaines de nanomètres. L'albumine sérique bovine (BSA : Bovine Serum Albumin) qui est la protéine la plus abondante du sérum de veau fœtal constituant environ 60% m/m des protéines totales (167) est globulaire et fait environ 7 nm (168). La vitronectine, une protéine également contenue dans le sérum, est un acteur majeur de l'adhérence des cellules aux surfaces sur lesquelles elle est adsorbée (169). Elle mesure en tant que monomère libre 6 à 8 nm et forme des multimères d'environ 25 nm (170). Les matériaux avec des grains d'environ un ordre de grandeur supérieur, soit 100 nm ou plus, ne devraient pas engendrer de modification majeure de la signalisation cellulaire par ce biais.

I.5.2.1.4. Topographie

La rugosité d'un matériau peut engendrer des effets biologiques. Si elle est de taille comparable aux cellules, elle peut contraindre la disposition de leur cytosquelette et activer des voies de signalisation propres à la mécanotransduction. Les principales voies de signalisation de ce processus appliqué ici aux cellules endothéliales sont illustrées dans la Figure 21.

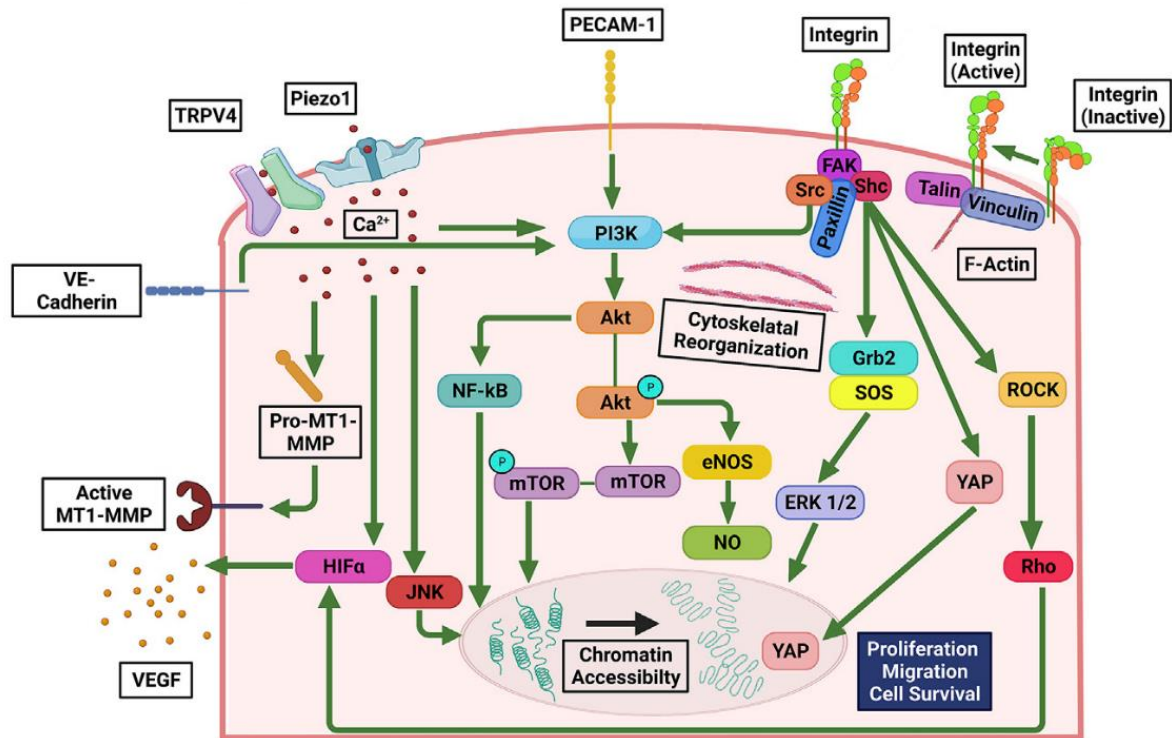


Figure 21 : Illustration de voies de mécanotransduction impliquées dans la signalisation de l'angiogenèse

Figure adaptée de (171). Les canaux calciques TRPV4 (transient receptor potential vanilloid-type 4) et Piezo1 (piezo type mechanosensitive ion channel component 1) sont activés quand la membrane plasmique est déformée par une contrainte mécanique. Leur activation entraîne un influx de calcium qui active MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase), PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) et JNK (c-jun N-terminal kinase) stimulant la prolifération et la migration de la cellule. L'activation de TRPV4 et Piezo1 entraîne la surexpression de HIF-1 α et par conséquent la sécrétion de VEGF. En réponse à un stress mécanique la VE-Cadhérine, PECAM-1 et les intégrines entraînent la surexpression de PI3K qui active Akt. Akt active NF-kB (nuclear factor-kappa B) et mTOR (mammalian target of rapamycin), stimulant la prolifération et la survie de la cellule, active eNOS entraînant une surproduction de NO stimulant la migration et la survie cellulaire. Les intégrines et les complexes formés au niveau des adhérences focales activent également la voie de ERK 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase 1/2) et YAP qui stimulent la prolifération et la voie ROCK/RhoA, entraînant la surexpression de HIF-1 α et la sécrétion de VEGF.

En raison de l'existence de ces voies de mécanotransduction (Figure 21), des paramètres physiques d'un matériau peuvent moduler la survie, la prolifération et la migration de cellules endothéliales. Par exemple ils peuvent entraîner une modification du nombre d'adhérences focales des cellules passant par les intégrines ou modifier la taille des zones de contacts entre les cellules réalisées par PECAM-1 et/ou VE-Cadhérine. Une étude montre comment la signalisation des intégrines de cellules endothéliales est modulée par la rugosité : quand celle-ci est de dimension comparable à celle des cellules, elle permet à un maximum de liaisons d'être créées (172). Ce phénomène est illustré dans la Figure 22 :

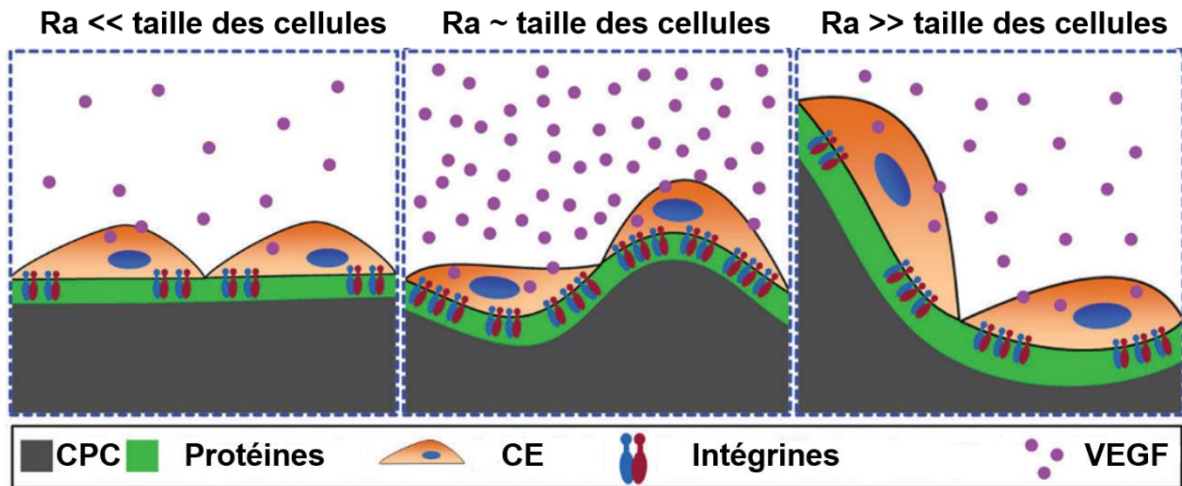


Figure 22 : Impact de la rugosité sur la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales

Figure adaptée de (172). CPC : surface simplifiée d'une céramique phosphocalcique. Protéines : couche de protéines adsorbées permettant la fixation des intégrines. CE : cellule endothéliale.

La modification de la signalisation des intégrines par la rugosité (Figure 22) permettrait dans le cas d'une rugosité moyenne de stimuler la sécrétion de VEGF. Dans cette étude (172) des CSM dérivées de tissu adipeux sont cultivées sur une surface de polystyrène ayant une rugosité moyenne de $4,17 \pm 0,17 \mu\text{m}$. Sur cette surface, les cellules produisent plus de VEGF que celles cultivées sur une surface plane à la rugosité moyenne de $0,13 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ou ayant une forte rugosité moyenne de $25,4 \pm 3,8 \mu\text{m}$. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'une rugosité proche de la taille des cellules maximise le nombre d'intégrines pouvant interagir avec les protéines adsorbées. Ils suggèrent que la suractivation des intégrines entraîne une signalisation accrue par le biais de la protéine FAK qui active les voies Rho/ROCK et ERK 1/2 ce qui augmente la sécrétion de VEGF (172). Ces interprétations sont cohérentes avec les voies de signalisation décrites dans la Figure 21 précédente.

I.5.2.2. Paramètres chimiques

De nombreuses espèces chimiques, sous forme ionique, sont essentielles à la formation de tissus osseux et à sa vascularisation en agissant comme cofacteurs pour des enzymes, en participant au processus de minéralisation ou en servant de messenger secondaire¹⁸ des cellules. De ce fait, de nombreuses stratégies d'amélioration des propriétés biologiques de matériaux céramiques considèrent leur dopage avec des éléments chimiques d'intérêt. Cette partie bibliographique s'intéresse aux effets biologiques et plus particulièrement aux effets sur les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les ostéoclastes du calcium et du phosphore, éléments de base constitutifs des céramiques d'hydroxyapatite ainsi que du cuivre et du silicium, éléments de dopage.

¹⁸ Désigne une molécule produite dans la cellule suite à la réception d'un signal extracellulaire (e.g. suite à la fixation d'un ligand à son récepteur) qui va activer ou inhiber d'autres acteurs cellulaires participant ainsi à la propagation du signal initial.

I.5.2.2.1. L'impact du calcium

Dans les milieux biologiques, on retrouve le calcium sous la forme ionique Ca^{2+} , il y a environ 100 mg/L (2,5 mM) de calcium dans le sang, environ 40% de ce calcium est lié à des protéines (notamment l'albumine), 50% se retrouve sous forme ionique et 10% est complexé à des composés anioniques (HCO_3^- , HPO_4^{2-} , acide lactique...). Cette concentration est finement régulée par l'action d'hormones : la PTH, la Vitamine D et la Calcitonine évoquées en partie I.4.5.1.1. Ces hormones contrôlent la réabsorption et l'excrétion rénales ainsi que l'absorption intestinale du Ca^{2+} en plus de la formation et la résorption osseuse pour maintenir une concentration constante ou, à défaut, de la rétablir vers sa valeur physiologique (173).

Toutes les cellules de l'organisme expriment à leur membrane la protéine CaSR (calcium sensing receptor), un récepteur couplé aux protéines G. CaSR est activé par le Ca^{2+} extracellulaire, et d'autres ligands comme le Mg^{2+} , il active de nombreuses voies de signalisation avec des effets variables selon type cellulaire. Dans la thyroïde, il contrôle la sécrétion de l'hormone PTH selon la concentration plasmatique de Ca^{2+} sous forme ionique : quand elle est inférieure à 50 mg/L (1 mM) la sécrétion est maximale tandis qu'elle est minimale quand la concentration est supérieure à 62,5 mg/L (1,25 mM) (174), (175).

Au sein des cellules, la concentration de Ca^{2+} varie très fortement selon les compartiments cellulaires. Dans le cytoplasme on retrouve environ 4 $\mu\text{g/L}$ (0,1 μM) de Ca^{2+} . La majorité du calcium intracellulaire est retenue dans le réticulum endoplasmique où la concentration est estimée entre 40-120 mg/L (1-3 mM). Dans le réticulum endoplasmique, le calcium est majoritairement lié à des chaperons protéiques, notamment la calréticuline. Dans cet organe la concentration de calcium libre est estimée à 2,4-16 mg/L (60-400 μM) en situation de stockage et à 0,04-2 mg/L (1-50 μM) en relargage. (176). Cette compartimentation et ces différences de concentrations de plusieurs ordres de grandeur permettent d'utiliser ces forts gradients électrochimiques à des fins de signalisation. Les flux de calcium intracellulaires sont essentiels à une très grande diversité de fonctions biologiques (177). Ces flux de calcium permettent d'atteindre jusqu'à une concentration cytoplasmique locale de 1,2 mg/L (30 μM), soit 300 fois le niveau basal, ce qui le rend disponible aux protéines nécessitant du calcium (178).

Le Ca^{2+} est également un messenger secondaire impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire (179). Dans le cytosol, il peut se lier avec la Calmoduline, une protéine de 17 kDa qui peut lier 4 Ca^{2+} ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine. La Calmoduline activée peut ensuite activer de très nombreuses protéines et enzymes de voies de signalisation différentes. Parmi ces protéines, on peut citer la PhK (Phosphorylase Kinase), qui est essentielle au catabolisme du glycogène, et la famille des CaM-kinases (Ca²⁺/Calmodulin-activated Protein Kinases) qui régulent de très nombreux processus biologique comme la plasticité cérébrale ou la fréquence cardiaque (180).

Le Ca^{2+} sert dans presque toutes les fonctions cellulaires principales. Il est essentiel au cycle cellulaire et à l'apoptose (181). Les flux intracellulaires permettent également d'orienter la machinerie cellulaire lors du développement et de coordonner les cellules entre elles (178). Il est également essentiel à l'activité de très nombreux enzymes dégradant les composés cellulaires (protéases, phospholipases et nucléases). Enfin, l'utilisation du phosphate comme intermédiaire énergétique dans toutes les cellules de mammifères demande de le maintenir séparé du calcium sous peine de les voir précipiter ensemble (179). Par conséquent, les flux de calcium doivent être contrôlés dans le temps et dans l'espace.

I.5.2.2.1.1. Effets sur les cellules endothéliales

Le calcium est un élément essentiel à la fonction normale des cellules endothéliales et ses flux sont nécessaires à l'angiogenèse (182). Les impacts des variations de concentrations extra-cellulaires sont cependant peu étudiés.

Une étude *in vitro* (183) a été réalisée sur des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en faisant varier la concentration extra-cellulaire de calcium à l'état Ca^{2+} . Cette concentration a un effet stimulateur dose-dépendant (gamme testée 40-120 mg/L soit 1-3 mM) sur l'expression de la protéine membranaire V-CAM-1. Elle entraîne un effet accru en réponse au facteur TNF- α et cela permet d'augmenter la capacité d'adhésion de monocytes aux HUVECs. Une concentration de calcium extracellulaire plus importante entraîne également une concentration intracellulaire plus importante sans utiliser le calcium stocké dans les organites de la cellule. La concentration intracellulaire est suivie à l'aide d'une sonde calcique fluorescente et des observations avec un microscope confocal. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire se fait vraisemblablement par diffusion passive ou facilitée¹⁹. Cette augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, qui est caractéristique d'un état inflammatoire, ne modifie pourtant pas les niveaux de NO (monoxyde d'azote) et de ROS. L'explication probable serait que ces deux systèmes sont essentiellement régulés par des variations rapides de concentration capables de déplacer les équilibres chimiques et non par des niveaux prédéfinis, tant que ceux-ci ne sont pas cytotoxiques (183). Une autre étude *in vitro* (184) sur des cellules endothéliales murines SVEC4-10 montre que la diminution de la concentration en calcium à environ 52 mg/L (1,3 mM) d'un milieu en contenant originellement 62 mg/L (1,55 mM) entraîne une diminution de la taille du réseau vasculaire dans une matrice de collagène de près de 50% par rapport à un milieu de contrôle, suggérant l'existence de concentrations de calcium extracellulaires plus favorables à l'angiogenèse (184).

I.5.2.2.1.2. Effets sur les ostéoblastes

Le calcium extracellulaire est un élément nécessaire à la signalisation pro-ostéogénique : une étude *in vitro* (185) montre qu'une concentration de calcium dans une gamme 120-400 mg/L (3-10 mM) entraîne de manière dose-dépendante une stimulation de la prolifération de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 et une diminution de l'activité de l'ALP. Quand ces concentrations de calcium sont appliquées sur une culture de monocytes humains, le milieu de culture de ces derniers, dit alors conditionné²⁰, devient stimulateur de la prolifération mais également de l'activité de l'ALP des MC3T3-E1. Ce milieu conditionné et le calcium seul ont tous les deux des effets chimiotactiques attractant sur ces ostéoblastes (185). Une autre étude *in vitro* (186) sur des ostéoblastes primaires murins issus de la calvaria montre que le calcium à une concentration de 400 mg/L (10 mM) a un effet chimiotactique attractant comparable à celui d'un milieu conditionné pendant 48 h par des CSM. Similairement, une concentration de calcium de 100 mg/L (2,5 mM) entraîne la régénération osseuse *ex vivo* de la calvaria de souris avec un effet supérieur à du milieu conditionné pendant 48 h par des CSM. L'expression des marqueurs ostéogéniques Col1a, Runx2, Ostéix, ALP et OCN est par ailleurs diminuée après exposition à une concentration de calcium de 200 mg/L (5 mM) (186). Ces deux études illustrent le rôle direct de recrutement du calcium sur les ostéoblastes en

¹⁹ La diffusion facilitée décrit un mode de transport utilisant des structures biologiques spécialisés pour faire passer des composés au travers de la membrane plasmique sans dépense d'énergie

²⁰ Quand un milieu de culture est modifié par un acteur (cellules, matériaux...) on parle de milieu conditionné

inhibant leur différenciation pour favoriser leur prolifération et leur migration à priori vers les sites fraîchement résorbés. Une grande partie de cette signalisation passerait par l'activation de CaSR (187). Ces études montrent également l'existence d'un contrôle indirect pro-recrutement mais également pro-différenciation du calcium passant par les cellules environnantes des ostéoblastes.

Ce dernier aspect est illustré par une étude *in vitro* (188) sur des CSM humaines qui une fois exposées à 312 mg/L (7,8 mM) de calcium, triplent leur expression du facteur de croissance pro-différenciation ostéoblastique BMP-2 (188). Une étude *in vitro* (189) montre, quant à elle, un effet pro-différenciation du calcium relargué par de l'hydroxyapatite nanométrique sur des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 cultivés sur des inserts et donc non au contact avec le matériau. La concentration de calcium efficace est dans cette étude de 136 mg/L (3,4 mM) et elle entraîne une stimulation de l'activité de l'ALP, une surexpression de l'OPN et de BSP. Ces effets pro-différenciation apparaissent partiellement dépendants du calcium comme le montrent des tests utilisant des inhibiteurs des canaux calciques de type L, des canaux essentiels à une importante voie calcique (189).

Le calcium est donc pro-ostéogénique avec un rôle dans la coordination résorption-formation lors du remodelage osseux. Cet effet est vraisemblablement dépendant de sa concentration avec un effet favorable à la régénération osseuse dès 100 mg/L (2,5 mM), de son environnement cellulaire et potentiellement de la nature physique de la surface sur laquelle se trouvent les cellules exposées à cette concentration.

I.5.2.1.3. Effets sur les ostéoclastes

Le calcium extracellulaire jouerait plutôt un rôle anti-résorption osseuse et donc d'inhibition des ostéoclastes.

Une étude *in vitro* (190) conduite sur des cellules de type ostéoclaste, dérivées de monocytes humains U-937, évalue leur réponse à la surface de disques de phosphate tricalcique (TCP) ou d'hydroxyapatite pure et frittés à 1300°C pendant 1 h sous air. Les ostéoclastes cultivés 21 jours sur les deux matériaux y sont retrouvés en quantité similaire et avec une activité mitochondriale comparable. L'hydroxyapatite favorise la formation de grandes cellules qui forment un plus grand anneau d'actine que sur le TCP. Des lacunes de résorption sont présentes sur les deux matériaux et sont de plus grande taille sur l'hydroxyapatite que sur le TCP. Les auteurs de l'étude suggèrent que la concentration de Ca²⁺ est plus élevée en présence de TCP en raison de sa solubilité plus importante par rapport à l'hydroxyapatite qu'ils ont mesurée à respectivement 8,3 moles/mm² contre 3,5 moles/mm². Cette concentration de Ca²⁺ plus importante inhiberait la résorption des ostéoclastes et expliquerait les plus grandes lacunes de résorption sur l'hydroxyapatite (190).

Les auteurs d'une étude *in vitro* (191) recherchent l'effet d'une concentration de calcium accrue sur des pré-ostéoclastes et des ostéoclastes de poulet différenciés cultivés originellement dans un milieu contenant 80 mg/L (2 mM) de calcium. Cette étude montre que les ostéoclastes augmentent leur niveau de calcium intracellulaire de manière dose-dépendante avec la concentration de calcium extracellulaire dès l'ajout de 10 mg/L (0,25 mM) et jusqu'à un maximum testé de 320 mg/L (8 mM) de calcium supplémentaire dans le milieu. Cette augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, a pour conséquence une réduction des podosomes nécessaires à la formation de l'anneau d'actine permettant de sceller la lacune de résorption des ostéoclastes. Des ostéoclastes matures exposés à 160 mg/L (4 mM) de calcium extracellulaire ont une capacité de résorption diminuée de moitié par rapport à des

ostéoclastes exposés à 80 mg/L (2 mM) de calcium. Cet effet inhibiteur du calcium est transitoire et leur capacité de résorption est restaurée avec le retour à une concentration de calcium extracellulaire de 80 mg/L (2 mM) (191).

Une étude *in vitro* (185) (citée précédemment en sous-partie I.5.2.2.1.2) utilisant le milieu conditionné de monocytes humains, suggère qu'il possède un effet inhibiteur dose-dépendant de l'activité ostéoclastique quand les monocytes sont exposés à une gamme de concentration de calcium de 120-400 mg/L (3-10 mM). Après exposition à ce milieu, des cellules hématopoïétiques issues de la rate de souris forment significativement moins de cellules multinucléées positives à TRAP lors d'une induction de cette différenciation en ostéoclastes par la vitamine D. La diminution survient dès la plus faible concentration de calcium avec environ 25% de cellules différenciées en moins pour 120 mg/L (3 mM) et 50% pour 400 mg/L (10 mM) (185).

Cette inhibition des ostéoclastes survient pour des concentrations de calcium supérieures au niveau physiologique, le sérum contenant environ 100 mg/L (2,5 mM) de calcium dont plus de la moitié est sous forme ionique comme évoqué en partie I.5.2.2.1. Cet effet pourrait être un mécanisme de protection du tissu osseux en cas de maintien anormal des ostéoclastes sur une zone de résorption (192).

I.5.2.2.2. L'impact du phosphore

Le phosphore est un élément essentiel à de très nombreux procédés biologiques mais il est particulièrement important dans les échanges énergétiques. Par conséquent, il est vital au bon fonctionnement des muscles squelettiques et cardiaques. Dans les milieux biologiques, on retrouve le phosphore principalement sous forme de phosphate inorganique (Pi), phospholipides et ester de phosphites. La concentration sanguine varie entre 89 mg/L et 149 mg/L (2,87 mM à 4,81 mM), la part de Pi étant de 25,6-41,6 mg/L (0,83-1,34 mM), celle des phospholipides de 69-97 mg/L (2,23-3,13mM) et celle des esters de phosphites de 25-45 mg/L (0,81-1,45 mM). Près de 85% de tout le phosphore est présent dans le tissu osseux, la part circulante représente moins de 1% et le reste se retrouve dans les autres tissus. Le phosphore se retrouve essentiellement dans les cellules où la concentration est près de 100 fois supérieure à celle du milieu extracellulaire. L'homéostasie du phosphore étant particulièrement importante, elle est sous le contrôle de plusieurs hormones : la Vitamine D qui favorise son absorption par les intestins, la PTH et le facteur de croissance FGF-23 qui favorisent son élimination par les reins. La sécrétion de FGF-23 provient principalement des ostéocytes tandis que les ostéoblastes font partie des cellules sécrétant de la vitamine D, le tissu osseux agit donc sur la phosphatémie de manière endocrine (132), (133). De plus, les cellules sont capables de détecter les concentrations extracellulaires de Pi par des mécanismes encore mal compris et des variations de concentrations peuvent activer des voies de signalisation sans internalisation du Pi (193).

I.5.2.2.2.1. Effet sur les cellules endothéliales

Le Pi est un élément altérant profondément les cellules endothéliales au-delà des doses physiologiques. Il entraîne l'apoptose des cellules endothéliales à partir d'une concentration extracellulaire de 77 mg/L (2,5 mM) en provoquant la surproduction de ROS intracellulaires (194). Des concentrations supérieures à 77 mg/L (2,5 mM) entraînent des défauts d'angiogenèse constatés dans un modèle de la membrane chorio-allantoïde (CAM) d'embryon de poulet avec un réseau vasculaire moins étendu et plus rigide. Des cellules

endothéliales E.Ahy926 exposées à 77 mg/L (2,5 mM) n'arrivent pas à former de tubules dans un modèle de tubulogenèse sur Matrigel™. Cette concentration de Pi entraîne la diminution de l'expression de la protéine annexine II *in vitro* et également *in vivo* chez des patients atteints d'hyperphosphatémie. L'annexine II est essentielle au bon fonctionnement des membranes plasmiques et par conséquent à la mobilité cellulaire et donc à l'angiogenèse (195). Les différents effets négatifs proviendraient également d'une inhibition de la voie de signalisation d'eNOS quand les concentrations de Pi sont trop écartées des valeurs physiologiques (trop faibles ou trop grandes) ce qui perturberait l'angiogenèse par manque de NO pour permettre le bourgeonnement vasculaire (196), (197).

I.5.2.2.2. Effet sur les ostéoblastes

La concentration de Pi extracellulaire pourrait augmenter l'expression d'OPN chez les ostéoblastes pour des valeurs entre 4 mM et 10 mM (106). Cette concentration favoriserait également l'expression de la protéine Dmp1 (Dentin matrix acidic phosphoprotein 1), un marqueur ostéocytaire ce qui suggérerait un rôle du Pi dans la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes (198).

I.5.2.2.3. Effet sur les ostéoclastes

Le Pi semble être principalement un inhibiteur ostéoclastique : une étude *in vitro* montre qu'une gamme de concentration de Pi de 77-124 mg/L (2,5-4 mM) inhibe la différenciation des ostéoclastes en stimulant la production d'OPG et est capable d'induire directement l'apoptose d'ostéoclastes différenciées de lapin (199). Une autre étude *in vitro* (200) sur des ciments de phosphate de calcium montre que la différenciation et l'activité de résorption de pré-ostéoclastes murins issus de monocytes de la moelle osseuse augmentent avec le ratio Ca/P et que celles-ci sont maximales pour un ratio de 1,667 (correspondant à l'hydroxyapatite) et diminuent de manière dose-dépendante avec des quantités croissantes de phosphates. Les auteurs de l'étude suggèrent un effet inhibiteur du phosphate sur la liaison RANKL/RANK par écrantage ionique, et que la diminution de la concentration de phosphate pour les ratios Ca/P les plus élevés favoriserait l'activité de résorption. Des tests d'implantation de ces ciments *in vivo* montrent cependant que plus le ratio Ca/P est élevé, meilleure est l'ostéogénèse, ce qui suggère que l'inhibition par le phosphate servirait de garde-fou en cas de dérégulation de la résorption (200).

I.5.2.2.3. L'impact du cuivre

I.5.2.2.3.1. Rôle biologique du cuivre

Le cuivre est un élément chimique indispensable au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques. Il joue le rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes grâce à la relative aisance d'alterner entre ses deux états redox Cu^+ et Cu^{2+} . Il est retrouvé notamment dans le cytoplasme, au sein de l'enzyme superoxyde dismutase 1 (SOD1) chargée de l'élimination des espèces radicalaires dommageables pour la cellule. Il est localisé aussi dans les mitochondries au sein de la chaîne respiratoire où notamment le cytochrome C oxydase (ou complexe IV), un transporteur d'électrons essentiel à cette chaîne car catalysant la réduction du dioxygène O_2 pour la respiration cellulaire, l'utilise pour sa fonction (201). En dernier exemple, le cuivre est un cofacteur essentiel de la lysyl oxydase qui est nécessaire à la bonne formation de la matrice extracellulaire car elle réticule les fibres de collagène et

d'élastine. L'absence de cuivre conduit notamment à un tissu osseux dégradé (202) et moins résistant (203).

Le cuivre est retrouvé dans le sérum total environ 1,2 mg/L (19 μM) de cuivre chez l'adulte (203), pour une quantité totale estimée à environ 100 mg dans le corps entier (201). Dans les milieux biologiques, le cuivre est très majoritairement lié à des chaperons protéiques spécialisés dans son transport dont la céruléoplasmine, responsable à elle seule de 40% à 70% de son transport dans le plasma (204). Quand il n'est pas lié à des chaperons, il est trouvé localement sous forme soluble (205) Cu^{2+} ou Cu^+ , bien que cette dernière forme, moins stable, se transforme rapidement en Cu^{2+} vraisemblablement par réaction avec les ions superoxydes O_2^- (206). Dans les milieux intracellulaires, où la forme Cu^+ est majoritaire, il est en condition physiologique quasi-exclusivement lié à d'autres chaperons protéiques spécialisés dans son transport (207), (208).

Pour que les cellules utilisent et échangent du cuivre, il existe des molécules très spécialisées dans son internalisation et son externalisation. On peut citer la protéine hCTR1 (High affinity copper uptake protein 1), responsable à plus de 80% de cette internalisation cellulaire (209), (201), les ATPases ATP7A et ATP7B, situées dans l'appareil de Golgi qui sont nécessaires à la sécrétion du cuivre dans le milieu extracellulaire par le biais de vésicules. Des mutations sur ces ATPases sont responsables de la maladie de Menkès et de la maladie de Wilson, deux pathologies liées à une accumulation intracellulaire du cuivre et responsables, entre autres, de troubles neurologiques (201), (210).

La nécessité d'un système de transport aussi spécialisé s'explique pour deux raisons : il est d'une part nécessaire de maintenir une homéostasie satisfaisante de cet élément trace dans le corps. La diminution de cuivre mobilisable à l'échelle cellulaire y entraîne des dommages (211). D'autre part, le cuivre est très réactif et il est nécessaire d'éviter la génération de dégâts cellulaires à cause de cette réactivité. Ces dégâts proviendraient en grande partie de ROS, notamment les radicaux hydroxyle HO^\bullet et superoxyde $\bullet\text{O}_2^-$, dont la formation apparaît catalysée par la présence de Cu^{2+} libre. Le contexte environnemental aurait également son importance puisque certains composés supposés anti-ROS, à l'instar de l'acide ascorbique, peuvent faciliter la génération de ROS par Cu^{2+} (212). Les types de dommages causés par les ROS sont multiples mais les plus importants endommagent profondément le fonctionnement des cellules. Ils peuvent altérer la structure des protéines par modification des acides aminés les composant ou modifier les bases de l'acide désoxyribonucléique (ADN), ce qui entraîne des anomalies génétiques qui peuvent être permanentes (213), (214).

I.5.2.3.2. Effets sur les cellules endothéliales

Le cuivre est généralement considéré comme un agent pro-angiogénique. Il agit comme un agent chimiotactique attracteur pour les cellules endothéliales (215) et, par exemple, l'absence de cuivre chez le lapin provoque une diminution de l'angiogénèse. De plus, les zones de la rétine de ces lapins, riches en cellules endothéliales, seraient également plus riches en cuivre (216).

Une expérience *in vitro* (217) montre que les ions cuivre Cu^{2+} stimulent spécifiquement la prolifération de cellules endothéliales humaines issues de l'artère ombilicale (HUAEC : Human Umbilical Artery Endothelial Cells) ou d'HUVEC. L'adjonction de 500 μM de CuSO_4 dans un milieu de culture sans sérum est suffisante pour obtenir un doublement de la population de cellules en 48 h en l'absence d'autres facteurs de croissance. De plus, cet effet ne passe pas par des voies de signalisation médiées par les facteurs de croissance dans le sérum et n'est

pas inactivé par l'ajout d'anticorps dirigés contre des facteurs pro-angiogéniques, des facteurs de croissance ou des facteurs chimiotactiques. Un effet stimulant la prolifération des HUAEC et HUVEC est observé dès 5 μM de CuSO_4 , avec un effet dose-dépendant maximal à partir de 200 μM . En parallèle, une autre étude montre que la prolifération d'HUVEC est stimulée dès 63 $\mu\text{g/L}$ (1 μM) de cuivre mais ne trouve pas d'effet dose-dépendant (217). En dernier exemple, une étude sur des HUVEC testant deux gammes de concentrations de cuivre montre une augmentation de l'angiogenèse par bourgeonnement dans des matrices de gel ECMatrix. Elle montre également que les HUVEC exposées à la gamme de concentrations de cuivre de 10-30 mg/L (157–472 μM) ont leurs expressions de VEGF et eNOS augmentées alors que la gamme 240-740 mg/L (3,77 à 11,64 mM) n'entraîne qu'une augmentation de l'expression d'eNOS (218), potentiellement en réponse à une augmentation de la génération de ROS (68).

Les effets pro-angiogéniques observés pourraient provenir de l'activation de la voie de l'hypoxie médiée par HIF-1 malgré des conditions de normoxie. Le cuivre apparait capable, peut-être par l'action de ROS, de stabiliser la sous-unité HIF-1 α normalement dégradée en normoxie par la PHD comme évoqué en partie I.2.4.6 (219). Cependant une étude observe un niveau de ROS intracellulaire inchangé chez des HUVEC pour des doses de cuivre allant jusqu'à 6,4 mg/L (100 μM) (217).

Les cellules endothéliales sont davantage tolérantes que d'autres types cellulaires à l'effet cytotoxique provoqué par une forte concentration en cuivre. Les doses supportées varient cependant selon les études et la provenance des cellules endothéliales utilisées. Des cellules endothéliales aortiques voient leur capacité de relaxation mécanique diminuer dès 127 $\mu\text{g/L}$ (2 μM) de cuivre et leur viabilité diminuer dès 1,27 mg/L (20 μM) (220). Des HUVECs voient, quant à elles, leur prolifération ne diminuer, sans modification de leur viabilité, qu'à partir de 14,1 mg/L (222 μM) de cuivre (217). Une autre étude sur des HUVECs et HUAECs ne montre pas de perte de viabilité jusqu'à la dose testée maximale de 31,8 mg/L (500 μM) de cuivre (13). Cela résulte probablement d'une adaptation métabolique au contexte spécifique des cellules endothéliales, qui ont un métabolisme peu oxydatif comme évoqué en partie I.2.4.8. Ce métabolisme spécialisé leur permettrait de diffuser plus d' O_2 dans les tissus environnants, mais également d'utiliser les ROS comme signaux par le biais notamment de la voie HIF-1. Par ailleurs, le sang transporte de nombreuses molécules réactives comme l'homocystéine qui, dans une réaction catalysée par le cuivre libre ou la céruléoplasmine, génère des ROS. Cette réaction entraîne, dans certaines pathologies où les taux d'homocystéine sont élevés, de l'athérosclérose et donc de graves problèmes vasculaires (214), (211). Les cellules endothéliales sont donc probablement plus adaptées à affronter un stress oxydatif que des cellules qui y ont une exposition moindre.

I.5.2.2.3.3. Effets sur les ostéoblastes

Le cuivre aurait un effet positif sur l'activité ostéogénique des ostéoblastes, une des raisons de cette stimulation tiendrait à l'augmentation de l'activité de la lysyl oxydase en présence de concentration de cuivre accrue. De nombreuses études évaluant les propriétés ostéogéniques de matériaux dopés ou imprégnés de cuivre montrent une augmentation des marqueurs ostéogéniques typiques : augmentation de l'activité de l'ALP, augmentation de l'expression d'OCN et d'OPN. D'après la revue (11) ces études montrent très souvent des augmentations de la densité de l'os déposé et une augmentation de la différenciation de pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures. Une étude suggère également la possibilité d'une modulation de l'inflammation par le cuivre. Ceci en polarisant des macrophages vers un état

pro-inflammatoire M1, favorable à la formation d'ostéoblastes matures en stimulant la prolifération et la différenciation de pré-ostéoblastes (221).

Les ostéoblastes paraissent moins bien tolérer de fortes concentrations de cuivre que les cellules endothéliales. Par exemple, une étude montre une diminution de la viabilité de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 dès 0,8 mg/L (12,4 µM) de cuivre avec une génération dose-dépendante de ROS associée au cuivre (217). Une étude (222) sur des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 voit un effet cytotoxique apparaître à la forte concentration de 63,5 mg/L (1 mM) de cuivre mais sans effet dose-dépendant identifié jusqu'à la concentration maximale testée de 1000 mg/L (16 mM) de cuivre (222).

I.5.2.2.3.4. Effets sur les ostéoclastes

Le cuivre aurait un effet inhibiteur sur la résorption osseuse effectuée par les ostéoclastes. En effet, cela pourrait passer par l'action de la superoxyde dismutase, utilisant le cuivre pour neutraliser des espèces radicalaires utilisées par les ostéoclastes pour la dégradation de la matrice minérale de l'os.

La tolérance des ostéoclastes au cuivre apparaît également plus faible que celle des cellules endothéliales. Dans une étude sur des ostéoclastes humains dérivés de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell), des effets cytotoxiques surviennent dès 1,9 mg/L (30 µM) de cuivre. Leur activité de résorption osseuse diminue dès 1,1 mg/L (17,8 µM) mais ces cellules conservent la capacité de se différencier en ostéoclastes à cette concentration (223).

Le phénomène d'ostéoporose (diminution de la masse osseuse) chez les personnes âgées pourrait être en partie atténué par des suppléments de cuivre dans l'alimentation, ce qui renforce l'hypothèse de son effet inhibiteur de la résorption osseuse (224).

I.5.2.2.3.5. Effets supplémentaires

En plus de ces effets cellulaires, le cuivre est à même de diminuer de façon indépendante et dose-dépendante, la vitesse de formation des hydroxyapatites de l'os du fait de sa forte affinité pour les phosphates ainsi que pour les carbonates CO_3^{2-} et hydroxydes OH^- (225).

I.5.2.2.4. L'impact du silicium

I.5.2.2.4.1. Rôle biologique du silicium

Le silicium est un élément considéré comme essentiel car vraisemblablement nécessaire à la formation du tissu osseux. On le retrouve dans l'ensemble de l'organisme à des taux variables selon le tissu considéré : 1 mg/L (35 µM) dans le sérum, 100 mg/L (3,5 mM) dans l'os, et dans une fourchette de 200-600 mg/L (7-21 mM) dans le cartilage et certains tissus conjonctifs. Dans l'os, il est retrouvé en plus grande concentration dans les phases initiales de la minéralisation au sein des sites d'ostéogénèse. D'anciennes études (226) (227) sur l'animal montrent qu'une carence en silicium entraîne un retard de croissance du tissu osseux : les os sont plus fins, plus petits et plus souples ce qui entraîne des déformations anatomiques et un manque de robustesse. D'autre part, une quantité réduite de collagène est observée dans le cartilage de ces animaux carencés (226), (227). D'après une revue (14), des études plus récentes sur l'animal montrent qu'une carence en silicium entraîne l'augmentation de la sécrétion de l'OPN qui est une molécule pro-résorption. D'après la même revue, des

études sur l'alimentation humaine montrent une influence positive du silicium sur la densité minérale osseuse où un écart maximal de 10% a été observé entre les individus à l'apport le plus riche en silicium par rapport à ceux pour lesquels l'apport est le plus faible. Certaines de ces études sont cependant contestées et la compréhension du rôle du silicium est donc encore imparfaite (14). L'absorbabilité du silicium dans l'alimentation est principalement de la forme d'acide orthosilicique Si(OH)_4 (228).

Dans les milieux biologiques, le silicium est retrouvé principalement sous cette forme d'acide orthosilicique Si(OH)_4 tant que la concentration ne dépasse pas 28-56 mg/L (1-2 mM) et le pH 9. Au-delà de cette concentration, de l'autopolycondensation entraîne la formation d'un gel se déposant par gravité au fond du milieu, même à pH neutre (229), (230).

I.5.2.2.4.2. Effet sur les cellules endothéliales

Le silicium semble promouvoir l'angiogenèse bien que les mécanismes impliqués soient encore peu compris : une étude *in vitro* montre un effet pro-angiogénique direct du silicium sur des HUVEC en passant par une inhibition de PHD et la conséquente stabilisation de HIF-1 α ce qui entraîne une angiogenèse par la voie de l'hypoxie comme décrite en partie I.2.4.6 (231). Une autre étude *in vitro* (232), avec des nanotubes de TiO_2 dopés au silicium sur lesquels sont cultivées des cellules endothéliales EA.hy926, montre des augmentations dose-dépendantes de la prolifération, de la sécrétion de VEGF et de la production de NO avec une gamme de concentration en silicium testée de 2,5-7 mg/L (90-250 μM) (232). Une étude (233) sur l'implantation *in vivo* de ciments de brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dopés au silicium, montre une vascularisation accrue de l'implant après 8 semaines mais la voie impliquée n'est pas recherchée (233). D'après une revue (234), d'autres études *in vivo* montrent quant à elles l'existence d'un effet indirect du silicium qui stimulerait la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules environnantes des cellules endothéliales. Ces résultats sont consolidés par la démonstration *in vitro* (235), d'un effet paracrine pro-angiogénique de fibroblastes sur des HUVEC en présence de 0,7-1,8 mg/L (25-65 μM) de silicium dans un modèle de coculture : les fibroblastes en coculture augmentent leur sécrétion de VEGF ce qui conduit les HUVEC à exprimer les marqueurs pro-angiogéniques eNOS et VE-Cadhérine (235).

L'interaction précise du silicium avec l'angiogenèse n'est donc pas encore pleinement comprise. Sur les cellules endothéliales, il pourrait s'agir d'une activation de la voie de l'hypoxie en inhibant PHD par interaction directe avec ses cofacteurs Fe^{2+} ou l'acide ascorbique. Un rôle direct ou relié à la synergie avec d'autres ions est également possible, par exemple en renforçant l'action du cuivre par un mécanisme là encore non élucidé (234).

I.5.2.2.4.3. Effet sur les ostéoblastes

Le silicium en solution est considéré comme un élément pro-ostéogénèse en stimulant la prolifération, la différenciation, l'activité de l'ALP et les capacités de minéralisation des ostéoblastes indépendamment de facteurs ostéogéniques comme l'acide ascorbique ou la dexaméthasone (236). Une étude *in vitro* (237) sur des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 montre que le silicium soluble a un effet stimulateur de la minéralisation de manière dose-dépendante. La minéralisation de l'environnement est accrue avec des doses croissantes de silicium de 0,028-2,8 mg/L (1-100 μM). Cet effet stimulateur pourrait provenir d'une stimulation de la capacité de minéralisation des ostéoblastes mais l'activité de l'ALP n'apparaît augmentée

que pour 0,14-0,28 mg/L (5-10 μ M) de silicium. Cela suppose que le silicium améliore la minéralisation de manière dose-dépendante indépendamment des ostéoblastes (237).

Des résultats similaires sont obtenus avec des matériaux dopés au silicium. Une étude (236) montre notamment une augmentation du dépôt de minéraux à la surface d'un implant d'hydroxyapatite dopée au silicium suivi par une stimulation de l'ostéogénèse. Les résultats optimaux sont obtenus pour un ratio de silicium de 0,8% m/m (236). Une autre étude (233) (citée dans la sous-partie précédente) montre une ostéogénèse accrue apparaissant sur des implants de brushite dopés au silicium après 4 semaines d'implantation avec un ratio optimal de silicium de 0,5% m/m (233).

Le mécanisme précis de ces effets n'est pas encore élucidé bien que l'élément déclencheur puisse être une stimulation de la production de collagène de type 1 : il apparaît que l'acide orthosilicique Si(OH)_4 est suffisant pour en augmenter la synthèse avec des résultats optimaux obtenus entre 0,28-0,56 mg/L (10-20 μ M). Dans cette même gamme de concentration, une expression accrue de l'ALP et de l'OCN est observée indiquant dans le même temps une augmentation de la différenciation en ostéoblastes matures (238). Une autre étude (239) montre que Si(OH)_4 stimule la différenciation de CSM en ostéoblastes en inhibant le facteur de transcription NF- κ B par le biais d'une surexpression du micro-ARN miR-146a. L'inhibition de NF- κ B entraîne l'activation de la voie Runx2 qu'il inhibe en temps normal, ceci permet la différenciation et la maturation des ostéoblastes (239).

I.5.2.2.4.4. Effet sur les ostéoclastes

L'effet du silicium sur les ostéoclastes n'est pas encore clairement établi avec de nombreux articles apparaissant contradictoires au premier abord.

Une étude (230) montre que le silicium provenant de la dissolution d'un bioverre (45S5) diminue de manière dose-dépendante la différenciation, l'expression génétique de marqueurs ostéoclastiques clefs (le récepteur à la calcitonine, la cathepsine K, TRAP...) et inhibe *in vitro* l'activité de résorption de pré-ostéoclastes murins RAW264.7. La fourchette de concentration de silicium inhibitrice sans modification de viabilité serait de 66-125 mg/L (2,35-4,45 mM) (230). Une autre étude *in vivo* (233) (citée dans les deux sous-parties précédentes) sur des ciments de brushite dopés au silicium ne trouve pas d'anomalie dans la différenciation de pré-ostéoclastes RAW264.7 en présence de silicium. Les auteurs de l'étude observent *in vitro* que les ciments dopés entraînent une activité TRAP augmentée et des lacunes de résorption de volumes plus importants à la surface du matériau, deux signes d'une plus grande activité ostéoclastique. Par ailleurs, le ratio optimal de silicium dans le matériau pour cet effet serait de 0,5% m/m (233). Une autre étude *in vivo* (236) montre une activité de résorption des ostéoclastes variable en présence d'hydroxyapatite dopée au silicium. Cette activité apparaît dépendante de la concentration en silicium, les ratio massiques (m/m) 0,2%, 0,4%, 0,8% et 1,5% entraînant des phénotypes différents : activité ostéoclastique importante pour 0,2% et 0,4% avec une plus faible organisation du nouveau tissu osseux. Les ratios 0,8% et 1,5% montrent une plus faible résorption ce qui suggère une inhibition pour les fortes concentrations de silicium (236). En dernier exemple, une étude *in vitro* teste de l'hydroxyapatite dopée au silicium avec des ratios de 0,5% m/m et 1,2% m/m et les compare à de l'hydroxyapatite pure. Cette étude montre une meilleure résorption du matériau en présence de silicium ainsi qu'une absence d'inhibition des ostéoclastes avec 14 mg/L (0,5 mM) de silicium en solution (240).

En conclusion de ces différentes études, il faut comprendre que l'effet seul de la concentration de silicium soluble ne peut probablement pas expliquer tous ces résultats obtenus sur des

matériaux. Les modifications sur la stabilité et la structure du matériau apportées par le silicium ont vraisemblablement une grande importance avec en facteur suggéré, une plus grande capacité d'adsorption des protéines par la surface de matériaux dopés au silicium. Cette modification pourrait entraîner une meilleure adhérence des ostéoclastes et faciliter la résorption du matériau (241), (236), (240). De plus, les interactions des ostéoclastes avec les cellules environnantes sont modifiées par la présence de silicium, une étude montre notamment que des pré-ostéoclastes murins RAW264.7 seuls ne sont pas affectés par une concentration en silicium de 0,28-2,8 mg/L (10-100 μ M). En revanche, en cas de coculture avec des ostéoblastes Sa-OS-2 0,28 mg/L (10 μ M) de silicium suffisent à diminuer le nombre d'ostéoclastes matures exprimant TRAP (242). Ce résultat est attribué à l'augmentation concomitante de l'expression de l'inhibiteur de la différenciation ostéoclastique OPG par les ostéoblastes (242), (243).

I.6. Brève revue des hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium pour la régénération osseuse et/ou l'angiogenèse.

L'utilisation de dopage chimique est répandue dans les biomatériaux comme la partie précédente a pu le mettre indirectement en évidence. De nombreux travaux se sont intéressés au dopage de l'hydroxyapatite, les paragraphes suivants font état de la bibliographie de ces hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium qui sont les matériaux étudiés dans cette thèse.

I.6.1. Les hydroxyapatites dopées au cuivre

Les travaux traitant d'hydroxyapatites dopées au cuivre et réalisant des tests *in vitro* ou *in vivo* avec des cellules impliquées dans la réparation osseuse sont peu nombreux :

Les travaux de Gomes et al. (244) étudient des phosphates de calcium biphasique (BCP) formés d'hydroxyapatite et de β -TCP dopés au cuivre. Le dopage du BCP est obtenu par substitution lors d'une synthèse par voie aqueuse où une solution de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, une solution de pentoxyde de phosphore P_2O_5 et une solution de nitrate de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ sont mélangés à 85°C pendant 24 h. Le ratio molaire Cu/Ca du dopage au cuivre utilisé pour des tests *in vitro* de cytotoxicité est de 0,01 et les températures de frittage sous air sont de 600°C, 900°C ou 1200°C pendant 15 h. Ces tests sont conduits sur des CSM primaires de moelle osseuse humaine. Les cellules sont cultivées sur des disques, obtenus par pressage uniaxial des poudres frittées, pendant 7 jours et leur viabilité est comparée à des cellules sur des matériaux non dopés. La présence de cuivre diminue la viabilité des cellules quelle que soit la température de frittage. Le matériau fritté à 1200°C n'entraîne pas de perte de viabilité significative des cellules s'il est rincé au préalable avec de l'eau pure. Les auteurs de l'étude attribuent cette cytotoxicité importante des matériaux frittés à 600°C et à 900°C à la présence de chaux et à une importante concentration de cuivre en solution. Le relargage de cuivre a été étudié par immersion des disques dans 20 mL de milieu de culture DMEM sur 21 jours. Du cuivre est relargué dès le premier jour avec des niveaux de solubilisation différents selon les températures de frittage. Le BCP fritté à 600°C relargue à 1 jour 28 mg/L (441 μ M) et jusqu'à 40 mg/L (629 μ M) à 21 jours, celui fritté à 900°C de 18 mg/L (283 μ M) jusqu'à 50 mg/L (787 μ M) et celui fritté à 1200°C de 10 mg/L (157 μ M) jusqu'à 12 mg/L (189 μ M). D'après les auteurs, ces différences de solubilisation sont liées aux différences chimiques entre ces matériaux, celui fritté à 900°C étant principalement composé de β -TCP très soluble tandis que celui fritté à 1200°C est principalement composé d'hydroxyapatite peu soluble. Dans la continuité de cette étude, les travaux de Jacobs et al. (245) évaluent la

cytotoxicité des mêmes BCP dopées au cuivre avec des ratios molaires Cu/Ca de 0,005, 0,01 et 0,02 et des températures de frittage de 600°C, 900°C et 1200°C pendant 15 h. Les poudres sont ensuite immergées 48 h dans de l'eau pure pour retirer la chaux. L'activité métabolique de cellules souches mésenchymateuses humaines est mesurée *in vitro* après culture sur des disques des matériaux jusqu'à 15 jours. Aucune baisse d'activité métabolique significative n'est mesurée aux jours 3, 7 et 15. La concentration en cuivre maximale mesurée est de 12 mg/L (189 µM) pour le matériau fritté à 600°C avec un ratio molaire de cuivre de 0,2. Le relargage du cuivre par les matériaux frittés à 600°C et 900°C est comparable et la concentration en solution évolue proportionnellement au ratio molaire. Le relargage du cuivre est plus faible pour le matériau fritté à 1200°C qui est majoritairement composé d'hydroxyapatite.

Les travaux de Li et al. (246) portent sur des nanoparticules d'hydroxyapatite de 70 nm de diamètre obtenues par synthèse par voie aqueuse en faisant réagir de l'hydroxyde de calcium et de l'acide phosphorique. Ces nanoparticules sont ensuite substituées au cuivre par une méthode d'échange ionique utilisant de l'acétate de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Ce matériau relâche des ions Cu^{2+} dans du tampon phosphate salin (PBS). Le matériau contenant 0,66% m/m de cuivre dans la structure entraîne une concentration de cuivre de 82 µg/L (1,29 µM) après 24 h d'immersion dans du PBS. Ce matériau avec 0,66% m/m de cuivre possède un effet cytotoxique quand il est placé pendant 24 h avec des ostéoblastes de fœtus humains HFOB 1.19 dans du milieu de culture DMEM/F12. Une cytotoxicité comparable est retrouvée avec un matériau contenant 0,33% m/m de cuivre mais la concentration de cet élément relâchée en solution n'a pas été mesurée.

Les travaux de Elrayah et al. (247) décrivent des architectures d'hydroxyapatite pure frittées puis recouvertes d'hydroxyapatites substituées au cuivre par une méthode hydrothermale utilisant différents ratio de solutions de nitrate de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ mélangées à des solutions de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et d'hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 . L'hydroxyapatite substituée résultante contient des ions Cu^{2+} avec une concentration massique m/m de 0,03% à 0,07%. Les matériaux « cuivrés » apparaissent biocompatibles vis-à-vis de cellules endothéliales humaines primaires sur la durée d'étude *in vitro* de 5 jours. L'effet du cuivre en tant qu'élément potentiellement relargué dans le milieu n'est pas étudié. Les auteurs notent que cette addition du cuivre entraîne des modifications de la topographie de surface par les grains déposés à la surface de l'hydroxyapatite sous-jacente. Ils relient ces modifications à un effet stimulateur de l'angiogenèse observé *in vivo* chez le lapin. Après implantation des architectures, davantage de vaisseaux sanguins sont observés autour des implants recouverts d'hydroxyapatite substituée au cuivre par comparaison avec des architectures d'hydroxyapatite pure.

Les travaux de Mou et al. (248) décrivent des architectures faites d'un mélange d'un copolymère d'acides aminés multiples et de particules d'hydroxyapatite déficitaire en calcium dopée au cuivre. L'hydroxyapatite dopée au cuivre est préparée par précipitation en milieu aqueux à partir de solution de sulfate de cuivre (II) CuSO_4 , de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de phosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Les architectures testées possèdent une concentration massique de cuivre allant de 0,5% à 5%. Les compositions contenant 2% m/m de cuivre et au-delà entraînent une cytotoxicité sur des cellules souches mésenchymateuses de rat dès 4 jours de culture *in vitro*. La composition avec une concentration de 1% m/m est capable de stimuler l'adhérence, la prolifération et l'activité de l'ALP de ces cellules *in vitro*. En mesurant le cuivre contenu dans du PBS remplacé à différents intervalles de temps, les auteurs de l'étude observent que cette composition relâche jusqu'à

2,5 mg/L (39 μ M) de cuivre en solution après 2 semaines avec une concentration décroissante à mesure que le PBS est remplacé jusqu'à retrouver à 0,4 mg/L (6,3 μ M) à 16 semaines.

Les travaux de Nikitina et al. (249) décrivent une hydroxyapatite substituée en cuivre synthétisée par précipitation à partir d'une solution de nitrate de cuivre (II) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ avec des solutions de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et de phosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Des concentrations de 0,1 à 0,5 moles de cuivre par mole d'hydroxyapatite ont été testées. Des tests sont effectués sur des poudres qui sont calcinées de 900°C jusqu'à 1400°C, puis mises en forme et frittées de 1200°C jusqu'à 1400°C. Ces traitements thermiques entraînent la formation d' α - et /ou de β -TCP ainsi que de CaO. Des tests de biocompatibilité utilisant des cellules humaines d'ostéosarcome MG-63 montrent que les différentes concentrations de cuivre testées n'entraînent pas de perte de viabilité et augmentent même la densité cellulaire à 14 jours.

Les travaux de Bazin et al. (158) réalisés au sein de l'IRCER en collaboration avec l'ICMCB (Université de Bordeaux), seront plus détaillés dans la partie matériels et méthodes puisque l'hydroxyapatite substituée au cuivre utilisée dans cette thèse est reprise de son étude. Quelques points clefs en rapport avec les études précédentes sont développés ici. Premièrement, la méthode d'élaboration passe par une voie solide avec mélange d'oxyde de cuivre CuO et d'hydroxyapatite pure résultant en une insertion de cuivre dans l'apatite par frittage réaction. A la suite de celui-ci, il n'existe qu'une seule phase cristalline apatitique et le cuivre dans la structure de l'hydroxyapatite est majoritairement sous forme Cu (I) mais du Cu (II) peut être présent en faible quantité. Des substitutions au cuivre allant de 0,1 à 1,5 molaire (0,8% m/m à 10,7% m/m) ont été réalisées. Les propriétés biologiques évaluées sont la biocompatibilité et la différenciation de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 testées *in vitro* sur des céramiques denses et comparées à celles d'une hydroxyapatite pure. Il apparaît que les hydroxyapatites substituées contenant jusqu'à 0,5 mole (3,8% m/m) de cuivre par mole d'hydroxyapatite sont biocompatibles mais entraînent une légère diminution des marqueurs de la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes.

1.6.2. Les hydroxyapatites dopées au silicium

Il existe une plus grande quantité de travaux traitant d'hydroxyapatites substituées au silicium comparativement à celles substituées au cuivre. Cela provient probablement du fait que ses fonctions pro-ostéogénèse sont connues depuis plus longtemps et qu'il est très bien toléré par les cellules comme cela a été développé en partie 1.5.2.2.4. Devant le plus grand nombre de travaux existants, une sélection a été effectuée en guise d'illustration des hydroxyapatites silicatées.

Les travaux de Patel et al. (250) décrivent l'élaboration d'hydroxyapatite substituée en silicium contenant 0,8% m/m de silicium par une méthode de précipitation aqueuse où de l'acétate de silicium est ajouté pendant une réaction entre deux solutions d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et d'acide orthophosphorique H_3PO_4 . En l'absence d'acétate de silicium, cette réaction permet d'obtenir de l'hydroxyapatite pure. Les deux matériaux sont ensuite mis sous la forme de granules de 0,5 mm à 1 mm et frittés à 1200°C pendant 2 h sous air. Ces granules de taille et de forme comparables sont ensuite implantés *in vivo* dans des fémurs de lapin « White Rabbit New Zealand » et leur intégration osseuse est évaluée après 23 jours. Les granules des deux compositions ne génèrent pas d'inflammation observable et s'intègrent au tissu osseux environnant. Ceux avec silicium s'intègrent mieux à l'os (60% de leur surface externe au contact contre 47% sans silicium) et le développement d'un tissu osseux est plus important

(37,5% contre 22%). Le rythme de déposition de la matrice minérale est plus important autour des granules au silicium (4 $\mu\text{m}/\text{jour}$ contre 2,5 $\mu\text{m}/\text{jour}$). Cette étude met donc en évidence un accroissement des propriétés ostéogéniques de l'hydroxyapatite quand on lui ajoute du silicium. Dans la continuité de ces travaux, l'étude de Botelho et al. (251) décrit *in vitro* les effets sur des ostéoblastes primaires humains de ces hydroxyapatites dopées au silicium synthétisées par la même méthode que l'étude précédemment citée. Deux taux de silicium au sein de l'hydroxyapatite sont testés, 0,8% m/m et 1,5% m/m et ces matériaux frittés à 1300°C durant 2 h sous air sont comparés à de l'hydroxyapatite pure. La présence de 1,5% m/m de silicium stimule la différenciation des ostéoblastes avec une augmentation de l'activité de l'ALP à 7 jours. Le matériau à 0,8% m/m de silicium stimule davantage l'activité des cellules après 21 jours, une fois que la minéralisation est en cours, avec une plus importante quantité de protéines retrouvées ce qui suggère qu'il existe un effet dose-dépendant et un optimum qui est dépassé pour 1,5% m/m de silicium.

D'autres travaux soulignent l'existence de cet optimum de concentration du silicium dans l'hydroxyapatite comme ceux de Aminian et al. (252) qui décrivent l'élaboration d'une hydroxyapatite substituée au silicium par méthode hydrothermale. Une solution de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ réagit avec du phosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ et de l'orthosilicate de tétraéthyle $\text{Si}(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O})_4$ puis est maintenue pendant 8 h à 200°C. La poudre obtenue est lavée, puis calcinée à 800°C durant 1 h sous air, puis mise en forme de disque. Deux matériaux avec des concentrations de silicium respectives de 0,8% m/m et 1,5% m/m sont préparés et des tests biologiques *in vitro* sont réalisés. En comparaison à de l'hydroxyapatite pure, le matériau contenant 0,8% m/m de silicium entraîne un accroissement de 44% de l'activité métabolique d'ostéoblastes humains Saos-2, là où le matériau contenant 1,5% m/m de silicium n'entraîne qu'une augmentation de 14%. Des images MEB de la surface des matériaux indiquent par ailleurs, une meilleure adhérence des ostéoblastes et un meilleur étalement de ces derniers sur le matériau contenant 0,8% m/m de silicium.

Les travaux de Sun et al. (253) décrivent une hydroxyapatite substituée au silicium obtenue par réaction hydrothermale à 150°C pendant 24 h entre de l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$, du phosphate monocalcique $(\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2)$ et des nanoparticules dioxyde de silicium SiO_2 . La poudre résultante est mise sous la forme de disque puis frittée à 1000°C pendant 2 h sous air. Trois matériaux avec des concentrations de silicium variables sont obtenus avec des ratios molaires Si/Ca après synthèse de 0,1, 0,02 et 0,002. Les paramètres physiques des matériaux sont comparables et seule la chimie diffère. Des tests biologiques sont réalisés *in vitro* sur des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 et les résultats sont comparés à de l'hydroxyapatite pure. Un relargage de silicium dépendant de sa concentration dans le matériau est observé après 48 h en milieu de culture avec des concentrations en solution de 8 mg/L (0,28 mM), 54 mg/L (1,92 mM) et 108 mg/L (3,84 mM) pour les matériaux aux ratios molaires Si/Ca de 0,002, 0,02 et 0,1 respectivement. La relation non linéaire entre la quantité de silicium dans le matériau et sa présence en solution montre l'existence d'équilibres chimiques limitant la présence de silicium soluble. Les matériaux avec des ratios molaires Si/Ca de 0,02 et 0,1 entraînent respectivement une augmentation de la prolifération des cellules à 7 jours et à 4 et 7 jours soulignant l'importance de la dose disponible de silicium. A 14 jours le matériau avec un ratio molaire de Si/Ca de 0,1 stimule l'activité de l'ALP. La mesure de l'expression de 21 gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation de ces cellules montre que le matériau avec un ratio molaire de 0,002 Si/Ca a un effet inhibiteur sur la majorité de ces gènes par rapport à HA, là où celui ayant un ratio de 0,1 a un effet majoritairement stimulateur sur ces mêmes gènes. D'après ces résultats, la concentration en silicium contrôle la prolifération et la

différenciation de ces ostéoblastes tout en notant que des gènes importants dans l'ostéogenèse comme celui codant la protéine BMP-2, décrit dans la partie I.4.5.1.1, sont surexprimés à toutes les concentrations de silicium dans le matériau.

Cependant, il est à noter qu'une seule étude s'intéressant à l'effet d'un tel matériau silicaté sur l'angiogenèse a été publiée (254). Comme il a pu déjà transparaître lors de la bibliographie des effets du silicium sur les cellules endothéliales, cet axe de recherche apparaît particulièrement délaissé. Ces travaux sont ceux de Fu et al. (254), où les auteurs comparent les propriétés biologiques *in vitro* de disques de titane recouverts d'une couche d'hydroxyapatite substituée au silicium ou d'hydroxyapatite pure. Ces couches sont réalisées à l'aide de deux types de procédés de déposition électrochimique utilisant une solution d'électrolytes contenant 2,5 mM de Ca^{2+} , 1,2 mM de PO_4^{3-} et 0,3 mM de SiO_3^{2-} . L'effet du silicium et de la nanotopographie sont évalués, le matériau testé contient 0,8% m/m de silicium et selon le procédé de déposition électrochimique il forme une surface de cristaux d'hydroxyapatite ayant une apparence de feuillets ou de bâtonnets nanométriques. Des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 cultivés à la surface de ces disques ont leur différenciation stimulée quand la surface est composée de feuillets nanométriques. Les solutions servant à créer les revêtements sont également évaluées *in vitro* sur des HUVEC et montrent que le silicium entraîne une augmentation de leur vitesse de migration et de la formation de tubules. Il entraîne également une augmentation de la production de NO et de l'expression de marqueurs liés à l'angiogenèse comme VEGF et eNOS.

I.6.3. Bilan des hydroxyapatites substituées au cuivre ou au silicium pour la régénération osseuse et/ou l'angiogenèse

Les études biologiques sur les hydroxyapatites substituées pour la régénération osseuse sont nombreuses mais peu d'entre elles prennent la problématique de l'angiogenèse en compte. La majorité des études traitant de la substitution au silicium ne caractérisent pas leurs effets sur l'angiogenèse malgré l'importance de cet aspect dans la réparation osseuse (sous-partie I.4.8.3) et l'effet vraisemblablement stimulateur du silicium (sous-partie I.5.2.2.4.2). En conséquence, les propriétés angioconductrices et/ou angiogéniques de substitutions au silicium au sein d'hydroxyapatites sont très mal comprises tout comme les mécanismes sous-jacents. Les études caractérisant des hydroxyapatites substituées au cuivre pour la régénération osseuse s'intéressent peu à la problématique de l'angiogenèse malgré la stimulation avérée du cuivre pour celle-ci (sous-partie I.5.2.2.3.2). Une seule étude, réalisée *in vivo* s'y intéresse.

Dans ces différentes études, les mécanismes biologiques affectés par la substitution ionique ne sont pas systématiquement recherchés ne permettant pas d'identifier leur origine. De plus, dans les travaux utilisant des hydroxyapatites substituées au cuivre, la concentration de cet élément dans un milieu n'est pas systématiquement recherchée alors qu'elle est déterminante pour ses effets biologiques (sous-partie I.5.2.2). Les matériaux sont obtenus par des méthodes différentes et la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques pertinentes pour leurs effets biologiques comme la surface spécifique, la rugosité ne sont pas toujours réalisées ou prises en compte. La comparaison à un standard d'hydroxyapatite bien caractérisé ou à un matériau similaire à l'hydroxyapatite substituée n'est par ailleurs pas systématique. En l'absence de ces contrôles, les effets observés ne peuvent pas être assimilés à la seule présence de l'élément dopant.

Les travaux de thèse présentés ici s'inscrivent dans la continuité de plusieurs études sur les hydroxyapatites substituées réalisées précédemment au laboratoire IRCER. Ces travaux sont la thèse de Tiphaine Bazin (158), (255) sur les hydroxyapatites substituées au cuivre synthétisées par voie solide et celle de Mickaël Palard (256), (257), sur les hydroxyapatites substituées au silicium par voie aqueuse. Les travaux de cette thèse sont en partie dédiés à la caractérisation *in vitro* des propriétés angiogéniques de ces matériaux.

I.7. Conclusions et objectifs de l'étude

Lorsqu'un os présente un défaut de masse critique qui doit être comblé par un implant et qu'une greffe osseuse n'est pas souhaitable ou possible, l'utilisation de substitut osseux s'impose. Les substituts à base de céramiques phosphocalciques font l'objet de nombreuses recherches en raison de leur biocompatibilité et de leur bonne ostéoconduction. Parmi ces céramiques, l'hydroxyapatite est intéressante en raison de sa faible solubilité qui permet le développement de tissu à sa surface. En revanche, l'absence d'activité pro-angiogénique de l'hydroxyapatite la rend inadaptée quand le défaut de masse critique nécessite l'implantation d'une pièce faisant plus de 1 cm depuis l'os (258). Parallèlement, de nombreux modèles d'études *in vitro* des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques pour la réparation osseuse ne prennent pas suffisamment en compte la complexité du micro-environnement osseux.

Pour conférer des propriétés pro-angiogéniques aux céramiques phosphocalciques leur dopage par divers éléments chimiques est étudié dans de nombreux travaux. Le cuivre et le silicium sont deux éléments possédant des caractéristiques les rendant très désirables pour la réparation osseuse. Le cuivre est un facteur pro-angiogénique et anti-résorption osseuse avéré mais dont les modes d'action en tant que dopant et les concentrations efficaces sont mal connues. Le silicium est un facteur pro-ostéogénique en tant que dopant et pro-angiogénique mais cette dernière propriété est peu étudiée et mal comprise. Les connaissances des propriétés biologiques sur l'angiogenèse d'hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium restent lacunaires.

Cette thèse a pour premier objectif de caractériser *in vitro* les propriétés biologiques d'hydroxyapatites denses dopées au cuivre ou au silicium. La lignée de cellules endothéliales murines C166 sera utilisée pour évaluer les capacités angiogéniques et angioconductrices des céramiques testées. La biocompatibilité des hydroxyapatites, l'expression de marqueurs angiogéniques centraux et les capacités fonctionnelles des cellules endothéliales seront évaluées. L'effet biologique des différents paramètres physico-chimiques des céramiques pourra être évalué et comparé en réalisant également, dans ces travaux, la synthèse des hydroxyapatites, leur mise en forme et leur caractérisation physico-chimique.

Le second objectif est de développer un modèle *in vitro* de caractérisation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques qui soit plus représentatif de l'environnement *in vivo*. Les cellules C166 ou la lignée de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 sous-clone 14 seront cultivées en monocultures ou en coculture sur des architectures d'hydroxyapatite denses macroporeuses, mises en forme par procédé de fabrication additive en micro-extrusion, placées dans un bioréacteur en flux par perfusion. Le développement des cellules à la surface des architectures sera contrôlé par des méthodes d'observation microscopique et l'expression de marqueurs clefs de l'angiogenèse et/ou de l'ostéogenèse sera analysée.

Les démarches expérimentales détaillées seront présentées au début de chaque partie associée.

Partie II. Matériels & Méthodes

II.1. Matériaux

II.1.1. Synthèse d'hydroxyapatite (HA)

L'hydroxyapatite utilisée dans cette thèse, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, est synthétisée au laboratoire selon un procédé de précipitation par voie aqueuse développé précédemment (259). Dans un réacteur illustré à la Figure 23, une solution aqueuse de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (237124, Sigma-Aldrich) à 0,64 M est agitée à 100 tr/min et chauffée à 90°C sous atmosphère d'argon. Une solution aqueuse d'hydrogénophosphate de di-ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (A.5360/53, Fisher scientific) à 0,64 M est chauffée à 60°C et ajoutée à vitesse constante à l'aide d'une pompe péristaltique (Pumpdrive 5206, Heidolph), réglée à 48 mL/min, à la solution de calcium de manière à obtenir un ratio molaire final $\text{Ca}/\text{P}=10/6$ correspondant à l'hydroxyapatite pure. Après addition des réactifs, le mélange est maintenu sous agitation à 120 tr/min pendant 15 min à 90°C sous balayage d'argon à 0,5 L/min et pH 9, ce dernier est régulé par ajout automatisé d'une solution d'hydroxyde d'ammonium NH_4OH (A/3280/21, Fisher scientific) à 8,79 M, à l'aide d'une pompe gamma (gamma/ L, ProMinent). Une fois la maturation terminée, le précipité est récupéré dans des pots et centrifugé 5 min à 500 g pour éliminer le milieu liquide de la synthèse. La pâte résultante est lavée deux fois en H_2O DI en centrifugeant les pots 5 min à 500 g. Le précipité est ensuite mis à sécher pendant 14 h au minimum dans une étuve à 100°C. Le solide résultant est ensuite broyé à l'aide d'un pilon dans un mortier en agate. Avant toute utilisation, cette poudre est caractérisée chimiquement comme renseigné ultérieurement dans la partie II.1.4. Si les caractérisations chimiques confirment que la poudre est monophasée et exempte de contamination chimique, alors cette poudre brute est calcinée à 650°C pendant 30 min avec des rampes thermiques de 20°C/min au sein d'un four (LH30/13, Nabertherm) pour éliminer les nitrates résiduels avant son utilisation.

II.1.2. Synthèse d'hydroxyapatite substituée au silicium ($\text{Si}_{0,4}\text{HA}$)

L'hydroxyapatite substituée au silicium utilisée dans cette thèse, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$, est également réalisée au laboratoire et s'appuie sur des travaux précédents (159). Le procédé est similaire à la synthèse d'hydroxyapatite stœchiométrique mais une solution aqueuse de tétra-acétate de silicium $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ (345156, Sigma-Aldrich) à 0,04 M est ajoutée à celle d'hydrogénophosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ à 0,6 M, de manière à obtenir une substitution de silicium de $x=0,4$ mol soit 1,13% m/m. Pour pouvoir utiliser cette solution de silicium, celle-ci est préalablement homogénéisée dans un broyeur planétaire (Pulverizette™ 6, Fritsch) à l'aide de billes de broyage en alumine de 15 mm de diamètre pendant 1 min à 150 tr/min. Le procédé est ensuite le même que pour la synthèse d'hydroxyapatite pure et permet d'obtenir une poudre brute référencée $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$. Avant toute utilisation, cette poudre est caractérisée chimiquement comme renseignée dans la partie II.1.4. Si les caractérisations chimiques confirment que la poudre est monophasée et exempte de contamination chimique, alors cette poudre brute est calcinée à 700°C pendant 2 h avec des rampes thermiques de 20°C/min dans un four (LH30/13) pour éliminer les nitrates résiduels.

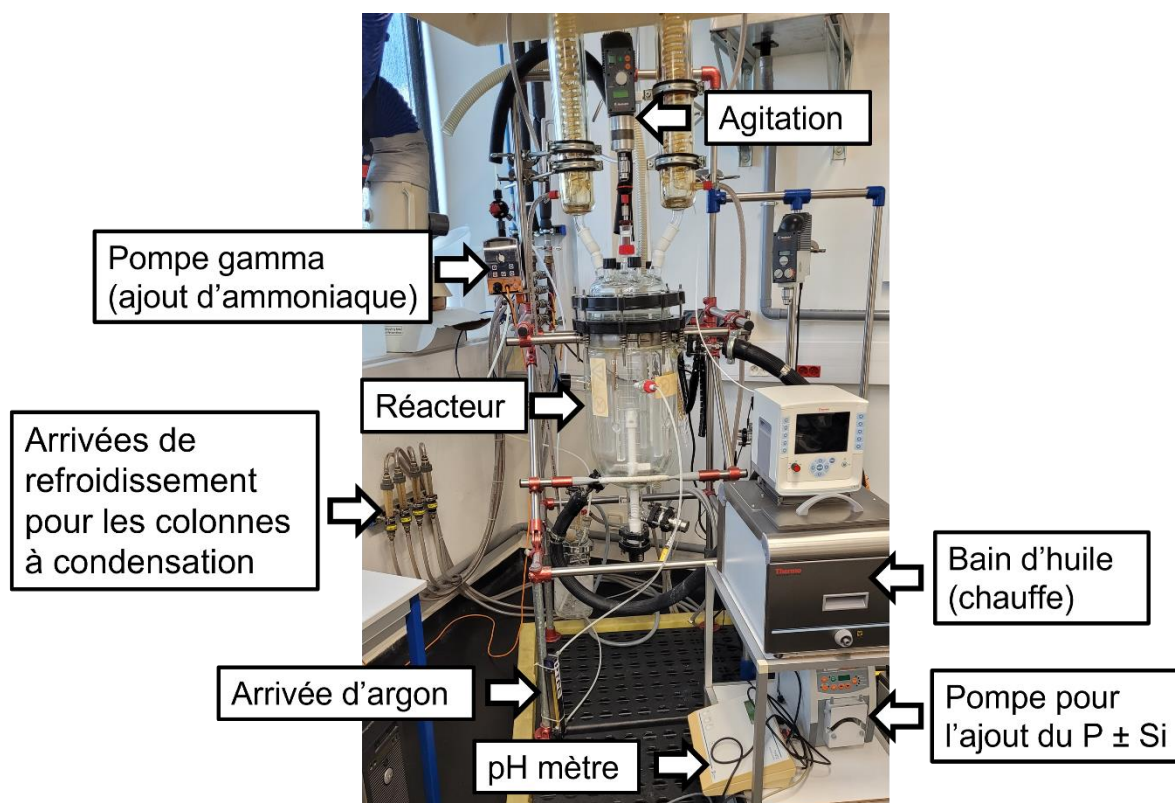


Figure 23 : Illustration du système de synthèse par précipitation en voie aqueuse

II.1.3. Préparation d'une hydroxyapatite substituée au cuivre ($\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$)

L'hydroxyapatite substituée au cuivre est réalisée au laboratoire sur la base de travaux précédents (158) utilisant un procédé de synthèse par voie solide. Deux concentrations de cuivre sont utilisées résultant en des matériaux de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}_{11z}\text{Cu}_y\text{O}_2\text{H}_2^{2z-y}$ ($y \gg z$) où $x=y+z$ et $x = 0,1$ ($\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$) ou $x = 0,5$ ($\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$). Les deux compositions évoquées ensemble le seront sous la notation Cu_xHA . Une poudre d'hydroxyapatite pure et calcinée est mélangée dans une jarre en téflon avec 0,8% m/m ou 3,8% m/m de poudre d'oxyde de cuivre CuO (33307, Alfa Aesar) et 2% m/m de dispersant (Darvan C-N 13710, Vanderbilt Minerals). Elle est broyée par attrition avec des billes de zirconie (ZrO_2) de 1 mm de diamètre selon un ratio m/m de billes par rapport à la poudre de 3,75. L'attrition est réalisée pendant 3 h dans de l' H_2O DI, grâce à une pâle en téflon connectée à un système d'attrition (R41-25/4, NETZSCH) réglé à 800 tr/min. Cette étape permet de réduire la taille des particules afin de favoriser la réaction par voie solide qui permettra, lors du frittage, l'insertion du cuivre dans la structure de l'hydroxyapatite.

La granulométrie de la poudre est contrôlée à 1 min et à 3 h sur des prélèvements passés au travers d'un tamis cellulaire de 100 μm de porosité (ClearLine® 141380C, Dominique Dutscher), pour retenir les billes et les éventuels amas. Les mesures sont réalisées dans de l' H_2O DI sous agitation et en circulation à l'aide d'un analyseur à diffraction laser (LA-950V2, Horiba) après avoir placé les flacons contenant les échantillons dans un bain à ultrasons pendant 5 min à puissance maximale. Les calculs sont réalisés avec l'indice de réfraction de l'hydroxyapatite (1,63). La granulométrie initiale permet d'apprécier l'effet de l'attrition. La taille moyenne souhaitée des particules d'hydroxyapatite est d'environ 2 μm de diamètre, afin de faciliter la réaction entre les composés et permettre la bonne incorporation du cuivre dans

l'apatite. Cette valeur à atteindre a été déterminée lors des travaux de thèse de Tiphaine Bazin (255). Les profils granulométriques de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 1 min et après 3 h d'attrition sont présentés dans la figure 24.

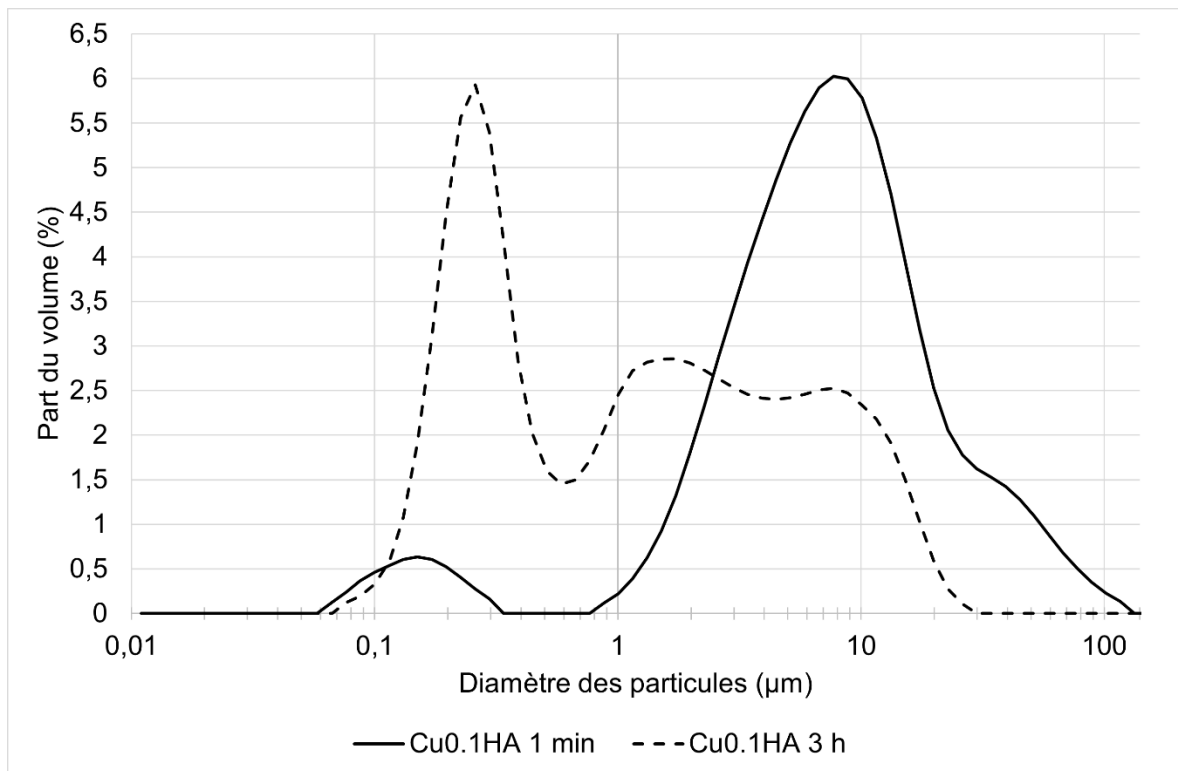


Figure 24 : Distribution volumique des particules de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 1 min ou 3 h d'attrition

Echelle logarithmique. Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 3 h d'attrition. L'aire sous la courbe indique la proportion (en %) du volume occupé par une taille donnée de particules.

La granulométrie en volume de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 1 min ou 3 h d'attrition (Figure 24) suit une distribution multimodale. Après 1 min d'attrition, la distribution a deux ensembles séparés. Le diamètre moyen dans le premier ensemble est $0,17 \mu\text{m}$. Cette distribution représente les particules de CuO et les grains individuels d'hydroxyapatite. Le diamètre moyen dans le deuxième ensemble est de $8 \mu\text{m}$, il correspond à des amas de particules d'hydroxyapatite. Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 0,32 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 10,70 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 51,25 \mu\text{m}$.

Après 3 h d'attrition, le profil granulométrique de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ possède 3 ensembles. Le premier a un diamètre moyen de $0,3 \mu\text{m}$, et représente une population de particules individuelles ou de très petits amas, il correspond toujours aux particules de CuO et aux grains d'hydroxyapatites. Deux ensembles, l'un avec un diamètre moyen de $1,5 \mu\text{m}$ et l'autre de $7,8 \mu\text{m}$ représentent une population de particules allant de $0,6$ à $30 \mu\text{m}$. Cette dernière population est composée essentiellement d'amas d'hydroxyapatite. Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 0,18 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 0,65 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 2,44 \mu\text{m}$.

La distribution granulométrique des poudres de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ en nombre de particules est présentée dans la Figure 25.

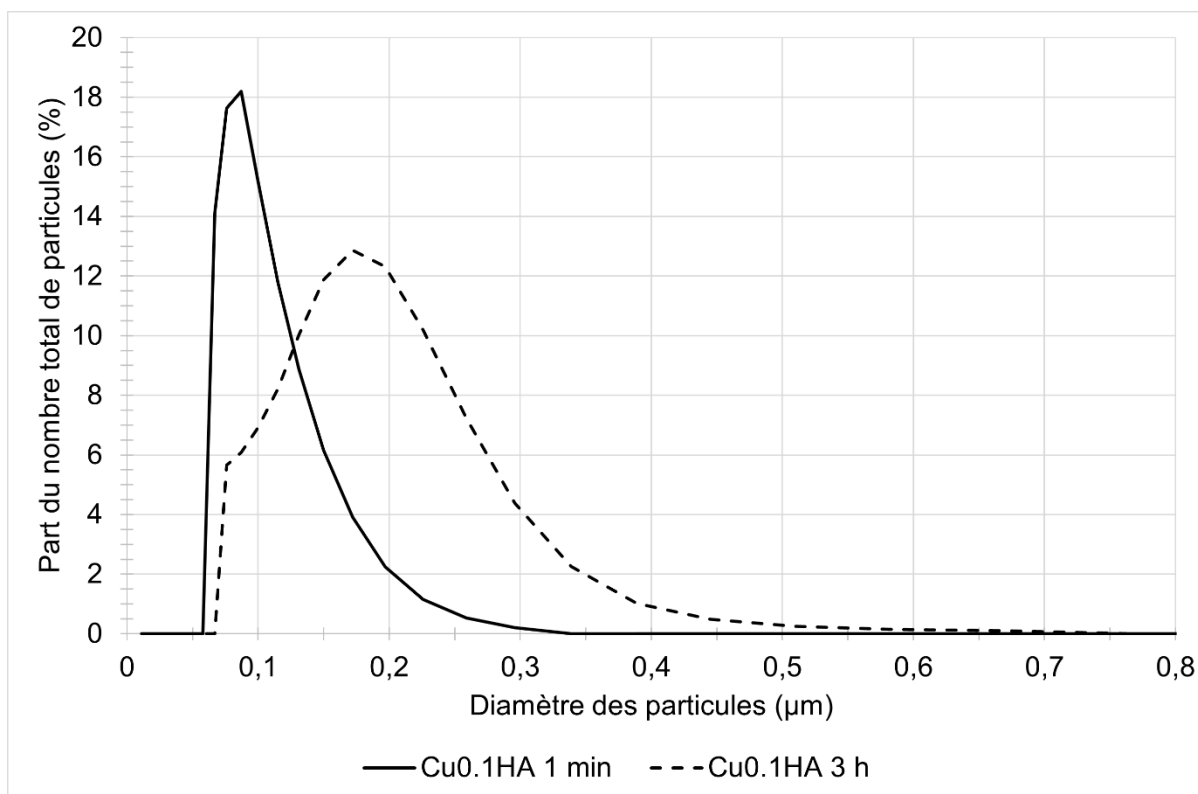


Figure 25 : Granulométries en nombre de la poudre Cu_{0.1}HA après 1 min ou 3 h d'attrition

Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 3 h d'attrition. Le signal représente la part (en %) des particules de différentes tailles.

La granulométrie en nombre, de poudres de Cu_{0.1}HA après 1 min ou 3 h d'attrition (Figure 25), révèle que la très large majorité (>99,99%) des particules sont de petite taille (<1 µm). Après 1 min d'attrition, la taille moyenne des particules est de $0,1 \pm 0,03$ µm. Après 3 h la taille moyenne des particules est de $0,16 \pm 0,07$ µm. L'augmentation de la taille moyenne des particules et l'étalement de la distribution peut s'expliquer par la réduction des amas d'hydroxyapatites en de nombreuses particules qui restent de faible dimension (<1 µm).

A la suite des 3 h d'attrition des poudres de Cu_{0.1}HA, peu d'amas subsistent et les particules font moins de 2 µm de diamètre. Les profils granulométriques de Cu_{0.5}HA sont présentés en Figure 26.

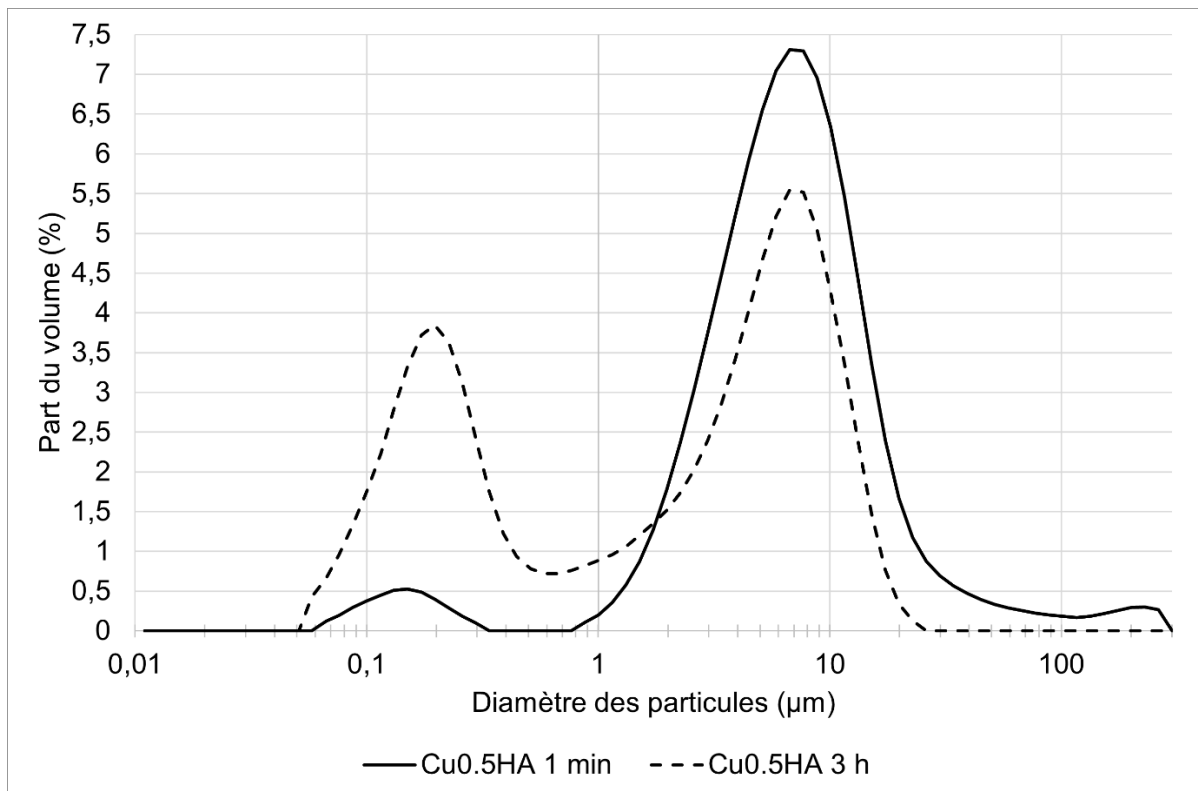


Figure 26 : Distribution volumique des particules de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 1 min et 3 h d'attrition

Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 3 h d'attrition. Le signal indique la part (en %) du volume occupé par une taille donnée de particules.

La granulométrie en volume de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 1 min ou 3 h d'attrition (Figure 26) suit une distribution multimodale. Après 1 min d'attrition, la distribution comporte trois ensembles séparés. Le premier ensemble a un diamètre moyen de $0,16 \mu\text{m}$ et représente les particules de CuO et les grains individuels d'hydroxyapatite. Le deuxième ensemble a un diamètre moyen de $7 \mu\text{m}$. Un troisième ensemble de particules à un diamètre moyen de $230 \mu\text{m}$. Cette population correspond à des amas de particules d'hydroxyapatite et les très grands amas ($>100 \mu\text{m}$) occupant proportionnellement beaucoup de volume, ils y sont « surreprésentés ». Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 2,1 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 6,15 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 16,4 \mu\text{m}$.

Après 3 h d'attrition le profil granulométrique de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ est bimodal. Le premier ensemble a un diamètre moyen de $0,2 \mu\text{m}$ et représente une population de particules individuelles ou de très petits amas de CuO ou de grains d'hydroxyapatite. Le deuxième ensemble a un diamètre moyen de $8 \mu\text{m}$ et cette dernière population est composée essentiellement d'amas d'hydroxyapatite. Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 0,13 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 2,8 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 9,6 \mu\text{m}$.

La distribution granulométrique en nombre de particules des poudres de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ est présentée dans la Figure 27.

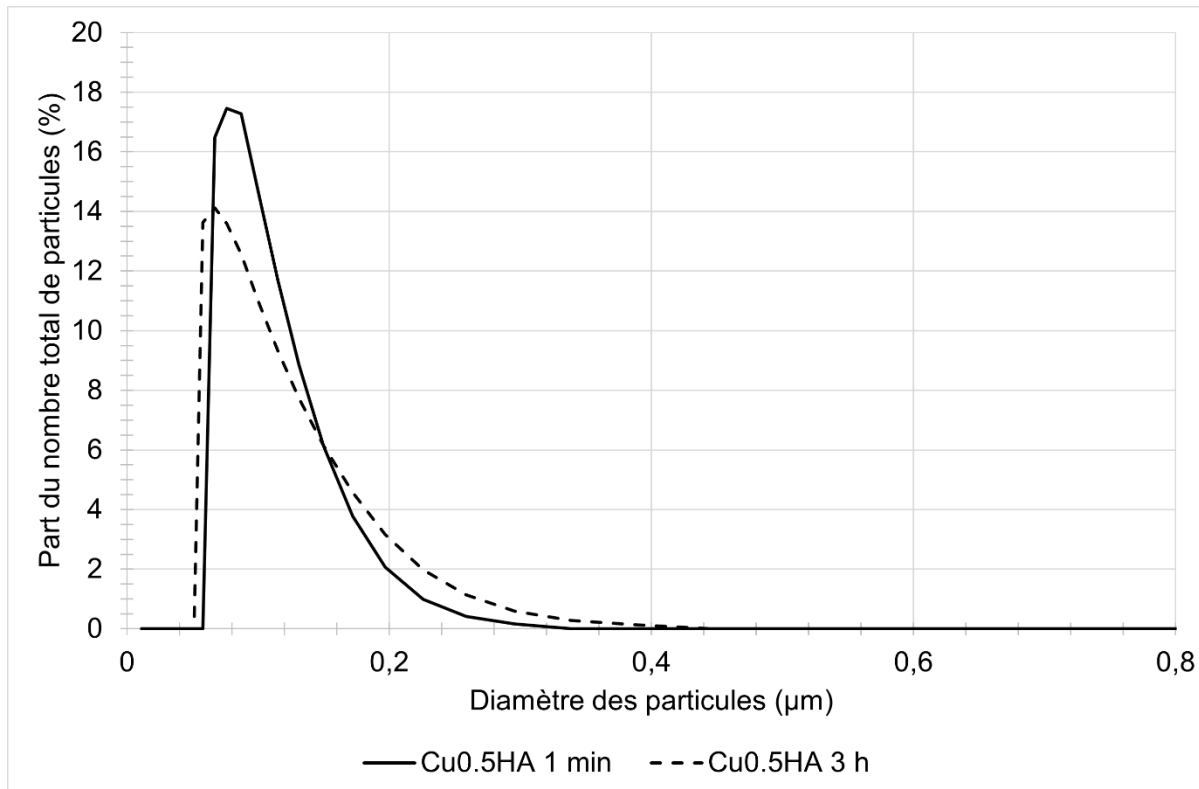


Figure 27 : Granulométrie en nombre typiques de $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ après 1 min et 3 h d'attrition

Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 3 h d'attrition. Le signal représente la part (en %) des particules de différentes tailles.

La granulométrie en nombre de poudres de $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ après 1 min ou 3 h d'attrition (Figure 27) révèle que la très large majorité des particules (>99,99%) est de petite taille (<1 µm). Après 1 min d'attrition la taille moyenne des particules est de $0,1 \pm 0,03$ µm. Après 3 h la taille moyenne des particules est de $0,1 \pm 0,05$ µm.

A la suite des 3 h d'attrition des poudres de $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ peu d'amas subsistent et les particules font moins de 2 µm de diamètre.

Ces granulométries sont conformes à ce qui est souhaité pour faciliter l'insertion du cuivre lors du frittage.

La pâte obtenue suite à l'attrition est récupérée à travers un tamis en inox de 80 µm (Retsch), puis séchée pendant 24 h à 100°C. Le solide résultant est tamisé à 80 µm avec ce même tamis et la poudre est prête pour la mise en forme.

II.1.4. Caractérisation des poudres

Pour s'assurer de la pureté du produit de synthèse, et de l'absence de contaminant, différentes caractérisations sont effectuées sur les poudres de HA, $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$, $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$.

Les poudres de HA et de $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ sont caractérisées en accord avec la norme ISO 13779-3 (260). La poudre issue de la synthèse (parties II.1.1 pour HA ou II.1.2 pour $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$) est broyée au mortier et pilon en agate puis calcinée à 1000°C pendant 15 h. Les rampes thermiques sont réglées à 20°C/min et un palier à 400°C est maintenu en fin de cycle (four MOS-B 180/4,

Protherm). Le maintien à 400°C permet de garder la poudre déshydratée le temps de la réalisation d'un test colorimétrique à la phénolphtaléine.

Ce test vise à détecter la présence de chaux grâce à la phénolphtaléine, un indicateur coloré virant de l'incolore en milieu acide au rose en milieu basique ($\text{pH} > 8$). Pour ce faire, quelques grains de poudre chaude sont immergés dans une solution aqueuse de phénolphtaléine composée d'environ 200 mL d' H_2O DI et quelques gouttes d'une solution mère de phénolphtaléine. En présence de chaux vive CaO , celle-ci s'hydrate au contact de l'eau et forme le composé $\text{Ca}(\text{OH})_2$ qui est une base forte (pK_a de 12,6) et entraîne le virage de la solution et une coloration rose.

II.1.4.1. Diffraction des rayons X

Pour contrôler la pureté des phases et s'assurer de l'absence de phase cristalline secondaire β - ou α -TCP et d'oxyde de calcium (CaO), les échantillons de poudre d'apatite calcinée à 1000°C sont analysés par diffraction des rayons X à l'aide d'un diffractomètre (D8 Advance Da Vinci, Bruker) en configuration Bragg-Brentano. Ce diffractomètre utilise les radiations $\text{K}\alpha$ du cuivre ($\text{CuK}\alpha$) et possède un détecteur discriminant les niveaux d'énergie (Lynxeye XE-T) qui permet de ne sélectionner que le doublet $\text{K}\alpha_1$. L'illumination est maintenue constante à l'aide d'une fente variable et un fond continu est obtenu à l'aide d'un couteau motorisé éliminant les signaux provenant des phénomènes de diffusion. Pour ne pas observer les échantillons sous une orientation préférentielle, ils sont mis en rotation à 10 tr/min et préparés de telle sorte à ce que les surfaces soient aussi isotropes que possible. Pour ce faire, les poudres sont déposées dans le porte échantillon sans compression et la surface est mise à niveau en appliquant des mouvements de haut en bas et dans différentes directions à l'aide d'une lame de rasoir. Pour lisser la surface, un unique tassement est réalisé à l'aide d'une lame de verre déposée sur la surface. Les diffractogrammes pour HA et $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ sont collectés entre 27° et 40° (2θ) avec un pas de 0,04° et un temps de pose par pas de 4 s. Ceux pour les Cu_xHA sont acquis sur poudre après attrition avec le CuO (obtenue selon le protocole de la sous-partie II.1.3) et sur poudre résultante d'une pastille de CuHA frittée et broyée dans un mortier en agate, pour contrôler la bonne insertion du cuivre dans l'hydroxyapatite (en observant la disparition du signal de CuO). L'analyse par DRX est faite entre 10° et 60° (2θ) avec un pas de 0,02° avec un temps de pose par pas de 1,2 s. Les phases cristallines sont identifiées à l'aide d'un logiciel spécialisé (EVA, Bruker) permettant de comparer les pics de diffraction avec les références contenues dans les fiches ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data – Powder Diffraction Files). Les fiches utilisées sont renseignées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : fiches ICDD-PDF utilisées pour la caractérisation des matériaux

| Composé chimique | N° de fiche PDF |
|---|-----------------|
| Hydroxyapatite : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | 9 - 0432 |
| β -TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 55 - 0898 |
| α -TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 9 - 0348 |
| $\text{Ca}(\text{OH})_2$ | 4 - 0733 |
| Chaux (oxyde de calcium) : CaO | 37 - 1497 |
| Oxyde de cuivre (II) : CuO | 48 - 1548 |
| Oxyde de cuivre (I) : Cu_2O | 5 - 667 |

Seules les poudres présentant une absence de phase secondaire cristallisée ont été utilisées pour la suite des expériences.

Des diffractogrammes illustrés typiques des poudres de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ sont représentés ci-dessous dans la Figure 28 :

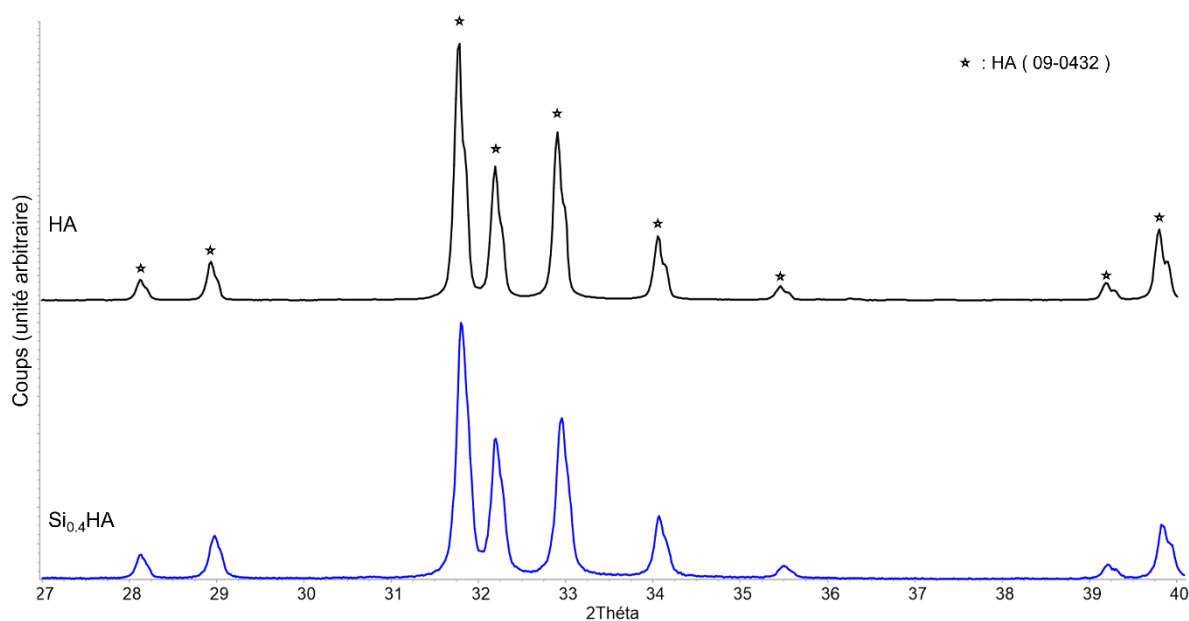


Figure 28 : Diffractogrammes typiques d'une poudre de HA et d'une poudre de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ calcinées à 1000°C sous air pendant 15 h

Etoile : angles correspondant à l'hydroxyapatite

L'analyse des phases cristallines des poudres de HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (Figure 28) montre que tous les pics correspondent au signal de l'hydroxyapatite. Aucun pic n'est rencontré pour les autres phases secondaires qui peuvent être rencontrées (α - et β -TCP, CaO ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$).

L'intégration du CuO dans l'apatite est présentée à l'aide d'une comparaison des diffractogrammes d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ non frittée et d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ issue du broyage de pastilles frittées à 1100°C pendant 1 h.

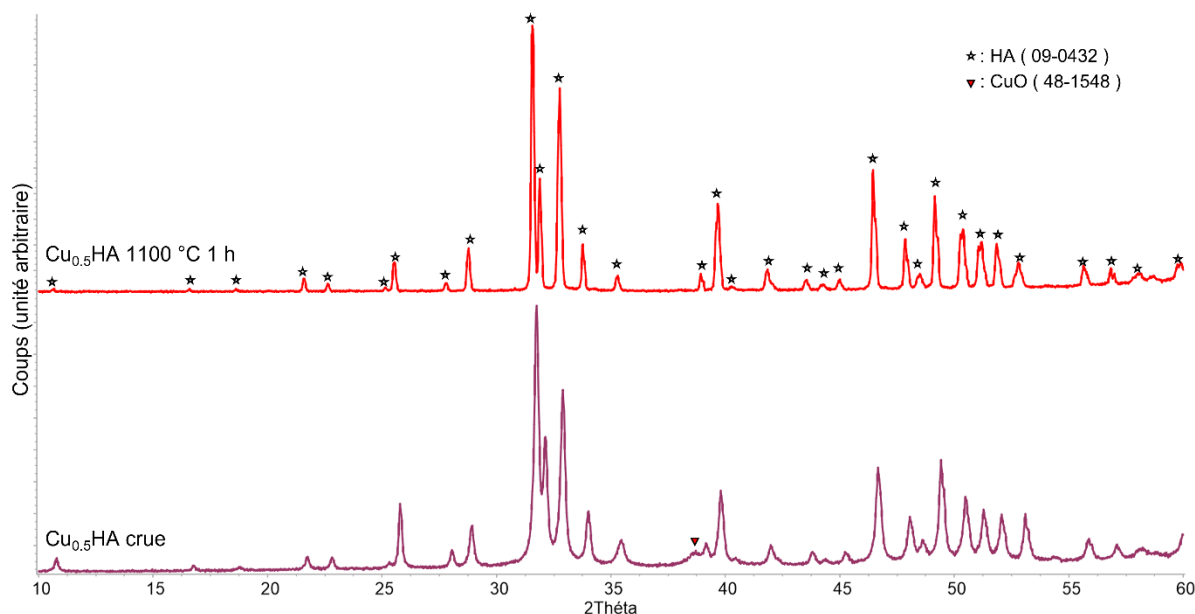


Figure 29 : Diffractogrammes typiques d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ non frittée et d'une poudre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ frittée à 1100°C sous air pendant 1 h

Poudre frittée (trait rouge) : pastille de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ frittée à 1100°C sous air pendant 1 h puis broyée au mortier et pilon en agate. Poudre non frittée (trait noir) : poudre de HA calcinée à 650°C pendant 30 min et attritée durant 3 h avec 3,8% m/m de CuO.

Sur les diffractogrammes des poudres de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ frittée et non frittée (Figure 29), les pics correspondent pour l'essentiel aux angles attendus de l'hydroxyapatite. Un pic à l'angle correspondant au CuO ($38,8^\circ$) est présent sur le diffractogramme de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ non frittée (Figure 29 bas). La disparition de ce pic après le frittage à 1100°C pendant 1 h (Figure 29 haut) atteste de la bonne incorporation du cuivre dans l'apatite.

Les diffractogrammes du matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ avant et après frittage ne possèdent que des pics associés aux angles de l'hydroxyapatite (l'oxyde de cuivre CuO, présent en faible quantité avant frittage, est en dessous du seuil de détection).

II.1.4.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Pour s'assurer de la pureté chimique des poudres de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ elles sont analysées à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Spectrum One, Perkin Elmer). Du bromure de potassium KBr (206391000, Acros Organics), maintenu en atmosphère sèche, est pressé en pastille de 10 mm de diamètre. 150 mg de KBr sont pesés et mis en forme par pressage uniaxial. Ensuite, quelques grains de la poudre à analyser, préalablement calcinée à 1000°C durant 15 h, sont ajoutés à une autre pastille de KBr de 150 mg. Enfin une dernière pastille est réalisée avec un ajout de plusieurs dizaines de grains de la poudre à tester dans les 150 mg de KBr. Ces pastilles sont ensuite analysées par le spectromètre en réalisant 32 scans en transmittance entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} . La première pastille, de KBr uniquement, sert à faire le blanc.

Les spectres obtenus sont contrôlés pour s'assurer qu'aucune bande vibrationnelle ne correspond à un contaminant potentiel. De plus, pour $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ l'absence de bande à 800 cm^{-1} est contrôlée pour s'assurer de la bonne incorporation des ions silicates et l'absence de silice

vitreuse. Les bandes vibrationnelles correspondant à l'hydroxyapatite et à l'hydroxyapatite substituée au silicium sont présentées dans le Tableau 2 et le

Tableau 3. Les spectres infrarouges de poudre de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ calcinées à 1000°C pendant 15 h sont présentés dans la Figure 30.

Tableau 2 : Bandes vibrationnelles communes utilisées pour la caractérisation de la poudre de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$

Bandes vibrationnelles sélectionnées d'après (261)

| Bande d'absorption IR (cm^{-1}) | Mode |
|--|-------------------------------------|
| 474 | $\nu_2\text{PO}_4$ |
| 570 | $\nu_4\text{PO}_4$ |
| 602 | $\nu_4\text{PO}_4$ |
| 632 | $\nu_L\text{OH}$ |
| 961 | $\nu_1\text{PO}_4$ |
| 1043 | $\nu_3\text{PO}_4$ |
| 1090 | $\nu_3\text{PO}_4$ |
| 1640 | $\delta\text{H}_2\text{O}$ adsorbée |
| 3000-3700 | $\nu\text{H}_2\text{O}$ adsorbée |
| 3573 | $\nu_s(\text{OH})$ |

Tableau 3 : Bandes vibrationnelles spécifiques utilisées pour la caractérisation de Si_{0.4}HA
 D'après des travaux précédents au laboratoire (159) et des données de la littérature (261).

| Bande d'absorbance IR (cm ⁻¹) | Mode |
|---|---------------------------|
| 504 | SiO ₄ |
| 522 | SiO ₄ |
| 752 | SiO ₄ |
| 840 | Si-R |
| 890 | Si-O |
| 928 | SiO ₄ |
| 945 | SiO ₄ ou Si-OH |
| 984 | SiO ₄ ou Si-OH |

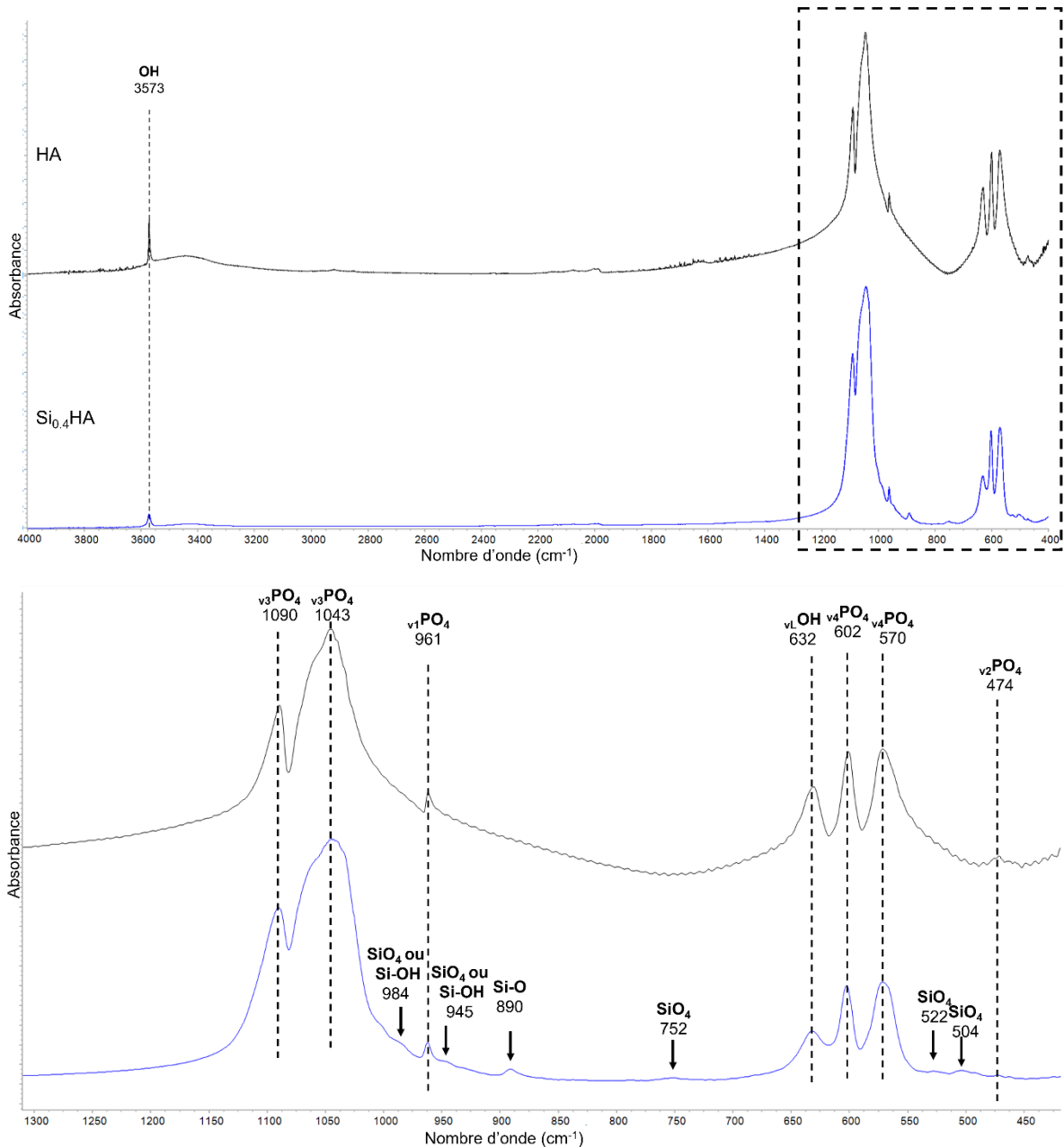


Figure 30 : Spectres FTIR typiques de poudre de HA et de Si_{0.4}HA calcinées à 1000°C pendant 15 h sous air

Spectre noir : HA. Spectre bleu : Si_{0.4}HA. Encadré en pointillés : région présentée dans le zoom situé dans la moitié inférieure de la figure. Spectres mis à en forme à l'aide du logiciel Spectraglyph (F. Menges "Spectraglyph - optical spectroscopy software", Version 1.2.14, 2020, <http://www.ffmpeg2.de/spectraglyph/>)

Sur les spectres FTIR des poudres de HA et de Si_{0.4}HA (Figure 30), toutes les bandes vibrationnelles correspondant à l'hydroxyapatite pure (Tableau 2) sont observées.

Au niveau du spectre FTIR de la poudre de Si_{0.4}HA, les bandes vibrationnelles à 504, 522 et 752 cm⁻¹ associées au SiO₄, celle à 890 cm⁻¹ associée à la liaison Si-O et celles à 945 et 984 cm⁻¹ associées à la liaison Si-OH ou au SiO₄ dans la structure apatite sont retrouvées. La

bande vibrationnelle à 800 cm^{-1} associée à la silice vitreuse n'est pas observée (159), (261). Ces bandes vibrationnelles confirment la bonne incorporation des ions silicates dans l'apatite. La substitution ionique en silicium dans $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ entraîne une diminution du nombre de groupements PO_4 et OH , comme le rappelle sa formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$. Ceci explique la diminution relative par rapport au spectre de HA de l'intensité des bandes vibrationnelles de OH à 3573 et 632 cm^{-1} et de PO_4 à 1090 et 632 cm^{-1} (mieux visible en Figure 30 dans la partie non zoomée).

II.1.5. Elaboration de céramiques

II.1.5.1. Pastilles mises en forme par pressage uniaxial

Pour fabriquer des pastilles cylindriques sur lesquelles sont réalisées les cultures cellulaires, les poudres calcinées sont broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier en agate puis placées dans des matrices avant d'être pressées. Deux tailles de matrices sont utilisées : 10 mm de diamètre et 13 mm de diamètre. Pour former une pastille de 10 mm , appelées par la suite $\phi 10$, 300 mg de poudre est placé au sein d'une matrice (GS03100, Specac). Pour les pastilles de 13 mm , appelées par la suite $\phi 13$, 500 mg de poudre est placé au sein d'une matrice (GS03000, Specac). Ces poudres sont pressées à une pression de 56 MPa maintenue pendant 20 s à l'aide d'une presse hydraulique (GS15011, Specac).

II.1.5.2. Obtention d'une pâte d'hydroxyapatite permettant la mise en forme d'architecture macroporeuse par micro-extrusion

La fabrication d'architectures poreuses en HA par micro-extrusion demande la réalisation d'une pâte de rhéologie adaptée à l'extrusion. Les caractéristiques de celle-ci doivent être celles d'un fluide non newtonien pseudoplastique rhéofluidifiant. Une poudre de HA brute est calcinée à 1055°C pendant 1 h sous air avec des rampes thermiques de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ dans un four (MOS-B 180/4). Cette poudre est ensuite broyée au pilon et mortier en agate et tamisée à l'aide d'un tamis en acier de $300\text{ }\mu\text{m}$ (60131000300, Retsch) pour s'assurer de l'absence d'amas de poudre de grande taille.

Cette poudre est par la suite broyée par attrition dans de l' H_2O DI à l'aide de billes de zirconium yttrifié de 1 mm de diamètre. Le ratio massique billes/poudre est de $3,75$ avec ajout de 1% m/m de dispersant (Darvan® C-N). Le mélange est placé dans une jarre en téflon et est attrité pendant 90 min à $1000\text{ tr}/\text{min}$ à l'aide d'une pâle en téflon mise en mouvement par un système d'attrition (R41-25/4, NETZSCH).

La granulométrie de la poudre est contrôlée à 1 min et à 90 min selon le même protocole que celui renseignée dans la partie II.1.3. Les poudres attritées sont utilisées pour la suite du procédé quand la taille maximale des particules de HA ne dépasse pas $10\text{ }\mu\text{m}$ afin de faciliter l'extrusion de la pièce.

Les profils granulométriques en volume typiques d'une poudre de HA avant et après attrition sont présentés dans la Figure 31.

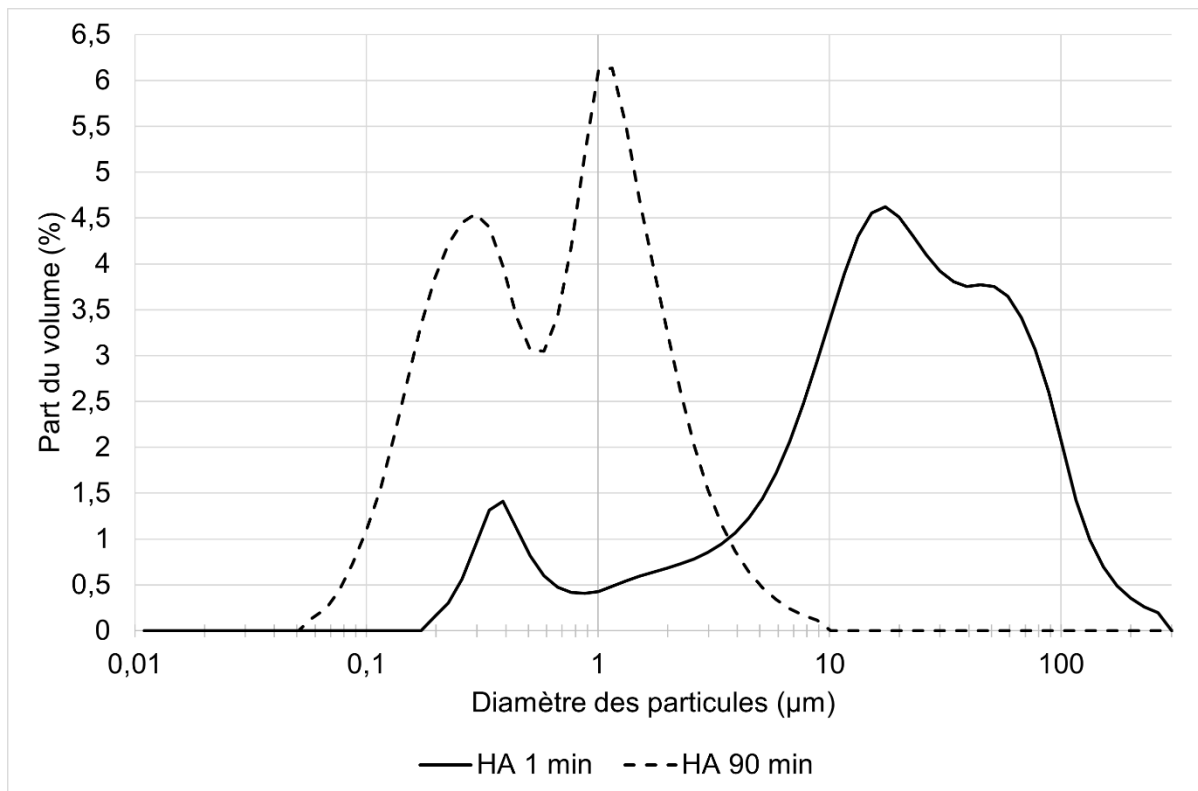


Figure 31 : Distributions volumiques de poudre de HA calcinée à 1055°C pendant 1 h après 1 min ou 90 min d'attrition

Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 90 min d'attrition. Le signal indique la part (en %) du volume occupé par une taille donnée de particules.

La granulométrie en volume d'une poudre de HA calcinée à 1055°C pendant 1 h après 1 min ou 90 min d'attrition (Figure 31) suit une distribution multimodale. Après 1 min d'attrition la distribution est bimodale. Le premier ensemble a un diamètre moyen de 0,39 µm et représente une population de particules individuelles ou de petits amas de grains d'hydroxyapatite. Le deuxième ensemble a un diamètre moyen de 17,4 µm et un plateau est présent de 26 à 34 µm. Cette deuxième population correspond à des amas de particules d'hydroxyapatite. Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 1,3 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 17,9 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 74,1 \mu\text{m}$.

Après 90 min d'attrition, le profil granulométrique de HA est plus étroit par rapport à 1 min d'attrition et reste bimodal. Le premier ensemble a un diamètre moyen de 0,3 µm et représente une population de particules individuelles ou de très petits amas de grains d'hydroxyapatite. Le deuxième ensemble a un diamètre moyen de 1,15 µm et représente une population d'amas de particules d'hydroxyapatite. Les diamètres de particules sous lesquels se trouvent 10%, 50% et 90% du volume de la distribution sont : $D(v,0.1) = 0,16 \mu\text{m}$, $D(v,0.5) = 0,65 \mu\text{m}$ et $D(v,0.9) = 2 \mu\text{m}$.

La Figure 32 présente les profils granulométriques de la même poudre mais avec une représentation selon le nombre de particules.

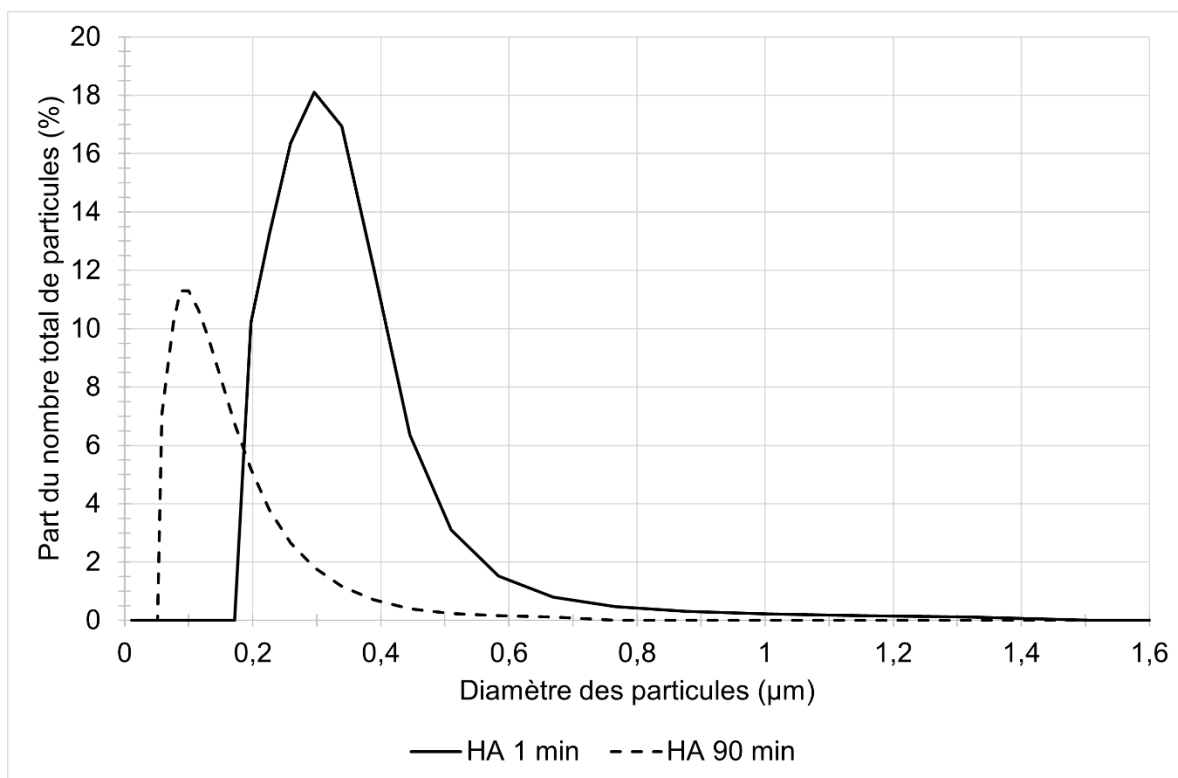


Figure 32 : Profils granulométriques en nombre d'une poudre de HA calcinée à 1055°C pendant 1 h après 1 min ou 90 min d'attrition

Le profil en trait plein correspond à 1 min d'attrition, celui en pointillé à 90 min d'attrition. La courbe représente la part (en %) des particules de différentes tailles.

La granulométrie en nombre de particules de HA après 1 min ou 90 min d'attrition (Figure 32), révèle que la très large majorité des particules (>99,99%) fait moins de 1,5 µm à 1 min ou à 90 min d'attrition. Après 1 min d'attrition la taille moyenne des particules est de $0,3 \pm 0,11$ µm. Après 90 min la taille moyenne des particules est de $0,12 \pm 0,07$ µm. La diminution de la taille des particules et le resserrement de la distribution s'explique par la réduction des amas d'hydroxyapatites en particules de plus faible dimension. Ces mesures confirment l'efficacité de l'attrition et les particules d'hydroxyapatites font moins des 10 µm maximum souhaités.

La pâte résultante de cette attrition est récupérée et filtrée à travers un tamis en acier de maille de 80 µm (60131000080, Retsch) puis séchée en étuve à 200°C durant 24 h. La poudre est ensuite broyée au pilon et mortier en agate et tamisée à l'aide du même tamis de 80 µm.

La pâte pour l'extrusion est ensuite réalisée, un gel de méthylcellulose à 4% m/v est confectionné en utilisant du méthylcellulose (METHOCEL™ E4M, 34516, Colorcon). Pour cela à 96 g d'H₂O DI est ajoutée une quantité de dispersant (Darvan® C-N) permettant d'obtenir dans la pâte finale une concentration de 1,2 mg de dispersant par m² de poudre. La quantité de dispersant (Darvan® C-N) est déterminée d'après la masse de gel selon le taux de charge visé de 50% en volume d'HA et le dispersant (Darvan® C-N) déjà ajouté pour l'attrition de la poudre (1% m/m).

Ce mélange est agité à 100 tr/min à l'aide d'une tige d'agitation à disque dissolvant (R 1303, Ika) et porté à 60°C à l'aide d'une plaque chauffante. L'agitation est alors réglée à 250 tr/min et 4 g de méthylcellulose (METHOCEL™ E4M) sont progressivement ajoutés jusqu'à la

solubilisation complète de la poudre. Le mélange est maintenu à 250 tr/min et 60°C pendant 30 min. Une fois la chauffe arrêtée, le mélange est laissé à refroidir passivement jusqu'à 35°C en maintenant une agitation à 250 tr/min. Le gel est conservé au minimum pendant 24 h à 4°C avant utilisation pour permettre une bonne hydratation des chaînes de méthylcellulose.

Après ce repos, 2,96 g de ce gel sont pesés et 9,6 g de poudre sont soigneusement ajoutés en 5 fois sur une durée totale d'environ 1 h. Quand toute la poudre est ajoutée et que le mélange est homogène, 3% m/m d'une solution de polyéthylène imine (PEI, 408700, Sigma-Aldrich) est ajoutée jusqu'à son intégration complète dans la pâte. Celle-ci est ensuite passée trois fois dans un laminoir tricylindre (EXAKT) en positions resserrées pour chasser l'air et achever l'homogénéisation de la pâte. Suite à cela, elle est emballée dans une double couche de parafilm et placée à 4°C dans un récipient en verre lui-même fermé hermétiquement à l'aide d'un parafilm. La pâte est conservée au moins 24 h à 4°C avant son utilisation pour que le système revienne à un état de repos avant l'extrusion.

Le taux de charge, qui détermine le volume que la céramique occupe dans la pâte, est déterminé à cette étape selon la formule :

$$\text{taux de charge} = V_{HA} / (V_{HA} + V_{organique})$$

V déterminant le volume. V_{HA} est calculé grâce à sa masse volumique selon la formule :

$$V_{HA} = m_{HA} / \rho_{HA}$$

m est la masse d'HA et ρ sa masse volumique. $V_{organique}$ est le volume occupé par le PEI et le gel à 4% v/v de méthylcellulose, ce volume est déterminé selon la formule :

$$V_{organique} = m_{organique} / \rho_{organique}$$

La masse volumique de HA sous forme de poudre est mesurée pour chaque lot par pycnométrie selon le protocole décrit ultérieurement dans la partie II.1.10. La masse volumique de la poudre de HA avoisine les 3,1 g/cm³, celle du PEI est de 1,08 g/cm³ et celle du gel est de 1,15 g/cm³ et est déterminée en pesant un volume fixe. Le taux de charge visé dans ces expériences est de 50% pour obtenir une pièce céramique dense après frittage. Après calcul les taux de charges des pâtes d'HA utilisées dans ces travaux sont compris entre 49% et 52%, proches de la valeur souhaitée de 50%.

Le procédé de mise en forme par extrusion est décrit au début de la Partie V.

II.1.6. Contrôle des températures de calcination et de frittage

Les températures réelles atteintes lors des différents cycles thermiques sont contrôlées à l'aide d'anneaux de mesure de la température, PTCR – ETH (Ferro) pour les cycles avec des paliers compris entre 850°C et 1100°C, PTCR – STH (Ferro) pour ceux avec des paliers compris entre 1130°C et 1400°C. Ces anneaux sont placés proche des échantillons pendant le cycle thermique puis leurs diamètres sont mesurés après refroidissement. La température réelle de l'enceinte au voisinage des échantillons est estimée d'après des tables de température fournies par le fabricant. Sur ces tables, les diamètres des anneaux de mesure sont associés à une température puis une correction de cette température est appliquée en fonction du temps de palier de frittage.

Les traitements thermiques des matériaux sont décrits au début de la Partie III pour les pastilles. Le traitement thermique est décrit au début de la Partie V pour les architectures macroporeuses.

II.1.7. Méthodes de caractérisation

Les dimensions physiques des pièces sont prises à l'aide d'un pied à coulisse, les caractérisations de leurs autres paramètres physiques font appel à des appareillages et techniques décrits ci-dessous.

II.1.8. Détermination de la taille des grains et des pores par microscopie électronique à balayage

La surface des céramiques frittées est observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) (Quanta FEG 450, FEI). Pour ce faire, les échantillons sont fixés sur un portoir métallique à l'aide d'un papier collant conducteur électrique ou d'une laque d'argent colloïdal PELCO® (16031, Agar scientifique). Les échantillons sont nettoyés de leurs poussières par projection d'air comprimé. Pour faciliter les observations, la métallisation des échantillons peut être requise et est réalisée à l'aide d'un pulvérisateur (« Agar sputter coater », Agar scientifique) projetant du platine. Les échantillons sont placés dans une enceinte étanche sous balayage d'argon, les réglages utilisés dans ces travaux permettent la projection plasma d'une couche de platine d'environ 3 nm.

Les analyses sont réalisées sur au moins 3 images obtenues sur 3 échantillons indépendants à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) pour mesurer la taille des grains et des pores.

II.1.9. Détermination de la porosité ouverte par la méthode de la poussée d'Archimède

La porosité ouverte des pastilles est déterminée par la méthode de la poussée d'Archimède. L'humidité résiduelle des pastilles est éliminée par séchage à 200°C pendant 24 h. Les pastilles sont pesées dans cet état sec donnant la masse sèche. Elles sont ensuite complètement imbibées d'H₂O DI grâce à un système de chambre à vide mouillable puis pesées dans l'H₂O DI donnant la masse immergée. L'H₂O DI présente en surface est retirée à l'aide d'un papier absorbant saturé en H₂O DI et la masse des pastilles est de nouveau mesurée, donnant la masse humide. Ces trois masses permettent d'extraire la porosité ouverte selon la formule $porosité\ ouverte = ((m_{imbibée} - m_{sèche}) / (m_{humide} - m_{immergée})) \times 100$ exprimée en pourcentage de porosité.

II.1.10. Détermination de la masse volumique des matériaux par pycnométrie

La masse volumique des matériaux frittés ou sous forme de poudre est déterminée sur 3 échantillons indépendants préalablement séchés à 100°C pendant 24 h. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre à gaz (AccuPyc II 1340, Micromeritics) en utilisant de l'hélium. Après la réalisation d'un blanc 10 mesures successives sont réalisées pour obtenir une moyenne pour chaque échantillon.

II.1.11. Détermination de la surface spécifique de poudres ou de pastilles par la méthode de la BET 8 points

La surface spécifique des poudres est contrôlée à l'aide de la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET) 8 points en utilisant un analyseur d'adsorption (ASAP 2020, Micromeritics) fonctionnant au gaz azote après un dégazage réalisé par une chauffe à 250°C pendant 1 h. La surface spécifique des poudres d'HA utilisées dans l'élaboration des architectures servant à ces travaux est comprise entre 10 m²/g et 17 m²/g.

La surface spécifique des pastilles est mesurée grâce à la méthode BET 8 points à l'aide d'un analyseur d'adsorption (ASAP 2020) utilisant le gaz krypton. Le dégazage est réalisé à 350°C durant 4 h, les échantillons sont pesés dans leur contenant puis les mesures effectuées par l'appareil.

II.1.12. Détermination de la rugosité de surface des pastilles par profilométrie

La rugosité de la surface des pastilles est mesurée à l'aide d'un profilomètre à stylet (DEKTAK 6M, Veeco) en utilisant un stylet en diamant ayant une pointe de 12,5 µm de rayon et en appliquant une masse de 1 mg. Les données de 6 passages de 4 mm de long sur 3 échantillons indépendants sont collectées. Ces mesures permettent de déterminer trois valeurs. La première est la rugosité RA qui est la déviation moyenne par rapport à la ligne moyenne de la rugosité et représente donc l'écart-moyen entre les pics et les vallées. La seconde, le RV est la valeur la plus grande rencontrée sous la ligne moyenne de la rugosité. Troisièmement, le RZ est la différence moyenne entre les 5 pics les plus hauts et les 5 vallées les plus profondes autour de la ligne moyenne, elle indique donc l'écart-moyen entre les extrêmes du relief.

II.1.13. Analyse des éléments chimiques solubles par spectrométrie d'émission optique à couplage plasma inductif (ICP-OES)

Le calcium Ca, le phosphore P, le silicium Si et le cuivre Cu sont recherchés dans les milieux de culture dans lesquels ont été immergés les matériaux avec ou sans cellules. L'analyse par ICP-OES nécessite un volume minimal d'environ 5 mL pour réaliser les mesures sur ces 4 éléments. Les concentrations des éléments Si et Cu étant faibles une procédure particulière est mise en place pour éviter les dilutions : les milieux de différentes expériences indépendantes, au temps sélectionné, sont récupérés et regroupés. Après une pesée pour calculer leur volume ils sont traités avec de l'acide nitrique HNO₃ (20 413.321, Prolabo) pour qu'il atteigne une concentration de 2% v/v. L'acidification des milieux permet de prévenir la précipitation du cuivre ou du silicium. Les échantillons liquides sont maintenus à 37°C sous agitation à la vitesse de 100 tr/min avant analyse. Les mesures par l'ICP-OES (Optima 8300DV, Perkin Elmer) sont répétées trois fois pour obtenir une moyenne et un écart-type.

II.2. Caractérisation des propriétés biologiques des céramiques à base d'hydroxyapatite

II.2.1. Modèles biologiques : lignées cellulaires

II.2.2. Cellules endothéliales murines : C166

Pour modéliser le comportement des cellules endothéliales à la surface des céramiques, la lignée immortalisée de cellules endothéliales murines C166 (ATCC® - CRL-2581™) a été sélectionnée. Cette lignée cellulaire est issue de cellules endothéliales murines extraites du sac vitellin d'embryons issus du croisement entre une femelle NMRI/GSF et un mâle CD-1 transgénique. Les souris NMRI-GSF font partie d'une lignée de souris albinos SWISS originaire du Naval Medical Research Institute (NMRI) de la ville de Bethesda aux Etats-Unis d'Amérique. Avant les travaux de développement des C166, elles ont été obtenues auprès de la Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF). Les cellules endothéliales des souris NMRI/GSF lient sélectivement à la lectine de *Dolichos biflorus*. Les souris CD-1 sont dérivées de souris albinos SWISS originaires du laboratoire Charles River

aux Etats-Unis d'Amérique. Pour le développement des C166, des souris CD-1 sont rendues transgéniques par transfection du pro-oncogène *fes* au stade embryonnaire (262). Les cellules C166 issues de ce croisement expriment plusieurs copies du proto-oncogène *fps* (*fps/fes*). Elles sont capables de former des hémangiomes multifocaux²¹ *in vivo*. *In vitro* ces cellules possèdent un comportement physiologique. Elles peuvent notamment former des tubules sur Matrigel™ et forment un pavage caractéristique des cellules endothéliales à confluence (263, 264). Elles sont également capables de proliférer sans stimulation exogène, et ce vraisemblablement grâce à une suractivation de la voie de signalisation des intégrines (265), (266). Les cultures peuvent être maintenues jusqu'à passage 20 sans anomalie. Les cultures dans ces travaux ont été utilisées entre les passages 3 et 16.

Le choix de cette lignée est justifié par :

- le comportement physiologique de ces cellules *in vitro* qui permet une évaluation pertinente des propriétés biologiques des matériaux testés.
- L'aspect pratique de l'utilisation d'une lignée stable ce qui facilite la comparaison entre des expériences éloignées dans le temps.
- L'espèce animale dont elles sont issues, c'est-à-dire la souris, afin de mettre en place des cocultures mono-espèce.
- Le choix d'un modèle « plus économique » en termes de coût tout en gardant en mémoire les biais inhérents à ce modèle.

II.2.3. Pré-Ostéoblastes murins : MC3T3-E1 Sous-clone 14

La composante ostéoblastique a été modélisée en utilisant le sous-clone 14 de la lignée pré-ostéoblastique murine MC3T3-E1 (ATCC® CRL2594™). La lignée MC3T3-E1 est issue de la calvaria de souris nouveau-nés de souche C57BL/6 âgés de 1 jour (267). A partir de cette lignée hétérogène, différents clones naturels ont été isolés en fonction de leurs capacités de minéralisation. Parmi ces clones le sous-clone 14, isolé par Wang D. et al (268), présente une capacité accrue de minéralisation et de phénotype proche d'ostéoblastes de calvaria primaires. Ces pré-ostéoblastes ont une activité de l'ALP et une expression de l'OCN augmentées en présence de VEGF (153). Dans ce travail, les cellules ont été utilisées entre les passages 3 et 12.

II.2.4. Conditions de culture cellulaire

Les lignées cellulaires sont appelées de manière générale « C166 » ou « MC3T3-E1 sous-clone 14 » ou « MC3T3-E1-Sc14 » sans mention préalable du terme « cellules ». Les manipulations sont réalisées sous l'enceinte stérile d'un poste de sécurité microbiologique.

Les C166 sont cultivées en milieu de formulation « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, 580 mg/L de L-glutamine, sans pyruvate (41965 ThermoFisher scientific). Ce milieu est complété avec 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF, 10270, ThermoFisher scientific), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (BP2959, Fisher scientific). Ce milieu est par la suite appelé cDMEM.

Les MC3T3-E1 sous-clone 14 sont cultivées en « Minimum Essential Medium Eagle » formulation Alpha (MEM-α) sans acide ascorbique (A10490 ThermoFisher scientific), complété

²¹ Tumeurs bénignes causées par une prolifération excessive des cellules endothéliales

avec 10% v/v de SVF (10270, ThermoFisher scientifique), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (BP2959, Fisher scientifique). Ce milieu est par la suite appelé cMEM-α.

Les milieux contenant le SVF et le cocktail d'antibiotiques sont appelés de manière générale milieux complets.

Les cellules sont cultivées en routine dans des flasques (83.3910 ou 83.3911, Sarstedt), à une densité d'ensemencement de 6500 cellules/cm² pour les C166 et de 12500 cellules/cm² pour les MC3T3-E1 sc14. Les milieux sont changés tous les trois jours. Les cellules sont décollées lorsque le tapis cellulaire occupe 80 à 85% de la surface de culture. Pour ce faire, les cellules sont rincées une fois en PBS 1X, le tapis cellulaire est recouvert de TrypLE™²² 1X (12563, ThermoFisher scientifique) pendant 5 min (MC3T3-E1 sc14) ou 10 min (C166) à 37°C. L'action du TrypLE est stoppée par ajout d'un volume équivalent de milieu complet. Les suspensions cellulaires sont centrifugées pendant 5 min à 300 g puis le culot cellulaire est remis en suspension en milieu complet. Un prélèvement de cette suspension est utilisé pour compter les cellules après coloration au bleu Trypan 0,04% m/v (T6146, Sigma-Aldrich) sur un hématimètre de Malassez (ROCMD, Greiner Bio-One) en utilisant un microscope optique inversé Primo Vert (Zeiss).

II.2.5. Préparation des matériaux céramiques pour la culture cellulaire

Préalablement à la culture cellulaire, les céramiques ont été emballées dans du papier d'aluminium et stérilisées à 200°C pendant 2 h sous chaleur sèche dans une étuve (Memmert) comme indiqué en fin des parties II.1.5.1 et V.2.1. Elles sont ensuite stockées dans l'enceinte stérile d'un poste de sécurité microbiologique. Une heure avant leur utilisation les pastilles de céramiques et les architectures en HA sont placées au fond de puits d'une plaque de culture cellulaire 24 puits (83.3922.005, Sarstedt) et immergés dans 1 mL ou 1,5 mL de milieu de culture complet respectivement afin qu'un équilibre chimique entre les matériaux et le milieu de culture puisse s'établir. Ce milieu est collecté et conservé à -20°C en vue d'analyses ultérieures. L'ensemencement cellulaire est ensuite réalisé sur les céramiques.

II.2.6. Ensemencement des cellules et conditions de culture

II.2.6.1. Évaluation des propriétés angiogéniques des HA substituées par le cuivre ou le silicium

Pour les analyses en imagerie et les différents dosages décrits par la suite, les cellules de la lignée C166 sont ensemencées sur des pastilles de diamètre 10 mm à une densité de 10 000 cellules/cm². Pour les analyses nécessitant d'extraire les macromolécules intracellulaires (protéines et acides nucléiques), les cellules ont été ensemencées à hauteur de 25 000 cellules/cm² à la surface de pastilles de diamètre 13 mm afin de collecter un maximum de matériel biologique. Le volume d'ensemencement est de 1 ml. Les ensemencements sont réalisés en déposant délicatement la suspension à la surface des matériaux, goutte à goutte, à l'aide d'une micropipette. Les cellules sont gardées en culture en incubateur sous 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

Après 24h de culture, les matériaux céramiques supportant les cultures sont placés dans un nouveau puits contenant 1 ml de milieu de culture complet frais. Ce changement de position

²² Solution contenant des enzymes, lesquelles coupent et inactivent les protéines d'adhérence cellulaire pour permettre le décollage des cellules

permet de limiter la génération d'artefacts par les cellules ayant adhéré au plastique de culture dans le fond du puits.

Afin d'évaluer les échanges chimiques entre la surface du matériau et le milieu de culture sans rompre les équilibres chimiques installés, le choix a été fait de ne pas renouveler le milieu de culture avant 7 jours de culture. Compte-tenu de l'accumulation de déchets métaboliques, de la diminution de la disponibilité en nutriments au cours du temps, et des modifications des équilibres ioniques par évaporation, la capacité de ces milieux de 7 jours à soutenir la croissance de cellules a été évaluée en amont. Pour cela, il a été vérifié et validé que des milieux issus des cultures à 7 jours sont capables de soutenir la croissance de cellules cultivées sur plastique pendant 7 nouveaux jours et ce toujours sans changement de milieu. Pour cette vérification, des cellules C166 ont étéensemencées dans des plaques de culture selon le protocole décrit dans cette sous-partie avec des densités d'ensemencement de 25 000 cellules/cm². Du milieu ayant alimenté des C166 cultivées dans des plaques de culture pendant 7 jours, à la même densité initiale de 25 000 cellules/cm², est utilisé pour la resuspension des culots de cellules et l'ensemencement de la nouvelle plaque. La croissance et l'apparence des C166 a été contrôlée pendant 7 jours, aucune différence avec du milieu frais n'a été observée.

II.2.6.2. Développement de modèles de coculture en bioréacteur à flux pour l'évaluation des propriétés biologiques des matériaux céramiques

II.2.6.2.1. Description du bioréacteur à flux en perfusion

Le bioréacteur en flux à perfusion permet de réaliser des cultures 3D dynamiques sous flux. Il est composé d'une pompe et de lignes de culture indépendantes, et est placé dans un incubateur de culture à 37°C, 5% CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité. Chaque ligne est composée des éléments présents sur la photographie légendée de la Figure 33.

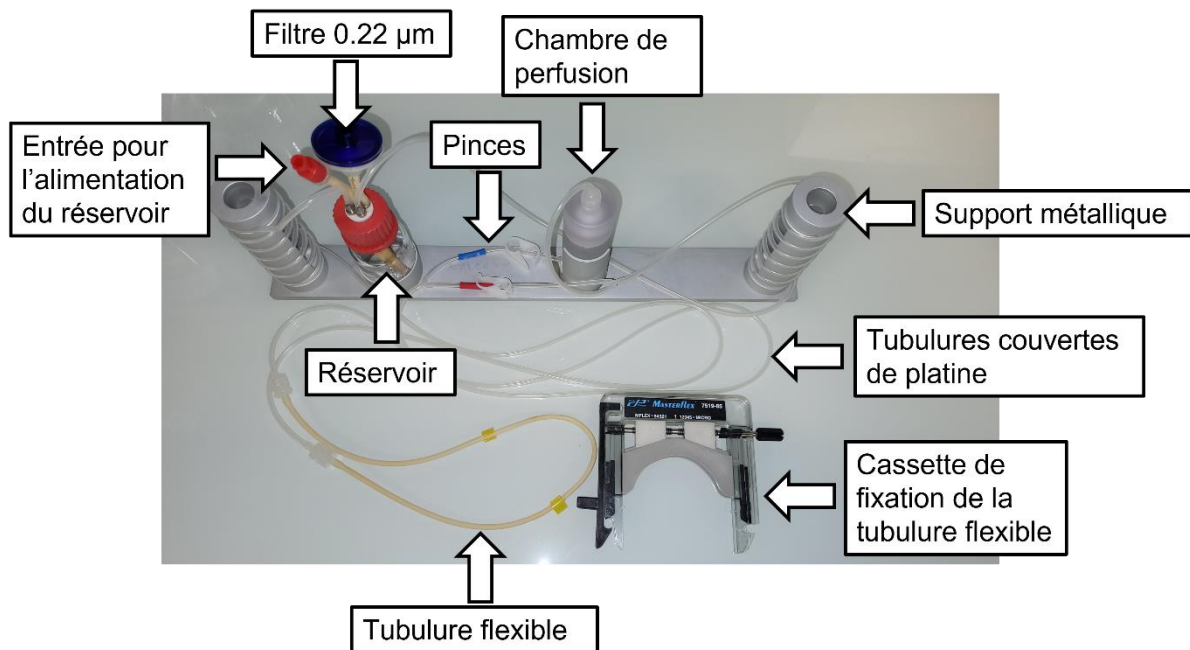


Figure 33 : Composition d'une ligne du bioréacteur à flux

Une ligne de bioréacteur (Figure 33) est composée d'un filtre stérile (Figure 33 en haut à gauche) qui maintient ouverte une entrée du réservoir, ce qui facilite les échanges gazeux du système. Le système est protégé des contaminations grâce aux pores de $0,22\ \mu\text{m}$ du filtre. L'autre sortie du réservoir sert à l'alimentation en milieu de celui-ci et aux prélèvements. Cette entrée est protégée par un bouchon de type « luer » permettant une fermeture hermétique et stérile. Les pincettes permettent de rediriger le flux de milieu de culture. La pince sur le marquage bleu coupe l'alimentation de la chambre de perfusion et celle sur le marquage rouge coupe une dérivation qui permet au milieu de ne pas passer par la chambre. Cette dernière pince est toujours fermée quand le système est en fonctionnement. Le réservoir en verre peut contenir 25 mL de milieu de culture. Le support métallique permet d'ancrer les tubulures (en silicone) recouvertes de platine (pour une action antibactérienne, (269) et poreuses aux gaz. Cette porosité permet de placer les lignes directement dans l'incubateur sans nécessiter la présence d'un système d'oxygénation. La tubulure flexible jaune est actionnée par la pompe ce qui permet de mettre le milieu de culture en mouvement. La cassette assure le maintien de la tubulure flexible sur la tête de la pompe. Le support, les héli chambres présentées dans la Figure 34, ainsi que le réservoir sont issus d'un kit commercial (SKE research equipment).

La chambre de perfusion est assemblée selon un montage présenté dans la Figure 34.

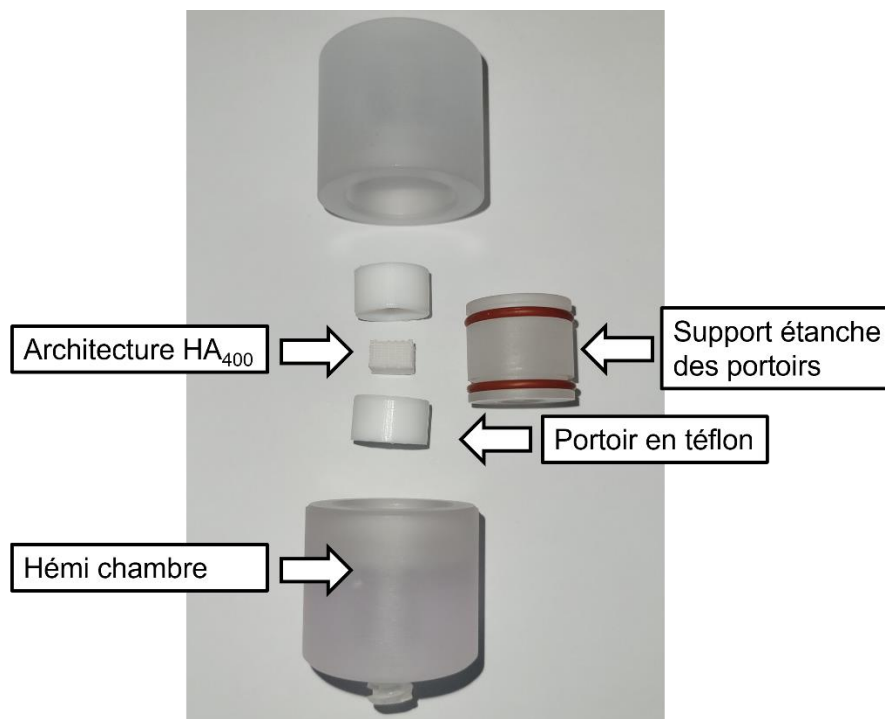


Figure 34 : Composants d'une chambre de perfusion du bioréacteur à flux

Une chambre de perfusion (Figure 34) est composée de deux hémi chambres se refermant sur un support qui assure l'étanchéité à l'aide de joints. Ce support accueille des portoirs en téflon qui se positionnent autour de l'architecture céramique et la maintiennent dans une position constante face au flux.

La circulation du milieu de culture est assurée par une pompe péristaltique (MasterFlex® L/S®, Cole-Parmer) avec un modèle de tête de pompe rotative (7519-25, Cole-Parmer) réglée à un débit de 1 mL/min. L'ensemble du système est placé au sein d'un incubateur (Heracell™ VIOS 160i, Thermo scientific) permettant de maintenir une température de 37°C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂.

II.2.6.2.2. Mise en place des cultures en bioréacteur

Avant la mise en place de la culture, 25 ml de milieu de culture complet sont placés dans le flacon réservoir de chaque ligne. Ces lignes sont placées dans l'incubateur et reliées à la pompe péristaltique afin d'amorcer la circulation du milieu de culture pour chasser l'air et les bulles qui peuvent apparaître.

Les architectures céramiques sontensemencées goutte à goutte à la micropipette avec une suspension contenant 50 000 cellules dans un volume de milieu de culture complet de 1,5 mL. Ce volume est nécessaire pour recouvrir les architectures dans les plaques 24 puits. Les architectures de HA sontensemencées soit avec des monocultures de C166 ou de MC3T3-E1 E1 sous-clone 14 dans leurs milieux complets respectifs (cDMEM ou cMEM- α). Une condition de coculture avec un ratio de 2 cellules C166 pour 1 cellule MC3T3-E1 sous-clone 14 dans un mélange égal de milieux complets cDMEM et cMEM- α est également réalisée. Le mélange de cellules de la coculture est réalisé extemporanément à partir de suspensions cellulaires.

Les architectures avec cellules sont placées pendant 5 h dans un incubateur de culture afin de permettre aux cellules d'adhérer à la surface du matériau. Ce temps d'attente est une précaution pour garantir l'adhérence des cellules sur le matériau et de résister au flux. Il est connu que dès 1 h après l'ensemencement sur HA les cellules MC3T3-E1 E1 sous-clone 14 forment des adhérences cellulaires sur la céramique (270). L'adhérence est contrôlée en parallèle visuellement sur le plastique des puits de culture avec une transition de forme de cellules arrondies vers des cellules partiellement étalées.

Le système de bioréacteur à flux est illustré dans la Figure 35.

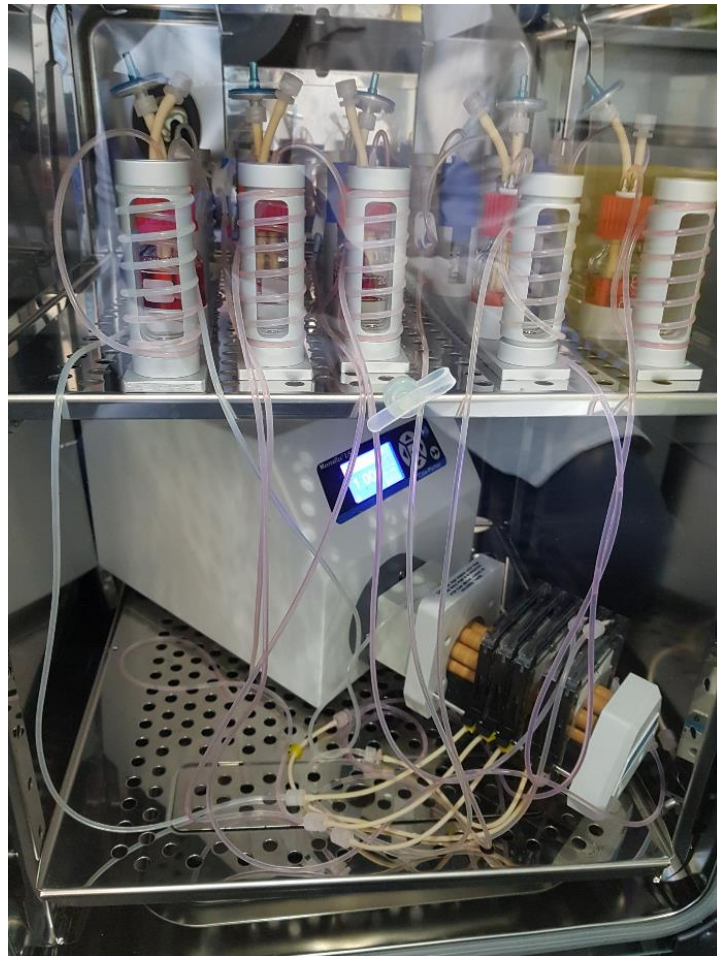


Figure 35 : Système de bioréacteur à flux en perfusion au sein de l'incubateur

Le milieu liquide dans le système en perfusion est renouvelé tous les 7 jours au niveau du réservoir. L'abondance du milieu de culture, 25 mL dans le réservoir, limite fortement l'apparition de problèmes de concentration et/ou d'appauvrissement du milieu évoqués plus haut en partie II.2.6. Malgré tout et en raison de l'existence d'un volume mort dans les tubulures d'environ 5 mL, du milieu issu de culture en bioréacteur âgé de 3 semaines, et ayant donc subi 2 renouvellements, a été contrôlé de la même façon qu'évoqué dans le paragraphe II.2.6. Ce milieu a notamment permis la croissance de C166, MC3T3-E1 sc14 ou coculture pendant 1 semaine sans renouvellement dans des puits en plastique.

II.2.7. Évaluation de la réponse des cellules endothéliales C166 aux céramiques à base d'HA substituée par le silicium ou le cuivre.

II.2.7.1. Mesure de l'activité métabolique par le test de MTT.

Le métabolisme énergétique de la cellule implique des activités oxydatives et déshydrogénases effectuées par des enzymes. En particulier, la production d'adénosine triphosphate (la molécule de transfert énergétique centrale des cellules) par les mitochondries dépend d'une réduction de co-enzymes par des déshydrogénases. Ces réactions ont notamment lieu au cours du cycle de Krebs²³ et 70% environ de l'activité déshydrogénase cellulaire provient des enzymes mitochondriales dont la succinate déshydrogénase. L'activité métabolique des cellules est mesurée en utilisant du bromure de tétrazolium bleu de thiazolye (158990010, Acros Organics) ou MTT. C'est un composé jaune clair, soluble en milieu aqueux, qui une fois réduit par les déshydrogénases en formazan, forme des cristaux intracellulaires insolubles de couleur violette. La formation de ces cristaux peut être dosée par spectrophotométrie à 584 nm après lyse des cellules et solubilisation des cristaux dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Après 24 h, 48 h, 72 h et 96 h de culture des C166 à la surface des matériaux ou 72 h de culture de C166 dans des plaques 96 puits (83.1835, Sarstedt) en présence de milieux conditionnés par les céramiques (procédé détaillé en partie II.2.7.10), le milieu de culture est retiré et remplacé par une solution à 37°C de cDMEM contenant 0,5 mg/mL de MTT. Les cellules sont incubées avec le MTT pendant 90 min à 37°C. Le surnageant est retiré et 150 µL de DMSO (D5879, Sigma Aldrich) sont ajoutés sur les cellules. Dans le cas où les cellules sont cultivées à la surface de céramiques, les pastilles sont retournées dans les puits. La plaque est placée pendant 30 min sous agitation à 150 tr/min à l'abri de la lumière. La solution résultante est transférée en triplicat technique de 50 µL dans une plaque 96 puits (83.1835, Sarstedt) et la densité optique est mesurée à 584 nm à l'aide d'un lecteur de plaque fluorimètre (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH). Un blanc est réalisé à l'aide de DMSO et la spécificité du signal est assurée par l'utilisation d'un contrôle négatif. Celui-ci est réalisé dans des puits contenant des cellules traitées à 0,12 vol d'H₂O₂ pendant 24 h ce qui assure une mortalité cellulaire de 100%. La densité optique des différentes conditions est comparée à celle obtenue pour des C166 cultivées sur le matériau de référence constitué d'HA pure.

II.2.7.2. Mesure de la mortalité cellulaire par marquage nucléaire à l'iodure de propidium (IP)

La mortalité des cellules est mesurée en utilisant l'iodure de propidium (IP) comme sonde fluorescente nucléaire. L'IP est une molécule intercalante de l'ADN qui ne peut pas pénétrer dans les cellules vivantes du fait de l'intégrité de leur membrane plasmique. Au cours des processus de mort cellulaires par nécrose ou par apoptose (phases tardives), les membranes cellulaires sont altérées et deviennent perméables. L'IP permet donc de marquer les cellules en état d'apoptose tardive ou de nécrose (271). Après 24 h, 96 h ou 168 h de culture, une solution d'IP à 3 µM (81845, Sigma-Aldrich) dans du cDMEM à 37°C est ajoutée pendant 20 min, puis le milieu est retiré. Les cellules sont rincées deux fois en cDMEM et trois fois en PBS 1X. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA, 47608, Sigma Life science) 4% m/v en PBS 1X pendant 10 min puis rincées trois fois pendant 5 min en PBS 1X.

²³ Cycle central du métabolisme dans lequel l'énergie des glucides, lipides et acides aminés est récupérée.

Un contre-marquage nucléaire est réalisé avec 20 μM d'Hoechst 33342 (62249, ThermoScientific) en PBS 1X pendant 5 min à température ambiante. Un contre-marquage est un marquage visant à rendre visible ou augmenter le contraste d'une zone d'intérêt pour faciliter l'observation, ou permettre, la localisation d'un autre marquage. Ici, le Hoechst permet de visualiser l'ADN et donc par extension les noyaux. Le marquage IP permet alors de compter le ratio de noyaux positifs c'est à dire le ratio de cellules mourantes. Après ce contre-marquage les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X. Les marquages sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager M2, Zeiss).

II.2.7.3. Mesure de la viabilité cellulaire par marquage à la calcéine

La viabilité cellulaire est mesurée à 24 h, 48 h, 72 h et 96 h de culture à l'aide d'une calcéine modifiée, une molécule fluorescente qui porte un groupement ester acétoxyméthyle inhibant sa fluorescence. Cette calcéine modifiée peut rentrer librement dans les cellules en diffusant à travers les membranes plasmiques. Une fois dans cet environnement le groupement acétotoxyméthyle est retiré par les estérases intracellulaires et la fluorescence de la calcéine est restaurée. Les estérases étant inactivées dans les cellules mortes la fluorescence de la calcéine y reste inhibée et ces cellules apparaissent non fluorescentes. La molécule utilisée dans cette thèse est la calcéine Red Orange (C34851, ThermoFisher scientific) qui est intrinsèquement fluorescente et émet de la fluorescence à 590 nm. Elle est également excitable avec une excitation maximale à 577 nm. 15 min avant la fin du temps de culture, la moitié du volume des puits de culture est remplacé par une solution de calcéine 2X à 12 μM préparée dans du cDMEM à 37°C. Les cellules sont rincées 2 fois en cDMEM et 3 fois en PBS 1X. Les cellules sont fixées au PFA 4% m/v en PBS 1X pendant 10 min puis rincées 3 fois pendant 5 min en PBS 1X. Un contre-marquage nucléaire est réalisé avec 20 μM d'Hoechst 33342 en PBS 1X pendant 5 min à température ambiante et les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X. Les marquages sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager M2).

II.2.7.4. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation du 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)

Le taux de prolifération cellulaire est mesuré en ajoutant du 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) dans des cultures cellulaires. L'EdU est un analogue de la thymidine, une des quatre bases constituant l'ADN, il peut être utilisé par les cellules quand elles répliquent leur ADN au cours de la division cellulaire par mitose (phase S). L'EdU incorporé dans l'ADN peut accepter la greffe covalente d'un azide fluorescent par une réaction dite de « chimie click », après fixation et perméabilisation des cellules. Les noyaux des cellules entrées en phase S au cours de la période d'incubation avec l'EdU seront visualisés en microscopie à fluorescence.

Après 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h de culture une solution d'EdU (C10337, ThermoFisher scientific) à 10 μM est préparée dans du cDMEM à 37°C. Cette solution est ajoutée pendant 45 min puis les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X puis fixées par immersion en PFA 4% m/v en PBS 1X pendant 10 min. Enfin, elles sont rincées 3 fois pendant 5 min en PBS 1X. Pour éliminer le cuivre en solution présent dans les conditions Cu_xHA , les pastilles avec les cellules sont immergées dans une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA^{24} , 409971000, Acros Organics) à 1 M en PBS 1X pendant 5 min. Elles sont ensuite placées pendant 10 min dans une solution de Tris 100 mM à pH 7,5 (A4263, AppliChem). Les cellules sont ensuite

²⁴ L'EDTA est un chélateur des cations divalents.

perméabilisées pendant 15 min dans une solution de Triton X-100 (AAA16046AP Fisher scientific) à 0,5% v/v en PBS 1X et les cellules sont rincées 2 fois pendant 5 min en PBS 1X. Elles sont ensuite rincées 1 fois dans une solution de PBS 1X contenant 100 mM d'EDTA pendant 5 min pour s'assurer de l'absence de cuivre en solution. Le mélange réactionnel de chimie click contenant 2 mM CuSO₄ (61230 Sigma-Aldrich), 5 µM azide AlexaFluor 488 (760765, Sigma-Aldrich) et 100 mM d'acide ascorbique (A3604, AppliChem) est préparé extemporanément en H₂O DI par ajout des différents éléments dans l'ordre écrit. Ce mélange est déposé sur les cellules pendant 30 min dans le noir à température ambiante. Après 3 rinçages pendant 5 min en PBS 1X, un contremarquage nucléaire est réalisé à l'aide d'une solution de Hoechst 33342 à 20 µM dans du PBS 1X pendant 5 min. Les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X puis observées au microscope à épifluorescence (Axio Imager M2). Pour chaque échantillon, au minimum 5 champs au grossissement final X100 ou 10 champs au grossissement final X400 sont photographiés grâce à une caméra (AxioCam MRm, Zeiss) couplée au microscope et à un logiciel spécialisé (Zen, Zeiss).

Les images sont analysées avec le logiciel Image J (NIH). Le taux de cellules proliférantes est calculé en rapportant le nombre de cellules au noyau marqué à l'EdU sur le nombre de cellules totales déterminé par le contremarquage nucléaire.

II.2.7.5. Évaluation de l'expression de protéines impliquées dans l'angiogenèse par Western Blot

Les niveaux d'expression de différentes protéines sont détectés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et Western Blot. Après 24 h, 48 h, 72 h, 96 h ou 168 h de culture, les cellules à la surface des matériaux sont rincées 1 fois en PBS 1X, placées dans un nouveau puits et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines.

Deux méthodes différentes d'extraction des protéines ont été suivies en fonction de la nécessité d'extraire les protéines ou les ARN et les protéines.

Dans le premier cas, 150 µL de tampon de lyse (M-PER, Thermo Scientific) supplémenté d'un cocktail inhibiteur de protéases et de phosphatases (Roche) à 4°C sont ajoutés sur les cellules pendant 15 min sur glace. Les lysats cellulaires sont ensuite soigneusement homogénéisés, transférés en tubes coniques stériles de 1,5 mL et placés dans un bain à ultrason à puissance maximale pendant 10 min pour casser les brins d'ADN. 300 µL d'éthanol absolu (20821.310, VWR) à -20°C sont ajoutés et le système est maintenu pendant au moins 24 h à -20°C afin de précipiter les protéines présentes dans les lysats cellulaires.

Dans le second cas, les protéines sont récupérées suite à la lyse des cellules réalisée au cours du protocole d'extraction des ARN à l'aide d'un kit (RNeasy® plus microkit, Qiagen) (partie II.2.7.6) d'après les instructions de (272). Les éluats issus de la fixation des ARNs présents dans le lysat cellulaire dans une colonne d'affinité par centrifugation sont récupérés dans des tubes coniques de 1,5 mL. 400 µL d'éthanol absolu à -20°C sont ajoutés et les tubes sont placés à -20°C pendant au moins 24 h (272).

Dans les deux cas, le contenu des tubes à -20°C est centrifugé à 20 000g pendant 20 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse (MF 20-R, Awel™ centrifugation) munie d'un rotor adapté aux tubes (AMF20-24, Awel™ centrifugation). Le surnageant est jeté et le culot est lavé 3 fois par ajout d'un volume d'éthanol absolu à -20°C suivi d'une centrifugation à 20 000g pendant 20 min à 4°C, le surnageant étant ensuite éliminé. Après le dernier lavage, l'éthanol est

soigneusement éliminé puis le culot de protéines est séché en laissant le tube ouvert pendant au minimum 10 min à 37°C en chaleur sèche.

Les culots protéiques sont resuspendus dans 25 µL de tampon de Laemmli 1X (ou tampon d'échantillon, Laemmli, 1970, 2% SDS, 10% glycérol et 60 mM Tris pH 6,8). La concentration des protéines est ensuite déterminée par spectrophotométrie UV à l'aide d'un spectrophotomètre à micro-volume (SpectraMax® Quickdrop™, Molecular Devices) à 280 nm. Des mesures contrôles sont réalisées à 260 nm qui permettent d'estimer la présence d'ADN contaminant et à 320 nm qui permettent de mesurer le bruit de fond, avec une forte sensibilité aux concentrations en sels. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 5% de β-mercaptoéthanol (A1108, AppliChem) et 0,002% de bleu de bromophénol (B0126, Sigma Aldrich) est ajouté pour visualiser les échantillons lors des dépôts. Les extraits traités sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5 min.

Entre 15 µg et 50 µg de protéines (masse identique entre les échantillons d'une même expérience), ou 5 µl d'un mélange de marqueurs de poids moléculaire Precision Plus Protein™ WesternCTM (1610376, Bio-Rad), ou Full Range Rainbow™ RPN800E (Cytiva) sont chargés dans les puits de gels d'acrylamide (Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-Rad) en gradient de concentration de 4-15% ou de concentration de 10% (Biorad). Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par migration électrophorétique SDS-PAGE dans un tampon Tris-Glycine-SDS (TGS, Biorad) dans une cuve d'électrophorèse (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) alimentée par un générateur (PowerPac™ Basic, Bio-Rad) à 110 V. La migration est arrêtée quand le front de migration, visible grâce au bleu de bromophénol, arrive à l'extrémité opposée du gel. Les protéines sont transférées par électrophorèse dans un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot® Turbo™, Biorad) sur des membranes de PVDF d'une porosité de 2 µm (Immun-Blot® PVDF, Bio-Rad) préalablement régénérées en éthanol absolu, entre des couches de papier absorbant (Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, PVDF, 1704273, Bio-Rad).

Les membranes sont lavées sous agitation 3 fois pendant 5 min dans un tampon Tris salin 1X (TBS 1X) contenant 20 mM de Tris Base (BP152, Fisher scientifique), 4 g de NaCl (A1149, AppliChem) et à un pH ajusté à 7,6 à l'aide d'HCl 1N (Sigma Aldrich). Les sites de liaisons protéiques aspécifiques sont ensuite saturés en recouvrant les membranes de TBS 1X contenant 0,05% v/v Tween-20 (BP337, Fisher scientifique) (TBS-T 1X), et 5% m/v de protéines de lait (poudre de lait écrémé, Régilait) pendant au moins 30 min sous agitation à température ambiante. L'hybridation avec les anticorps primaires est réalisée dans le même mélange à 4°C sur la nuit dans un système de chambre humique statique où le milieu contenant l'anticorps est maintenu sur la membrane à l'aide d'un parafilm (Millipore). La nature et les concentrations des anticorps utilisés sont indiquées dans le Tableau 5. Les membranes sont lavées à température ambiante 3 fois pendant 5 min sous agitation en TBS-T 1X puis 1 fois en TBS 1X pendant 5 min. Elles sont ensuite hybridées avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP : Horse raddish peroxidase) en TBS 1X sous agitation pendant 1 h à température ambiante aux concentrations renseignées dans le Tableau 6.

La détection des protéines se fait à l'aide de kits de substrat chimioluminescents (SuperSignal™ West Pico PLUS, ou SuperSignal™ West Atto, ThermoFisher scientifique) selon les instructions du fabricant. Les réactifs du kit sont mélangés selon les recommandations du fabricant et 1 mL du mélange est déposé sur la membrane. La détection du signal luminescent est réalisée à l'aide d'un système d'imagerie couplé à une caméra (Fusion FX, Vilber) permettant l'acquisition du résultat.

Les anticorps liés aux protéines sur la membrane sont éliminés (déshybridation) à l'aide d'une solution contenant 1,5% m/v de glycine (A13816, ThermoFisher scientific), 1% v/v de Tween 20 et 0,1% m/v de dodécylsulfate de sodium (SDS, L6026, Sigma-Aldrich) au pH ajusté à 2,2 à l'HCl. Cette solution est appliquée 2 fois pendant 15 min à 50°C sous agitation puis les membranes sont lavées 3 fois en TBS-T 1X avant de pouvoir saturer à nouveau les sites aspécifiques pour de nouvelles hybridations sur les membranes.

A partir des images obtenues, l'expression relative des protéines est déterminée par densitométrie en utilisant le logiciel ImageJ et ses fonctions intégrées. Pour une condition donnée le niveau d'expression relatif des protéines d'intérêt est normalisé sur celui de la GAPDH qui est utilisée comme protéine de ménage²⁵.

II.2.7.6. Expression des gènes associés à l'angiogenèse par RT-qPCR.

Les niveaux d'expression de différents ARN messagers (ARNm) sont mesurés et comparés par la technique de la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction) après avoir été convertis en ADN complémentaire (ADNc) par rétrotranscription (RT). La conversion d'ARNm en ADNc est réalisée par l'intermédiaire d'une enzyme spécifique, la reverse transcriptase. Cet ADNc est amplifié au cours d'une réaction de PCR particulière car elle est réalisée en présence de sondes fluorescentes libérées à chaque amplification. L'émission de fluorescence est quantifiée par un appareil de qPCR (AriaMx Real-time PCR System, Agilent) et croît de manière exponentielle au cours des cycles d'amplification. La mesure de la fluorescence permet de remonter à la quantité d'ADNc initiale en comparaison avec une condition de référence.

Un brin d'ADN est doublé à chaque cycle ce qui entraîne une croissance exponentielle du nombre de brins et de l'intensité de fluorescence. Le cycle où le signal dépasse un seuil prédéfini détermine le cycle seuil (Ct, Cycle threshold). Il est donc dépendant de la quantité initiale d'ARNm, plus le nombre de copies initiales est important plus le Ct sera faible.

Après 24 h, 96 h ou 168 h de culture, les cellules sont rincées 1 fois en PBS 1X. Le matériau est changé de puits et elles sont conservées à -80°C jusqu'à l'extraction des ARNm. L'extraction des ARN est réalisée sur glace à l'aide d'un kit (RNeasy® Micro Kit, Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les centrifugations sont réalisées à l'aide d'une centrifugeuse (MF 20-R) munie d'un rotor à tubes coniques de 1,5 mL (AMF20-24). Après la première centrifugation, le surnageant contenant une partie des protéines est conservé pour leur précipitation en éthanol, comme indiqué dans la partie II.2.7.5. L'élution est faite par ajout de 14 µL d'eau pure sans RNase puis en centrifugeant le tube à 20 000 g pendant 2 min. Le volume mort de la colonne étant de 2 µL, les ARN sont contenus dans un volume final de 12 µL. Le dosage des ARN est fait par spectrophotométrie UV à 260 nm. Des mesures de contrôle sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre à micro-volume (SpectraMax® Quickdrop™) dans un volume d'1 µL. Les mesures sont faites à 230 nm pour estimer la contamination éventuelle par des molécules organiques, à 280 nm pour estimer la contamination par des protéines et à 320 nm pour mesurer le bruit de fond et les concentrations en sels.

La rétrotranscription est réalisée à l'aide d'un kit (High-Capacity RNA-to-cDNA, ThermoFisher scientific). D'après les instructions du fabricant, le mélange réactionnel est préparé en ajoutant un volume de 1 µL d'enzyme Reverse Transcriptase à 9 µL de tampon. Ensuite, 1 µg d'ARN

²⁵ Une protéine de ménage est une protéine dont l'expression est stable dans les cellules quel que soit leur état physiologique.

est ajouté et le volume du mélange réactionnel est complété à 20 μL avec de l'eau pure sans RNase. La réaction se fait selon le cycle thermique suivant : 1 h à 37°C puis 5 min à 95°C et conservation de produit de RT à 4°C. Ce cycle est réalisé à l'aide d'un thermocycleur (T100™, Bio-Rad). Les ADN obtenus sont stockés à -20°C avant utilisation.

La PCR quantitative est réalisée en plaque 96 puits (Multiply® 72.1981, Sarstedt). Le mélange réactionnel est préparé sur glace. Pour ce faire, un mélange comprenant pour chaque échantillon 5 μL de « Master Mix » (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, ThermoFisher scientific) comprenant l'enzyme, les nucléotides, les sels et le tampon, 0,5 μL d'un mélange contenant les amorces et les sondes spécifiques aux gènes analysés, sondes TaqMan™ de ThermoFisher scientific : GAPDH (Mm99999915_g1), eNOS (Mm00435217_m1) et VWF (Mm00550376_m1), et 0,5 μL d'eau pure stérile sans DNase est préparé. Ces 6 μL sont déposés dans les puits correspondants, puis 100 ng d'ADNc sont déposés pour chaque puits en utilisant 4 μL d'une solution préalablement diluée en eau de qualité biologie moléculaire, de manière à obtenir une concentration finale en ADNc de 25 ng/ μL . Une fois ces mélanges effectués, la plaque est scellée à l'aide d'un film optique (95.1994 Sarstedt) puis brièvement centrifugée grâce à la centrifugeuse (MF 20-R) munie d'un rotor à plaque (SL3.-MTP). La plaque est ensuite placée dans un thermocycleur quantitatif (AriaMx Real-time PCR System) qui réalise le cyclage thermique et mesure la fluorescence dans les puits. Le cycle thermique utilisé pour l'amplification est le suivant : 95°C pendant 1 min suivi de 45 cycles de : 95°C pendant 3 s puis 60°C pendant 30 s.

Les résultats sont analysés à l'aide d'un logiciel intégré au thermocycleur quantitatif (AriaMX, Agilent) pour déterminer les Ct. La méthode des $\Delta\Delta\text{Ct}$ est utilisée pour comparer l'expression relative des différents marqueurs par rapport au contrôle interne. D'après cette méthode le Ct du gène de ménage, ici le gène de la *GAPDH* est soustrait au Ct du gène d'intérêt ce qui permet d'obtenir le ΔCt . Ensuite le ΔCt du marqueur de la condition de référence (ici : le matériau céramique HA) est soustrait au ΔCt du marqueur de la condition test et la valeur résultante est le $\Delta\Delta\text{Ct}$. Cette valeur est ensuite utilisée selon la formule $\text{RQ} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ pour obtenir l'expression relative car l'amplification est considérée comme efficace à 100% résultant en un doublement de la population à chaque cycle.

II.2.7.7. Détection par immunofluorescence et observation *in situ* de protéines liées à l'angiogenèse.

Après 24 h, 48 h, 72 h, 96 h ou 168 h de culture, les cellules sont rincées 1 fois en PBS 1X puis fixées par recouvrement avec une solution de PFA 4% m/v en PBS 1X pendant 10 min. Selon la localisation du marqueur cellulaire, membranaire, cytoplasmique ou nucléaire, les cellules sont perméabilisées par immersion dans une solution à 0,05% v/v de Triton X-100 en PBS 1X pendant 5 min, une solution à 0,5% v/v de Triton X-100 en PBS 1X pendant 5 min ou une solution à 0,5% v/v de Triton X-100 en PBS 1X pendant 15 min respectivement et à température ambiante. Les sites antigéniques aspécifiques sont saturés par immersion dans une solution à 3% m/v d'Albumine Sérique Bovine (BSA, 268131000, Acros Organics) en PBS 1X pendant au moins 30 min à température ambiante. Les cellules sont immergées dans des solutions contenant les anticorps primaires en vue de leur hybridation avec les protéines d'intérêt (Tableau 5) diluées en PBS 1X contenant 3% m/v de BSA pendant 1 h à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, les anticorps primaires sont hybridés avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (Tableau 7) en PBS 1X pendant 45 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X.

Un contremarquage nucléaire est réalisé avec 20 µM d'Hoechst 33342 en PBS 1X pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X. Les marquages sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager M2).

II.2.7.8. Détection par imagerie de fluorescence et observation *in situ* du cytosquelette d'actine

Après 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h de culture, les cellules sont rincées une fois en PBS 1X puis fixées par recouvrement avec une solution de PFA 4% m/v en PBS 1X pendant 10 min. Les cellules sont perméabilisées par immersion dans une solution 0,5% v/v de Triton X-100 en PBS 1X pendant 5 min. Des sites antigéniques sont recherchés en parallèle de cette expérience, par conséquent, les sites antigéniques aspécifiques sont saturés par immersion dans une solution à 3% m/v de BSA en PBS 1X pendant au moins 30 min à température ambiante. L'actine filamentaire est marquée à l'aide de la molécule phalloïdine « CruzFluor™ 488 Conjugate » au 1/1000 dans une solution de 3% m/v BSA en PBS 1X (sc-363791, Santa Cruz Biotechnology) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X les anticorps primaires sont hybridés avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (Tableau 7) en PBS 1X pendant 45 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X. Un contremarquage nucléaire est réalisé avec 20 µM d'Hoechst 33342 en PBS 1X pendant 5 min à température ambiante et les cellules sont rincées 3 fois en PBS 1X. La phalloïdine et l'immunomarquage concomitant sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager M2).

II.2.7.9. Mesures de la sécrétion de VEGF164

Le dosage de VEGF164 sécrété par les cellules C166 est réalisé dans les milieux de culture des pastilles après 4 jours et 7 jours sans concentration du milieu.

Le dosage ELISA (technique d'immunoabsorption par enzyme liée) du VEGF est réalisé avec un kit (Mini TMB EDK Human VEGF, 900-TM10, Peprotech) dans des plaques 96 puits (« medium binding », 82.1581.100, Sarstedt) selon les instructions du fabricant. La révélation est réalisée pendant 20 min à température ambiante à l'aide du substrat chromogène de l'enzyme HRP (« 1-Step ULTRA TMB-ELISA », 34028, ThermoFisher scientific). Suite à cette incubation une coloration proportionnelle à la quantité de VEGF164 apparaît dans les puits contenant du VEGF164. La réaction, enzymatique est alors arrêtée avec un ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique HCL à 1 M.

La coloration observée est mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de plaque fluorimètre (FLUOstar OPTIMA) à 450 nm avec une correction à 595 nm et la concentration en VEGF164 des échantillons est calculée par régression linéaire à partir des valeurs mesurées pour la gamme étalon en tenant compte du facteur de dilution des échantillons.

II.2.7.10. Évaluation de l'activité cellulaire par Wound Healing assay.

Des pastilles φ10 sont immergées pendant 96 h dans 1 mL de DMEM complet qui est ensuite collecté, ce milieu est par la suite appelé milieu conditionné. Des cellules C166 sontensemencées dans les puits d'une plaque 96 puits (Sarstedt) à 12500 cellules/cm² de manière à obtenir un tapis cellulaire à confluence après 48 h. Sur ce tapis cellulaire une blessure linéaire est réalisée à l'aide d'un « Woundmaker Tool » (4563, Sartorius) et le milieu de culture est remplacé par 100 µL de milieu conditionné, 30 µM ou 300 µM de CuSO₄ (61230, Sigma-Aldrich) en cDMEM complet, ou du cDMEM complet seul. Les mêmes conditions ont été

réalisées en présence de 50 μM d'acide ascorbique (A3604, AppliChem). Ces conditions sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Conditions du Wound Healing assay

| |
|---|
| DMEM complet conditionné 96 h par HA $\phi 10$ |
| DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| 30 μM CuSO_4 en DMEM complet |
| 300 μM CuSO_4 en DMEM complet |
| DMEM complet |
| 50 μM acide ascorbique en DMEM complet conditionné 96 h par HA $\phi 10$ |
| 50 μM acide ascorbique en DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| 50 μM acide ascorbique en DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| 50 μM acide ascorbique en DMEM complet conditionné 96 h par $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ $\phi 10$ |
| 50 μM acide ascorbique et 30 μM CuSO_4 en DMEM complet |
| 50 μM acide ascorbique et 300 μM CuSO_4 en DMEM complet |
| 50 μM acide ascorbique en DMEM complet |

La plaque est positionnée dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO_2 et avec une atmosphère saturée en humidité sur un système d'imagerie optique automatisée (Incucyte®, Sartorius) afin de monitorer la fermeture de la blessure sur une durée totale de 60 h avec l'acquisition de 2 images par puits toutes les heures.

Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel interne au système Incucyte® pour déterminer à chaque temps le pourcentage de fermeture de la blessure et la taille de la blessure.

II.2.7.11. Dosage des espèces radicalaires intracellulaires par test au diacétate de dichlorodihydrofluorescéine (H_2DCFDA)

Pour doser la génération d'espèces radicalaires intracellulaires dans les différentes conditions testées, un kit DCFDA / H_2DCFDA (ab113851, Abcam) a été utilisé. Le DCFDA est une molécule fluorescente qui diffuse dans les cellules où les estérases intracellulaires clivent les acétates donnant un composé non fluorescent H_2DCF . Ce composé peut être oxydé par les espèces radicalaires pour donner de la 2', 7' dichlorodihydrofluorescéine (DCF) fluorescente. Pour utiliser ce kit, l'absence de rouge de phénol dans le milieu de culture est

essentielle car celui-ci fait obstacle à la réaction du kit. Le kit requiert l'utilisation d'un tampon de composition non détaillée et appelé tampon 1X.

Des cellules C166 sont cultivées préalablement en DMEM complet sans rouge de phénol, sans pyruvate, sans L-Glutamine et avec 4,5 g/L de glucose (31053, ThermoFisher scientific) supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine (25030, ThermoFisher scientific). Les C166 sont ensemencées en plaque 96 puits (Sarstedt) à 12 500 cellules/cm² pendant 24 h avant l'expérience. Au moment de l'expérience les cellules sont rincées avec 100 µL de tampon 1X. 100 µL d'une solution de H₂DCFDA à 20 µM en tampon 1X sont ajoutés pendant 45 min et les cellules sont incubées dans un incubateur de culture à 37°C, 5 % CO₂ avec une atmosphère saturée en humidité. Pour cette incubation, la plaque est préalablement entourée d'une feuille d'aluminium pour maintenir les cellules dans le noir. Après les 45 min d'incubation les cellules sont rincées avec 100 µL de tampon 1X puis 100µL de différentes conditions en cDMEM sans rouge phénol sont ajoutés sur les cellules. Ces conditions sont les mêmes que celles du Tableau 4 précédent.

Les milieux conditionnés le sont d'après la méthode décrite dans la partie II.2.7.10. Des contrôles sont réalisés : des cellules sans DCFDA et avec cDMEM sans rouge phénol, du cDMEM sans rouge phénol sans cellule et des contrôles positifs utilisant la molécule hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP) à 200 µM et 400 µM en cDMEM sans rouge phénol. Les plaques sont maintenues dans le noir dans l'incubateur de culture à 37°C, 5 % CO₂ avec une atmosphère saturée en humidité. Les mesures de fluorescence sont ensuite réalisées à 4 h et à 24 h à l'aide d'un lecteur de plaque fluorimètre (FLUOstar OPTIMA) configuré à une longueur d'onde d'excitation à 485 nm et la détection d'une longueur d'onde d'émission à 520 nm.

II.2.8. Analyse de la colonisation des architectures céramiques 3D en HA après monocultures et cocultures dans un système en perfusion dynamique.

II.2.8.1. Mesures de la sécrétion de VEGF164

Le dosage de VEGF164 sécrété par les cellules C166 et les cocultures 2 C166 :1 MC3T3-E1 Sc14 est réalisé dans les milieux de culture après 7, 14 et 21 jours. Les milieux sont préalablement concentrés à l'aide de filtres à centrifuger (Amicon® (Ultra-4 Ultracel® - 10K, UFC801024, Meck Milipore) permettant de retenir les protéines de plus de 10 kDa. Pour cela 4 mL du milieu à analyser est placé dans le filtre et centrifugé à 4000 g 40 min dans une centrifugeuse (MF 20-R) munie d'un rotor à tube conique (SL-200). Le milieu récupéré est pesé pour connaître le facteur de dilution après prise en compte du facteur de rétention moyen du filtre. Ces milieux concentrés sont ensuite traités selon la méthode renseignée dans la partie II.2.7.9.

La coloration observée est mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de plaque fluorimètre (FLUOstar OPTIMA) à 450 nm avec une correction à 595 nm et la concentration en VEGF164 des échantillons est calculée par régression linéaire à partir des valeurs mesurées pour la gamme étalon en tenant compte du facteur de dilution des échantillons.

II.2.8.2. Observations du matériel biologique au sein des architectures céramiques en HA par inclusion en résine de poly méthyl méthacrylate (PMMA) et coloration histologique.

Après 7 jours, 14 jours ou 21 jours de culture les architectures sont rincées 3 fois en PBS 1X. Elles sont fixées à l'aide de PFA 4% m/v en PBS 1X pendant 15 min et lavées 3 fois

durant 5 min au PBS 1X. Les pièces sont ensuite placées dans un pilulier en verre puis immergées dans des bains successifs avec des étapes de dégazage réalisées sous sorbonne à l'aide d'une pompe à vide. La première étape est une déshydratation de l'échantillon à l'aide des bains suivants :

- éthanol 70% en H₂O DI pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- Ethanol 80% en H₂O DI pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- Ethanol 90% en H₂O DI pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- Ethanol 100% (20821.310, VWR) pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- Ethanol 100% pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.

L'imprégnation est réalisée à ce stade à l'aide des bains suivants :

- xylène 100% (28973.363, VWR) pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- Xylène 50% + Méthyl méthacrylate (MMA, 25600.296, VWR) 40% + phtalate de dibutyle (524980, Sigma-Aldrich) 10% pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- MMA 80% + phtalate de dibutyle 20% pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- (Répétition) MMA 80% + phtalate de dibutyle 20%, pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.

La polymérisation est démarrée à cette étape pour réaliser du poly méthyl méthacrylate (PMMA). Pour cela l'architecture est délicatement retirée du pilulier le temps d'ajouter séquentiellement les produits. Le benzoyle peroxyde est ajouté en premier puis le MMA et enfin le phtalate de dibutyle. La solution est mélangée par agitation au vortex à chaque étape. Quand tous les produits sont ajoutés et la solution homogénéisée l'architecture est remise en place dans le pilulier. Faire le mélange pièce par pièce permet de s'assurer de la présence des peroxydes initiateurs de la réaction dans tous les piluliers. Les bains successifs suivant cette méthode sont :

- MMA 80% + phtalate de dibutyle 20% + benzoyle peroxyde 1% (8.01641, Sigma-Aldrich), pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- MMA 80% + phtalate de dibutyle 20% + benzoyle peroxyde 2%, pendant 24 h, température ambiante, dégazage 1 h.
- MMA 80% + phtalate de dibutyle 20% + benzoyle peroxyde 2%, pendant 24 h, dégazage 2 h. Le pilulier est maintenu dans un grand volume d'eau, sauf pendant le dégazage, afin de limiter l'échauffement de la pièce en raison de la réaction exothermique de polymérisation du PMMA.

La résine de PMMA polymérise ensuite en deux semaines environ après quoi elle est extraite en brisant délicatement le pilulier. La résine est découpée à l'aide d'une scie à fil diamanté (STX 202A, MTI corporation) en lames d'environ 300 µm d'épaisseur selon une organisation présentée dans la Figure 36.

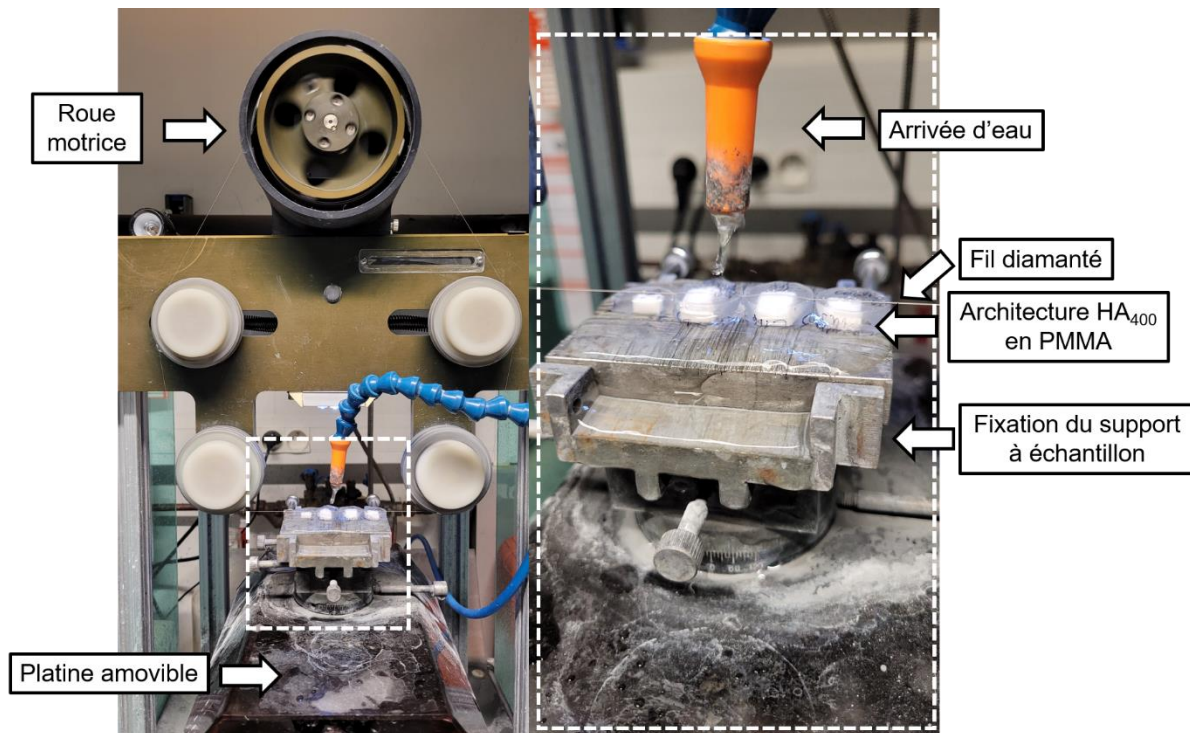


Figure 36 : Scie à fil diamanté

La platine amovible se déplace automatiquement en z selon les réglages indiqués et peut se déplacer en y manuellement pour contrôler la taille des lamelles.

Les lames de PMMA obtenues sont ensuite polies jusqu'à atteindre environ 100 μm d'épaisseur à l'aide d'une polisseuse (LaboPol-5, Struers) et de disques à grains de carbure de silicium P1000 (30-5208-010, Buelher), P2500 (30-5208-025, Buelher) et P4000 (30-5208-040, Buelher). Ces lamelles sont ensuite polies une dernière fois à l'aide d'une solution de particules d'alumine de taille comprise entre 2 μm et 3 μm (référence A, Escil) déposée sur un disque velours (Buelher). Les lamelles sont collées sur une lame en verre à l'aide d'une goutte de résine optique (Eukitt, 03989, Sigma-Aldrich) et le montage est mis à polymériser pendant 20 min à température ambiante. Elles sont ensuite marquées à l'aide de bains dans des colorations histochimiques Hématoxyline (MHS, Sigma-Aldrich) et Eosine (Eosin Y 1.09844, Sigma-Aldrich) selon les instructions du fabricant.

Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager M2). Des images en couleurs sont obtenues en l'absence de caméra dédiée grâce par modulation des intensités d'illumination à travers les filtres bleu, vert et rouge utilisés pour l'épifluorescence. Les intensités sont réglées sur un fond blanc et le réglage est validé quand les spectres bleu, vert et rouge enregistrent un signal équivalent.

II.2.9. Tableaux des anticorps utilisés lors des mesures d'expression et de localisation

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés pour l'analyse de l'expression et de la localisation de marqueurs

| Espèce, cible protéique, référence, fabricant | Dilution pour l'expression protéique | Dilution pour la localisation de marqueur |
|---|--------------------------------------|---|
| Lapin, VWF , PA5-16634, ThermoFisher scientific | 1/500 | NA |
| Lapin, MMP-9 , SAB5700152, Sigma-Aldrich | 1/1000 | 1/250 |
| Souris, PECAM-1 (CD31) , sc-376764, Santa Cruz Biotechnology | 1/500 | 1/100 |
| Souris, VEGFR2 , sc-6251, Santa Cruz Biotechnology | 1/250 | 1/200 |
| Souris, VEGF164 , 500-P10, Peprotech | NA | 1/200 |
| Souris, HIF-1α , ab113642, Abcam | 1/500 | 1/200 |
| Souris, VE-Cadhérine , sc-9989, Santa Cruz Biotechnology | 1/100 | 1/100 |
| Rat, KI 67 , 14-5698-80, Invitrogen | NA | 1/200 |

Tableau 6 : Anticorps secondaires utilisées pour l'analyse de l'expression protéique

| Espèce, réactivité, méthode de détection, référence, fabricant | Dilution |
|--|----------|
| Mouton, anti-souris IgG, HRP, NA931, Cytiva | 1/4000 |
| Chèvre, anti-lapin IgG H&L, HRP, ab6721, Abcam | 1/4000 |

Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour l'analyse de la localisation de marqueurs

| Espèce, réactivité, molécule fluorescente, référence, fabricant | Dilution |
|---|----------|
| Chèvre anti-souris IgG, AlexaFluor 488, A11012, ThermoFisher scientific | 1/1000 |
| Chèvre anti-souris IgG, Dylight 550, SA5-10173, ThermoFisher scientific | 1/1000 |
| Chèvre anti-lapin IgG, AlexaFluor 488, A-11008, ThermoFisher scientific | 1/1000 |
| Chèvre anti-lapin IgG, AlexaFluor 594, A11133, ThermoFisher scientific | 1/1000 |
| Chèvre anti-rat IgG, AlexaFluor 488, A11006, ThermoFisher scientific | 1/1000 |

II.2.10. Observations des cultures cellulaires par microscopie optique

Les cultures cellulaires sont contrôlées visuellement grâce à l'utilisation d'un microscope optique inversé (Primo Vert, Zeiss) muni d'anneaux à contraste de phase, permettant l'observation directe des cellules à la surface des flasques ou au fond des puits.

Les marquages fluorescents sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence droit (Axio Imager M2). L'acquisition des données est faite sur au moins 5 champs avec un objectif au grossissement 10X ou 10 champs avec un objectif au grossissement 40X. Chaque série d'acquisition est répétée sur 3 échantillons indépendants suivant la même procédure d'observation c'est à dire un balayage progressif de l'échantillon pour ne pas observer deux fois la même zone.

II.2.11. Analyse d'image

Toutes les images de microscopie à épifluorescence, les images des membranes de Western Blot et les observations de matériaux au MEB sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Ce logiciel est utilisé sur des images prises en microscopie à fluorescence pour extraire les informations suivantes : densités cellulaires (avec l'aide du plugin Stardist (273)) (en comptant le nombre de noyaux marqués par le Hoechst 33342), le taux de cellules proliférantes (en rapportant le nombre de noyaux marqués à l'EdU sur le nombre de noyaux marqués au Hoechst 33342) et le taux de mortalité cellulaire (en rapportant le nombre de noyaux positifs à l'IP sur le nombre de noyaux marqués au Hoechst 33342).

II.2.12. Analyses statistiques

Tous les essais entrant dans le cadre de l'évaluation biologique des matériaux ont été réalisés sur un minimum de trois expériences indépendantes pour chaque temps d'analyse. Le logiciel Prism9 (GraphPad Software, San Diego, California USA) est utilisé pour réaliser les analyses statistiques. La normalité des données est testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk avant de réaliser des tests paramétriques (Analyse de la variance, ANOVA à une ou deux voies) si elle est validée, ou non paramétriques (Kruskal-Wallis) dans le cas contraire. Les tests de comparaison multiples réalisés afin de déterminer s'il existe une différence significative entre deux conditions sont ceux de Tukey *post-hoc* suite à une ANOVA ou de Dunn *post-hoc* suite à un test de Kruskal-Wallis. Les degrés de significativité (p-value, p) sont exprimés sur les figures selon la nomenclature suivante : *: $p < 0,05$; **: $p \leq 0,005$; ***: $p \leq 0,001$. L'absence de significativité n'est pas représentée sur les figures.

Partie III. Etude *in vitro* du comportement biologique de C166 à la surface des matériaux en conditions de cultures 2D statiques

III.1. Mise en forme et caractérisations des pastilles de matériaux

Cette étude *in vitro* cherche à déterminer les propriétés biologiques d'hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium. Les paramètres physico-chimiques influençant la réponse biologique de cellules endothéliales cultivées sur ou à proximité de ces matériaux doivent être identifiés pour rationaliser le développement de futures céramiques.

Les matériaux sont mis en forme à partir des poudres synthétisées et caractérisées selon les procédures décrites dans la Partie II précédente. Celles utilisées sont considérées comme pures (monophasées et exemptes de contamination) dans la limite des systèmes d'analyse utilisés. La mise en forme par pressage uniaxial et le frittage sous air sont réalisés d'après les optimisations définies dans les travaux précédents de l'équipe (259), (159) et (158). Ces matériaux sont ensuite caractérisés chimiquement par DRX et FTIR pour contrôler la pureté de leur phase et leur composition chimique. Ils sont caractérisés physiquement par observations MEB, leur porosité est mesurée par poussée d'Archimède, leur densité est mesurée par pycnométrie, leur surface spécifique est déterminée par BET 8 points et leur rugosité est mesurée par profilométrie. Ces caractérisations physiques permettent notamment de comparer les propriétés de surfaces consécutives aux procédures d'élaboration des céramiques et qui peuvent engendrer des différences dans la réponse biologique de cellules cultivées à leur surface.

III.1.1. Frittage des pastilles

Les pastilles obtenues par pressage uniaxial selon le protocole décrit en sous-partie III.1 sont frittées selon les paramètres décrits dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres de frittage des pastilles

| Matériau | Cycle thermique (rampe montée - pallier - rampe descente) | Atmosphère | Four |
|---|--|------------|---------------------------------------|
| HA | 20°C/min - 1200°C 30 min – 20°C/min | Air | MOS-B 180/4 (Protherm Furnaces) |
| Cu _{0.1} HA et Cu _{0.5} HA | 20°C/min - 1100°C 1 h – 20°C/min | Air | MOS-B 180/4 |
| Si _{0.4} HA | 20°C/min - 1240°C 0,5 h – 20°C/min | Air | LHT04/17 (Nabertherm) |

Les pastilles frittées sont immergées en éthanol (83804.360, VWR) et nettoyées dans un bain à ultrasons réglé à la puissance maximale pendant 10 min puis séchées pendant 24 h à 100°C dans une étuve. Les poussières résiduelles à la surface des pastilles sont retirées par projection d'air comprimé. Les pièces destinées à la culture cellulaire sont ensuite préparées selon les instructions de la sous-partie II.2.5.

Dans la suite de ce texte, le terme de « matériaux » fera référence aux céramiques frittées.

III.1.2. Apparences et dimensions des pastilles

Les pastilles des matériaux HA, Cu_{0.1}HA, Cu_{0.5}HA et Si_{0.4}HA sont présentées dans la photographie légendée de la Figure 37.

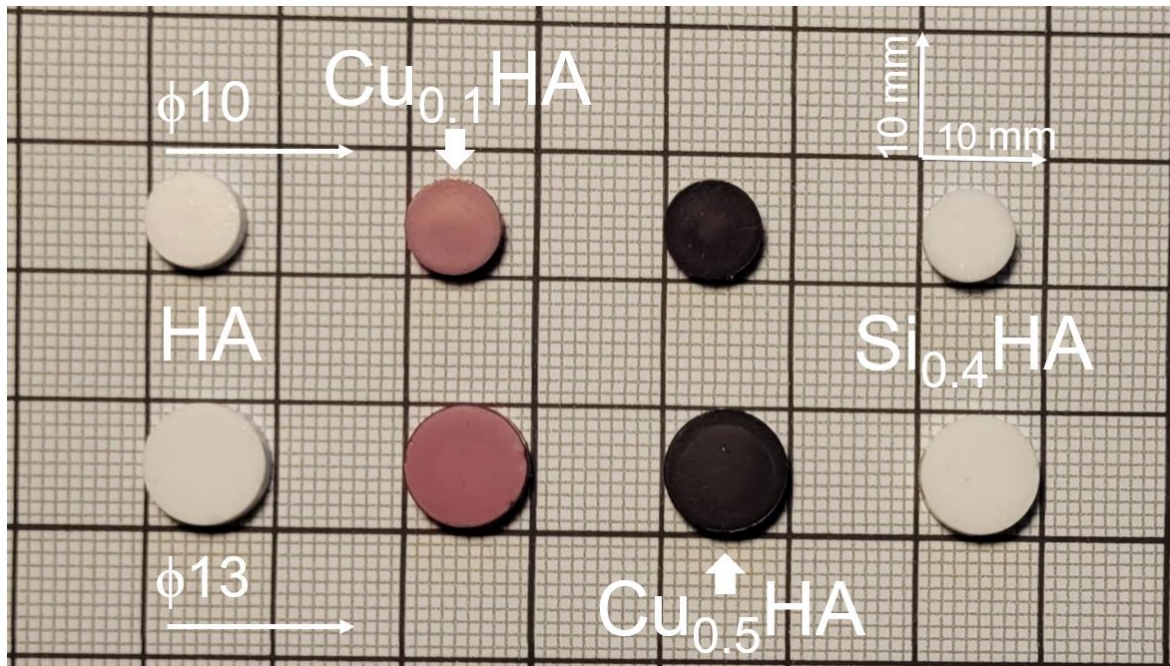


Figure 37 : Pastilles φ10 et φ13 frittées sous air selon les paramètres du Tableau 8

Les pastilles frittées ont des teintes dépendantes de leur chimie (Figure 37). Les pastilles de HA et de Si_{0.4}HA sont blanches comme attendu de l'hydroxyapatite phosphocalcique pure sans chromophore. La coloration rose de Cu_{0.1}HA s'explique par la présence du cuivre(I) dans la structure de l'apatite (158). La coloration pourpre de Cu_{0.5}HA s'explique par sa plus grande teneur en cuivre par rapport à Cu_{0.1}HA.

Les pastilles au sein de chaque classe de taille (φ10 et φ13) ont des dimensions très proches entre elles : approximativement 7,5 mm de diamètre et 2,3 mm de hauteur pour les φ10 et 9,6 mm de diamètre avec une hauteur de 2,3 mm pour les φ13.

III.1.3. Caractéristiques chimiques des matériaux

Les pastilles sont caractérisées chimiquement pour contrôler l'impact de la mise en forme et du frittage sur la pureté des phases, s'assurer de la présence des substitutions chimiques et contrôler la présence d'éventuelles contaminations.

III.1.3.1. Caractérisation chimique par DRX

Afin de caractériser les phases présentes dans les matériaux à l'issue du frittage, les pastilles obtenues sont analysées par DRX selon le principe décrit au paragraphe II.1.4.1. Le protocole suivi est celui utilisé pour l'analyse de la présence de CuO dans les poudres de CuHA. Il est ici appliqué à des pastilles frittées et entières. Les diffractogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 38.

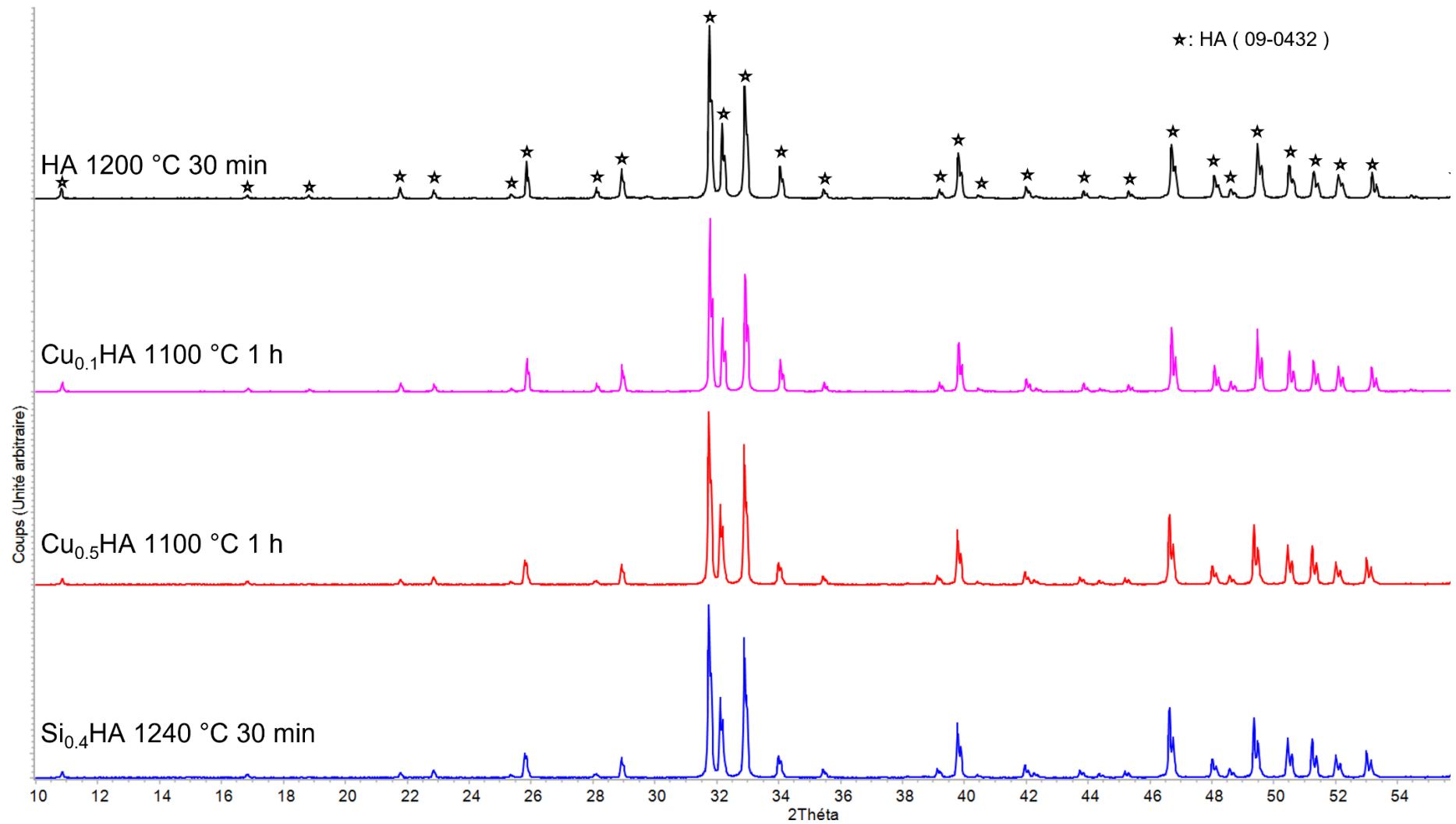


Figure 38 : Diffractogrammes des pastilles frittées sous air de HA (1200°C 30 min), Cu_{0.1}HA (1100°C 1 h), Cu_{0.5}HA (1100°C 1 h) et Si_{0.4}HA (1240°C 30 min)



Les diffractogrammes des matériaux (Figure 38) montrent que l'HA reste monophasée après frittage grâce aux paramètres thermiques optimisés précédemment au sein de l'équipe (274). Les matériaux Cu_xHA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ possèdent ces mêmes pics de diffractions de l'HA monophasée. Cela confirme que le dopant et le cycle thermique adapté (Tableau 8) n'ont pas conduits à la formation d'une seconde phase cristalline.

Le dédoublement des pics de diffractions s'explique par la sélection du doublet $\text{K}\alpha_1$ du cuivre par le détecteur de l'appareil de DRX comme décrit en partie II.1.4.1.

III.1.3.2. Caractérisation chimique par FTIR

Afin de caractériser chimiquement les pastilles frittées, leurs poudres obtenues après broyage au mortier et pilon sont caractérisés par FTIR selon le protocole décrit dans la sous-partie II.1.4.2. Les bandes vibrationnelles de l'hydroxyapatite pure (Tableau 2) sont recherchées pour tous les matériaux. Pour le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$, les bandes vibrationnelles correspondant aux substitutions en silicium

Tableau 3) dans l'apatite sont également recherchées. Des bandes vibrationnelles supplémentaires qui correspondent aux liaisons formées par le cuivre au sein de l'apatite sont recherchées pour les matériaux Cu_xHA et sont détaillées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Bandes vibrationnelles spécifiques aux Cu_xHA

Bandes d'absorption sélectionnées d'après les travaux d'élaboration de Cu_xHA (158). Toujours d'après ces travaux, la proximité du cuivre avec les hydroxyles influence la vibration de ces derniers et entraîne l'apparition de nouvelles bandes vibrationnelles leur correspondant.

| Bande d'absorbance IR (cm^{-1}) | Mode |
|--|------|
| 675 | Cu-O |
| 760 | Cu-O |
| 810 | Cu-O |
| 840 | Cu-O |
| 865 | Cu-O |
| 3230 | OH |
| 3340 | OH |
| 3425 | OH |

Les spectres résultants des analyses FTIR pour les 4 matériaux sont présentés ci-après en Figure 39.



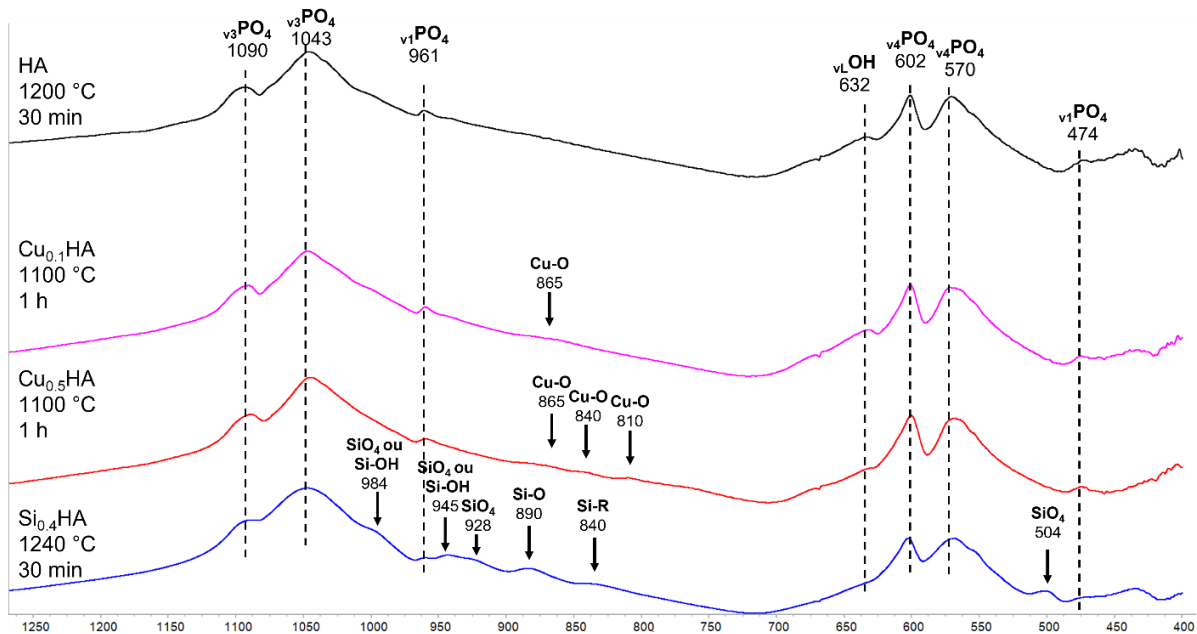
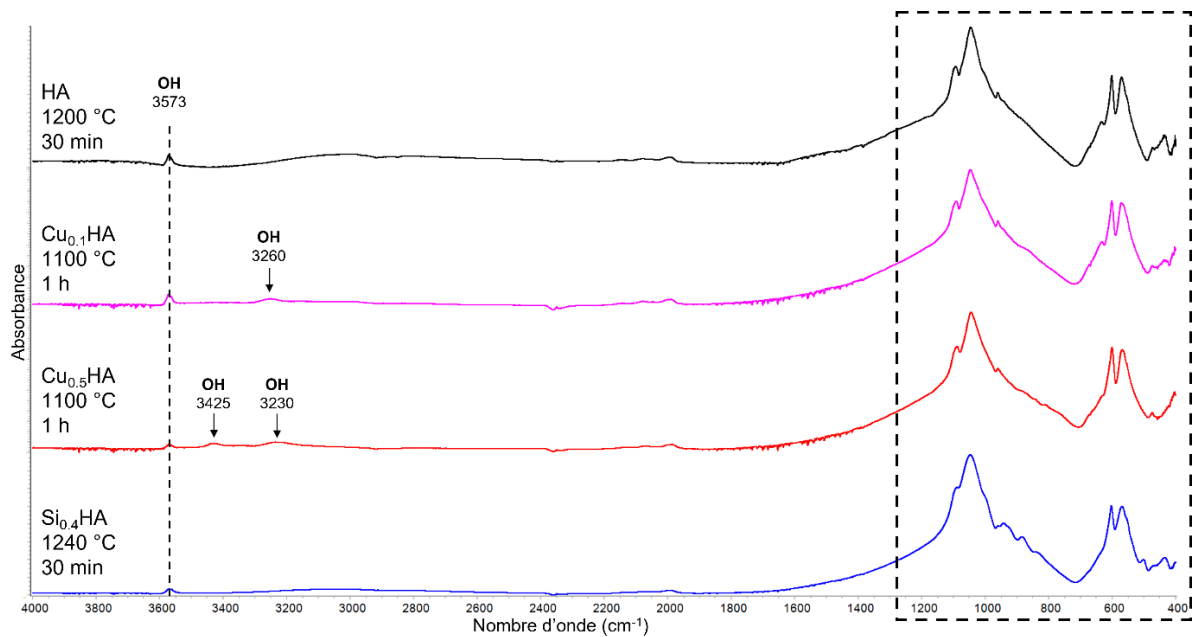


Figure 39 : Spectres FTIR des poudres des pastilles frittées de HA (1200°C 30 min), Cu_{0.1}HA (1100°C 1 h), Cu_{0.5}HA (1100°C 1 h) et Si_{0.4}HA (1240°C 30 min).

Cadre en pointillés : région zoomée présentée dans la partie inférieure de la figure. Spectres mis à en forme à l'aide du logiciel Spectraglyph (F. Menges "Spectraglyph - optical spectroscopy software", Version 1.2.14, 2020, <https://www.effemm2.de/spectraglyph/>)

Sur les spectres FTIR des 4 matériaux (Figure 39), toutes les bandes vibrationnelles correspondant à l'hydroxyapatite pure (Tableau 2) sont observées à l'exception de la bande à 632 cm⁻¹ associée à OH sur le spectre de Si_{0.4}HA.

Des bandes vibrationnelles caractéristiques de la liaison Cu-O sont présentes sur les matériaux Cu_{0.1}HA et Cu_{0.5}HA à 865, 840 et 675 cm⁻¹. Les deux autres bandes vibrationnelles de Cu-O à 810 et 760 cm⁻¹ ne sont détectées que sur Cu_{0.5}HA du fait de sa concentration en cuivre plus importante. La substitution ionique en cuivre de Cu_xHA entraîne la perte d'une

partie des hydroxyles comme en atteste la formule de ces matériaux : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}^{\text{II}}_z\text{Cu}^{\text{I}}_y\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ avec $y + z = x$ et $y \gg z$. Cela explique en partie la diminution relative par rapport à HA de l'intensité des bandes vibrationnelles de OH à 3573 et 632 cm^{-1} du spectre de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$. Les mêmes bandes vibrationnelles du spectre de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ sont moins affectées du fait de sa concentration en cuivre moins importante qui entraîne la perte de moins d'hydroxyles. La modification de la vibration de OH apportée par le cuivre est également dépendante de sa concentration. Sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, les bandes vibrationnelles à 3425 et 3230 cm^{-1} sont détectées alors que seule celle à 3230 cm^{-1} est détectée sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$.

Sur le spectre FTIR du matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ sont présentes la bande vibrationnelle à 504 cm^{-1} associée au SiO_4 , celle à 840 cm^{-1} associée à la liaison Si-R, celle à 890 cm^{-1} associée à la liaison Si-O et celle à 984 cm^{-1} associée au SiO_4 ou à la liaison Si-OH. Il n'y a pas de bande vibrationnelle aux alentours de 800 cm^{-1} ce qui confirme l'absence de silice vitreuse. La substitution ionique en silicium de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ entraîne une diminution du nombre de groupements PO_4 et OH comme le rappelle sa formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$. Ceci explique la diminution relative par rapport à HA de l'intensité des bandes vibrationnelles de OH à 3573 cm^{-1} et de PO_4 à 1090 et 602 cm^{-1} et la quasi-disparition (seul un épaulement est détecté) de la bande vibrationnelle à 632 cm^{-1} associée à OH.

III.1.4. Caractéristiques physiques des matériaux :

Les paramètres physiques des matériaux susceptibles d'influencer des cellules à leur surface ou d'affecter le relargage d'éléments chimiques sont caractérisés. Ces paramètres sont la taille des grains, la porosité de surface, la rugosité et la surface spécifique.

Les observations MEB des surfaces des différents matériaux sont présentées sur la Figure 40.

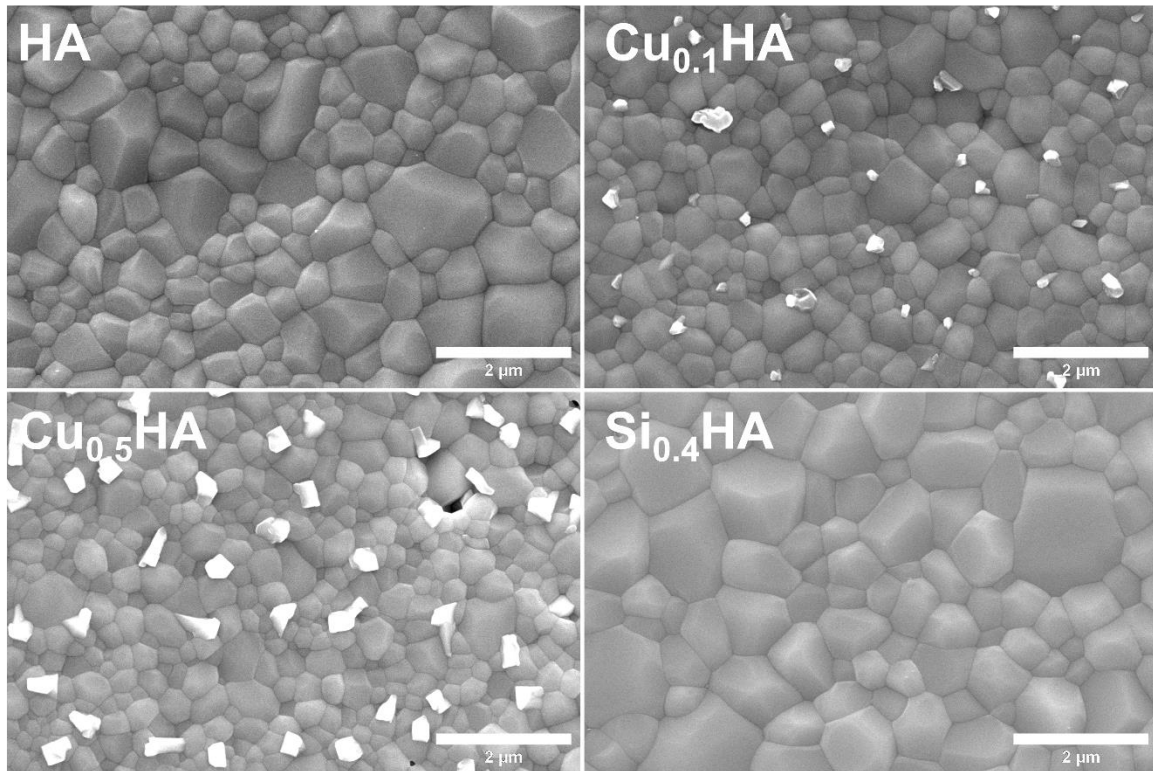


Figure 40 : Observations MEB des surfaces des pastilles

Images obtenues avec une tension de 10 kV (FEI-Quanta FEG 450). Barre d'échelle = 2 µm

Sur ces micrographies des surfaces des 4 matériaux (Figure 40), des différences de taille de grains sont visibles. Les grains du matériau $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ sont plus gros que ceux de HA qui sont eux-mêmes plus gros que ceux des Cu_xHA qui sont similaires entre eux. Les tailles moyennes des grains sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Taille des grains des pastilles

Mesures réalisées sur 3 pastilles par matériau avec plus de 300 grains mesurés. Résultats présentés en µm en tant que moyenne ± écart-type.

| Matériau | HA | $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ | $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ | $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ |
|------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Taille des grains (µm) | $0,5 \pm 0,2$ | $0,4 \pm 0,1$ | $0,3 \pm 0,1$ | $0,7 \pm 0,3$ |
| D10 (µm) | $0,25 \pm 0,1$ | $0,2 \pm 0,1$ | $0,2 \pm 0,1$ | $0,3 \pm 0,1$ |
| D90 (µm) | $0,8 \pm 0,2$ | $0,6 \pm 0,1$ | $0,45 \pm 0,1$ | $1,2 \pm 0,2$ |

Les légères variations de taille de grains entre les matériaux rapportées sur le Tableau 10 s'expliquent avec les paramètres de frittage (Tableau 8). Les matériaux frittés à plus haute température ont des grains de taille plus importante : $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ est fritté à 1240°C, HA à 1200°C et les Cu_xHA à 1100°C. La croissance granulaire d'une céramique augmente avec la température et survient majoritairement après que son taux de densité relative dépasse 95%.

Les paramètres de frittage ont été optimisés dans les travaux précédents du laboratoire pour atteindre une densification importante avec une croissance granulaire limitée. Par exemple, la croissance granulaire pour l'HA pure est particulièrement active aux alentours de 1250°C (274), d'où une température de frittage sélectionnée de 1200°C et un temps de palier court (Tableau 8) qui permet d'atteindre une densification supérieure à 95% avec une croissance granulaire faible. L'optimisation des paramètres de frittage se visualise sur les micrographies de la surface des matériaux (Figure 40) où très peu de pores sont visibles. La porosité ouverte n'est pas mesurée précisément en raison d'un nombre de pores trop faible mais elle est considérée inférieure à 0,5% de la surface des matériaux. Des mesures dans l'eau par poussée d'Archimède indiquent une porosité ouverte de $3 \pm 0,6\%$ pour tous les matériaux. Cependant, la valeur d'environ 3% s'explique par la méthode expérimentale qui ne permet pas de retirer toute l'eau en surface des matériaux imbibés.

Des grains clairs sont apparents sur les matériaux Cu_xHA (Figure 40) et leur taille est plus importante sur $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ que sur $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$. D'après les travaux de thèse de Tiphaine Bazin (158), ces observations correspondent à des grains du matériau pour lesquels la surface est enrichie en cuivre.

Pour comprendre l'état de la structure interne des matériaux le taux de densification est calculé. Pour les matériaux HA et $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ il est obtenu d'après la formule :

$$\text{taux de densification} = \frac{\text{densité}}{\text{densité maximale théorique}}$$

La densité des matériaux frittés est mesurée par pycnométrie hélium et leur densité maximale théorique a été calculée dans de précédents travaux (159). La densité maximale théorique des matériaux Cu_xHA n'est pas connue et leur taux de densification est calculé à l'aide d'une autre formule utilisant des mesures expérimentales :

$$\text{taux de densification} = \frac{\text{densité relative apparente}}{\text{densité des poudres frittées}}$$

La densité relative apparente est obtenue grâce aux mesures des expériences de poussée d'Archimède à l'aide de la formule :

$$\text{densité relative apparente} = \frac{\text{masse sèche}}{\text{masse imbibée} - \text{masse immergée}}$$

La densité des poudres frittées est mesurée par pycnométrie hélium, sur les poudres issues de pastilles frittées et broyées au mortier et pilon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Densité et taux de densification des pastilles

Données des densités maximales théoriques de HA et Si_{0,4}HA d'après les calculs de (159).

| Matériau | HA | Cu _{0,1} HA | Cu _{0,5} HA | Si _{0,4} HA |
|---|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Densité mesurée (g/cm ³) | 3,049 ± 0,003 | 3,085 ± 0,004 | 3,157 ± 0,001 | 3,069 ± 0,001 |
| Densité maximale théorique (g/cm ³) | 3,154 | NA | NA | 3,119 |
| Densité des poudres frittées (g/cm ³) | NA | 3,123 ± 0,001 | 3,179 ± 0,001 | NA |
| Taux de densification (%) | 96,6 | 97,5 | 95,8 | 98,3 |

Tous les matériaux ont un taux de densification supérieur à 95% (Tableau 11). Ce taux est communément admis pour caractériser un matériau céramique dense où la quasi-totalité des pores présents avant frittage sont supprimés lors du retrait (274). A ce niveau de densification, les pores observés en surface (Figure 40) correspondent aux pores résiduels fermés au cœur du matériau non éliminés lors de la densification et se trouvant à la surface du matériau.

La rugosité des matériaux a ensuite été mesurée et les profils de rugosité sont présentés en Figure 41.

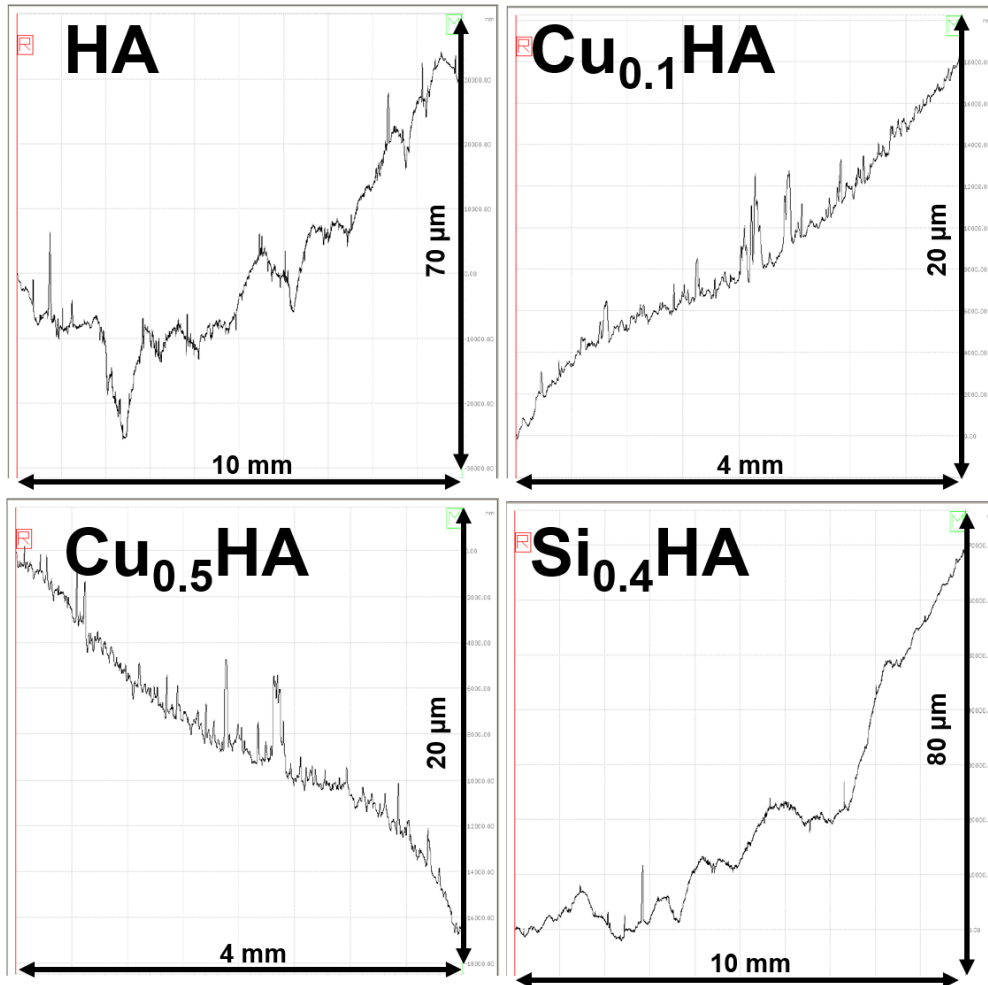


Figure 41 : Profils types des surfaces des pastilles

Les variations des barres d'échelle sont dues aux différences de reliefs rencontrées par le stylet. L'inclinaison initiale du profil est liée aux conditions expérimentales et ne reflète pas l'inclinaison réelle d'une pastille sur une surface plane.

Les valeurs extraites de ces mesures (Figure 41) sont rapportées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Rugosité des pastilles mesurée par profilométrie

Le RA, RV et RZ sont définis précédemment en sous-partie II.1.12. Données issues des mesures réalisées sur 3 pastilles de lots indépendants

| Matériau | HA | Cu _{0.1} HA | Cu _{0.5} HA | Si _{0.4} HA |
|----------|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| RA (μm) | 4,0 ± 0,3 | 1,4 ± 0,5 | 1,0 ± 0,1 | 8,1 ± 0,6 |
| RV (μm) | -12,0 ± 1,0 | -3,4 ± 1,0 | -3,3 ± 0,2 | -15,0 ± 1,0 |
| RZ (μm) | 12,0 ± 0,4 | 3,8 ± 0,5 | 3,7 ± 0,1 | 16,0 ± 0,4 |

La topographie des pastilles (Tableau 12) des 4 matériaux présentent des différences. Les pastilles de Cu_xHA ont un RA, RV et RZ comparable entre elles et possèdent les valeurs de rugosité les plus faibles des 4 matériaux. Les pastilles de HA sont plus rugueuses que celles de Cu_xHA : leur RA, leur RV et leur RZ sont plus de 3 fois supérieurs. Les pastilles de $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ sont les plus rugueuses avec un RA 2 fois supérieur à celui de HA et ont un RV et un RZ 1,25 fois supérieurs. Ces différences de rugosité sont à relier à la taille des grains et de leur distribution (Tableau 10) qui suivent la même relation $\text{Si}_{0,4}\text{HA} > \text{HA} > \text{Cu}_{0,1}\text{HA} \sim \text{Cu}_{0,5}\text{HA}$.

Les valeurs de RV et RZ sont à prendre avec précaution car la taille de la pointe du stylet (12,5 μm de rayon) et le mode dynamique (le stylet se déplace à la surface du matériau à vitesse constante) l'empêchent d'atteindre le fond des pores et des vallées étroites et/ou profondes.

La surface spécifique des matériaux est mesurée à l'aide de la méthode BET 8 points afin de comparer les surfaces disponibles entre les différents matériaux, les résultats sont regroupés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Surface spécifique mesurée par la méthode de la BET 8 points

Données issues des mesures réalisées sur un minimum de 3 pastilles de lots indépendants

| Matériau | HA | $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ | $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ | $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ |
|--|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Surface spécifique (m^2/g) | $0,003 \pm 0,001$ | $0,0026 \pm 0,0005$ | $0,0021 \pm 0,0005$ | $0,009 \pm 0,002$ |

Les surfaces spécifiques des matériaux (Tableau 13) sont très petites (21 à 90 cm^2/g). Les pastilles de $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ présentent le moins de surface disponible suivies des pastilles de $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ qui en possède 1,25 fois plus. Les pastilles de HA possèdent 1,2 fois plus de surface disponible que celles de $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$. Le matériau avec la plus grande surface disponible est $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ où celle-ci est 3 fois supérieure à celle de HA, plus de 3 fois celle de $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ et plus de 4 fois celle de $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$.

Ces résultats sont en accord avec les valeurs de rugosité (Tableau 12) où l'ordre $\text{Si}_{0,4}\text{HA} > \text{HA} > \text{Cu}_{0,1}\text{HA} \sim \text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ est préservé, en lien également avec l'évolution de la taille des grains (Tableau 10).

III.1.5. Conclusion de la caractérisation physico-chimique des pastilles

Les différentes caractérisations des matériaux utilisés dans cette étude sont regroupées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés en culture 2D statique

| Matériau | Formules chimiques | Masse de dopant (%masse) | Taille de grain (μm) | Porosité ouverte (%) | Surface spécifique (m^2/g) | RA (μm) | RZ (μm) | RV (μm) | Densité (g/cm^3) | Taux de densification |
|---------------------------|---|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| HA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | NA | $0,5 \pm 0,2$ | <0,5% | $0,003 \pm 0,001$ | $4 \pm 0,3$ | $12 \pm 0,4$ | $-12 \pm 1,0$ | $3,049 \pm 0,003$ | 96,6% |
| Cu_{0.1}HA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}^{\text{II}}_z\text{Cu}^{\text{I}}_y\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ avec $y + z = 0,1$ (et $y \gg z$) | 0,8% Cu | $0,4 \pm 0,1$ | <0,5% | $0,0026 \pm 0,0005$ | $1,4 \pm 0,49$ | $3,8 \pm 0,5$ | $-3,4 \pm 1,0$ | $3,085 \pm 0,004$ | 97,5% |
| Cu_{0.5}HA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}^{\text{II}}_z\text{Cu}^{\text{I}}_y\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ avec $y + z = 0,5$ (et $y \gg z$) | 3,8% Cu | $0,3 \pm 0,1$ | <0,5% | $0,0021 \pm 0,0005$ | $1 \pm 0,1$ | $3,7 \pm 0,1$ | $-3,3 \pm 0,2$ | $3,157 \pm 0,001$ | 95,8% |
| Si_{0.4}HA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$ | 1,07% Si | $0,7 \pm 0,3$ | <0,5% | $0,009 \pm 0,002$ | $8,1 \pm 0,6$ | 16 ± 1 | $-15 \pm 1,0$ | $3,069 \pm 0,001$ | 98,3% |



D'après les caractérisations chimiques, tous les matériaux sont des hydroxyapatites monophasées et seul le dopant, ou son absence, peut influencer la réponse biologique associée à leur chimie.

D'après les caractérisations physiques, la différence de température de frittage entre les matériaux, imposée par la nature des dopants à insérer dans l'apatite, entraîne des légères différences dans les tailles de grains. Cette différence de taille de grains suit la relation : $Si_{0,4}HA > HA > Cu_{0,1}HA \sim Cu_{0,5}HA$. Elle entraîne une variation de la topographie des matériaux où une relation similaire existe pour la rugosité : $Si_{0,4}HA > HA > Cu_{0,1}HA \sim Cu_{0,5}HA$. Cette différence de rugosité et de taille des grains engendre une différence de surface spécifique des matériaux avec la relation $Si_{0,4}HA > HA > Cu_{0,1}HA > Cu_{0,5}HA$.

Ces trois paramètres physiques sont connus pour affecter la réponse biologique de cellules cultivées à leur surface en modulant des voies de mécanotransduction et/ou la signalisation de protéines membranaire, ce qui a été décrit dans la sous-partie I.5.2.1. Dans le cas des 4 matériaux étudiés, les différences de valeurs de ces paramètres peuvent-elles engendrer des différences dans la réponse biologique ?

(i) La taille des grains des matériaux peut affecter la signalisation des cellules si les grains ont des dimensions comparables aux protéines déposées en surface ce qui diminue l'adsorption de ces dernières (sous-partie I.5.2.1.3) ou s'ils forcent aux cellules d'adopter des conformations spécifiques en raison de taille comparable en influençant directement la topographie (sous-partie I.5.2.1.4). Les tailles des grains des 4 matériaux de cette étude sont 10 à 100 fois supérieure aux protéines typiquement adsorbées. La taille de grain moyenne est comprise entre un minimum de 0,3 μm pour $Cu_{0,5}HA$ et un maximum de 0,7 μm pour $Si_{0,4}HA$. Les protéines ont des dimensions de quelques nanomètres pour les monomères à quelques dizaines de nanomètres pour les multimères. Par conséquent, l'adsorption de protéines à la surface des matériaux ne devrait être inhibée sur aucun d'entre eux en raison de la taille de leurs grains. Les cellules ont un diamètre d'environ 25 μm , les grains sont donc très petits par comparaison (20 à 100 fois moins gros) et ils ne devraient pas influencer la conformation des cellules. Pour conclure, il ne devrait pas y avoir d'effet biologique spécifique à un matériau en raison de leur taille de grains.

(ii) La rugosité peut affecter la réponse biologique si elle est de dimension comparable aux protéines adsorbées en surface ou aux cellules cultivées à sa surface (sous-partie I.5.2.1.4). Les rugosités moyennes sont micrométriques avec un RA compris entre un minimum de 1 μm pour $Cu_{0,5}HA$ et un maximum de 8 μm pour $Si_{0,4}HA$. Les protéines adsorbées étant nanométriques, la rugosité n'affectera pas leur adsorption. Ces valeurs de rugosités sont comparables aux dimensions cellulaires (diamètre de $\sim 25 \mu m$, hauteur de 1 à 2 μm). Ainsi, il est probable qu'elles soient favorables à la réalisation de nombreuses liaisons entre les intégrines et le substrat ce qui est susceptible d'augmenter la sécrétion de VEGF (sous-partie I.5.2.1.4). Les différences de rugosité entre les matériaux sont contenues dans le même ordre de grandeur et la réponse biologique associée devrait être comparable.

(iii) La surface spécifique détermine en partie la quantité de protéines adsorbées sur un matériau et ces dernières peuvent affecter la réponse biologique (sous-partie I.5.2.1.2). Les surfaces spécifiques des matériaux de l'étude sont comprises entre 21 cm^2/g pour $Cu_{0,5}HA$ et 90 cm^2/g pour $Si_{0,4}HA$. La surface spécifique de $Cu_{0,5}HA$ est très similaire à celle de $Cu_{0,1}HA$ qui est de 26 cm^2/g et celle de HA de 30 cm^2/g . Les quantités de protéines adsorbées sont donc probablement similaires sur les matériaux HA, $Cu_{0,1}HA$ et $Cu_{0,5}HA$ et plus importantes sur le matériau $Si_{0,4}HA$. Ces protéines en quantité accrue sur $Si_{0,4}HA$ pourraient, en présentant



davantage de sites de liaisons, faciliter l'adhérence, la mobilité et la prolifération de cellules à sa surface. L'intensité de cet effet est toutefois complexe à estimer car les études sur l'influence de la surface spécifique sont faites sur des matériaux ayant des surfaces actives de plusieurs milliers de cm^2/g , et les différences de surface spécifique entre les matériaux testés sont aussi dans un ordre de grandeur de milliers de cm^2/g (275), (276). L'origine des différences d'effets biologiques entre ces matériaux dans ces études n'est pas complètement élucidée. Il pourrait s'agir d'une modification linéaire de la réponse biologique en fonction du nombre de protéines adsorbées, ou bien les différences proviendraient de l'apparition d'un effet seuil où une quantité suffisante de protéines adsorbées, comme des facteurs de croissance, entraîne un effet biologique spécifique. Par conséquent, il n'est pas possible de connaître à l'avance l'intensité de l'éventuelle différence d'effet biologique provoquée par la surface spécifique accrue du matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$.

En conclusion, d'après la littérature explorée en sous-partie I.5.2.1, les 4 matériaux de cette étude possèdent des paramètres physiques favorables au développement d'une population de cellules endothéliales à leur surface. Il est possible que le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ favorise l'adhérence, de cellules cultivées à sa surface en raison de sa surface spécifique accrue. Il est également possible que les différentes chimies des matériaux entraînent des modifications dans la conformation des protéines adsorbées tel qu'il a été rapporté avec les matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ dans une étude précédente réalisée au laboratoire (277).

III.2. Biocompatibilité des matériaux

III.2.1. Démarche expérimentale pour l'étude de la biocompatibilité des matériaux

La biocompatibilité des 4 matériaux est évaluée en parallèle, l'hydroxyapatite HA est utilisée comme référence car sa biocompatibilité est bien établie. L'étude est réalisée sur une durée maximale de 7 jours qui est le temps maximal des études suivantes centrées sur les propriétés angiogéniques des matériaux. La solubilité des matériaux est également évaluée. Ceux-ci vont libérer des composés solubles dont les concentrations peuvent évoluer dans le temps (précipitation, internalisation par les cellules...), influencer et modifier l'environnement du matériau (modification de pH, modification des équilibres chimiques, effets sur la signalisation cellulaire...). Un matériau qui aurait des propriétés favorables initialement grâce à un dopant soluble pourrait devenir défavorable si ce dernier s'accumule jusqu'à une dose toxique. Il pourrait également perdre ses propriétés si le dopant précipite suite à l'évolution des équilibres chimiques du milieu.

L'évaluation de la biocompatibilité des matériaux a été réalisée en ensemençant des cellules endothéliales C166 à leur surface et en effectuant diverses mesures de 1 jour à 7 jours de culture. La colonisation des matériaux est contrôlée en mesurant la densité cellulaire. Le développement des populations cellulaires est observé par visualisation du cytosquelette d'actine. Enfin, l'état physiologique des cellules est estimé en mesurant leur activité métabolique, leur mortalité et leur taux de prolifération. Le relargage des éléments chimiques dans les milieux de culture est mesuré par ICP-OES pour estimer l'impact de ces produits solubles.

III.2.2. Croissance et organisation de la population cellulaire sur les matériaux

Les cellules C166 à la surface des matériaux sont comptées en dénombrant les noyaux par observation du Hoechst 33342. Ces observations sont présentées dans la Figure 42.

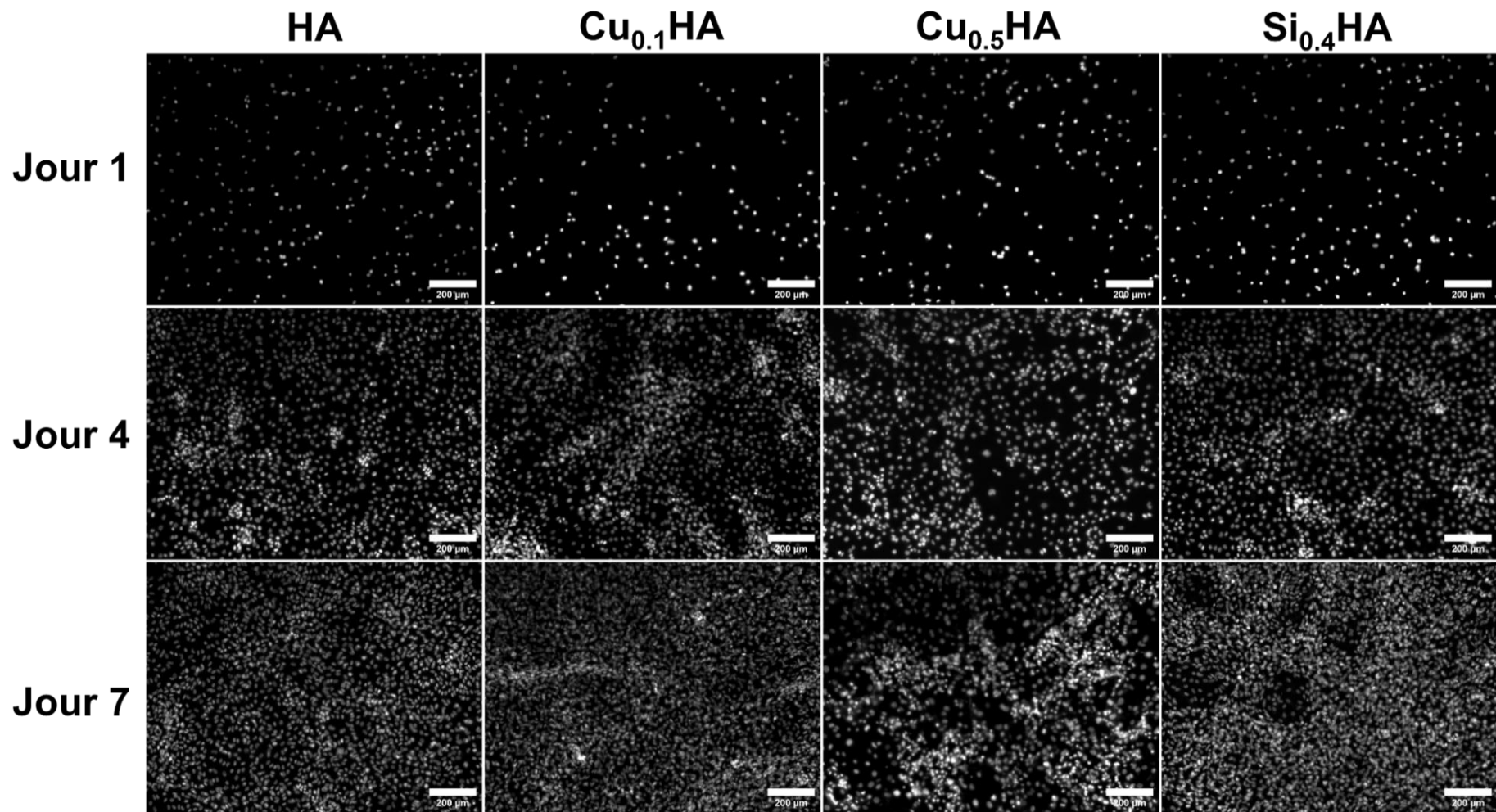


Figure 42 : Densités cellulaires à la surface des matériaux après 1, 4 et 7 jours de culture

Les structures observées en gris sont des noyaux, visualisés grâce à leur marquage par le Hoechst 33342. Barre d'échelle = 200 µm.



Dans cette sous-partie l'adhérence, le développement et l'organisation des cellules C166 sur les matériaux est présentée au cours du temps.

La densité des C166 sur les matériaux (Figure 42) est homogène après 1 jour de culture à la surface des pastilles. Les C166 atteignent une forte densité où elles s'organisent en amas visibles sur tous les matériaux après 4 et 7 jours de culture. Au quatrième jour de culture, les amas de C166 sur HA, Cu_{0,5}HA et Si_{0,4}HA apparaissent globulaires alors que ceux sur Cu_{0,1}HA apparaissent allongés et plus grands. Au jour 7 la densité de noyaux apparaît visuellement comparable sur les matériaux HA, Cu_{0,1}HA et Si_{0,4}HA alors qu'elle semble moins importante à la surface du matériau Cu_{0,5}HA. Des amas sans forme bien définie sont visibles sur Cu_{0,5}HA. La résolution optique de certains noyaux peut être faible dans les cas où les cellules forment des amas multicellulaires épais ou que la planéité de la pastille n'est pas parfaite. Le comptage de ces noyaux est rapporté dans la Figure 43.

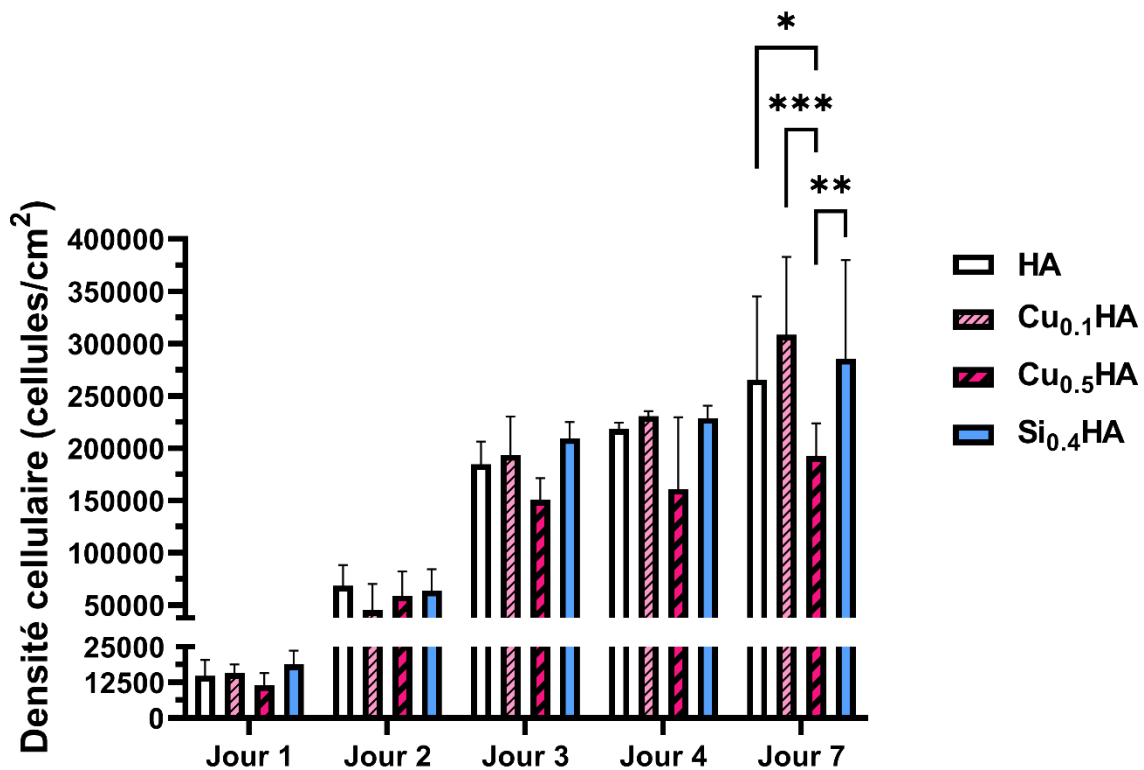


Figure 43 : Densité des cellules C166 à la surface des matériaux

Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants : Jour 1, Jour 2 et Jour 4 n = 6, Jour 3 et Jour 7 n = 3.

Les mesures de densité cellulaire (Figure 43) à la surface du matériau de référence HA montrent que les C166 prolifèrent entre le jour 1 et le jour 7. L'accroissement de population est particulièrement important entre le jour 1 et le jour 3 avec plus du doublement voir du triplement du nombre de cellules toutes les 24 h.

Cette évolution de la population cellulaire est comparable à celles observées sur les matériaux Cu_{0,1}HA et Si_{0,4}HA. Les C166 sur le matériau Cu_{0,5}HA ont une croissance similaire aux C166 sur les autres matériaux jusqu'au jour 4, malgré des variations importantes mesurées le



quatrième jour. Ces variations entraînent un écart-type important avec 160900 ± 44600 cellules/cm². La densité cellulaire sur Cu_{0.5}HA au jour 7 est significativement plus faible que celle des autres conditions. La densité de C166 y est réduite d'environ un tiers avec une valeur de 192300 ± 31500 cellules/cm² alors qu'elle est de 265500 ± 79900 cellules/cm² pour HA, de 308400 ± 74500 cellules/cm² pour Cu_{0.1}HA et de 285400 ± 94600 cellules/cm² pour Si_{0.4}HA.

Par ailleurs, la densité des cellules observées au jour 7 (Figure 42) est très importante et les C166 se développent en 3D. En raison de la densité et des chevauchements les noyaux des C166 se superposent très fortement. Dans ces conditions le comptage des cellules est complexe car même une analyse manuelle n'est pas parfaitement fiable. La mesure sous-estime régulièrement la quantité de cellules réellement présentes à la surface des matériaux. Cette sous-estimation doit toucher en particulier Cu_{0.1}HA et Si_{0.4}HA où le chevauchement est très présent. Ce problème explique également les importants écart-types calculés à ce jour de culture.

Les C166 sont des cellules proliférantes, le temps minimal nécessaire pour doubler une population de cellules endothéliales dépend de leur origine avec, par exemple, 12 h pour des cellules microvasculaires et 17 h pour des HUVECs (278). Par ailleurs, les C166 ont une prolifération intrinsèquement augmentée en raison de leur surexpression du proto-oncogène *fps* (*fps/fes*) (262). Par conséquent, la croissance de la population cellulaire observée sur tous les matériaux jusqu'au jour 3 (Figure 42 et Figure 43) est cohérente avec une capacité de doublement rapide : toutes les 12 h à 18 h. La croissance de la population cellulaire observée sur tous les matériaux jusqu'au jour 7, malgré un rythme plus réduit sur Cu_{0.5}HA, témoigne d'une inhibition de contact limitée. En effet, cette croissance s'effectue alors que la confluence est vraisemblablement proche de 100% au 4^{ème} jour (Figure 42). Comme discuté en sous-partie II.2.2, cette inhibition de contact limitée pourrait provenir de la nature des C166 qui possèdent plusieurs copies du proto-oncogène *fps* (*fps/fes*) et sont capables de proliférer en excès *in vivo* en l'absence de stimulation spécifique (265), (266). La diminution du nombre de cellules observées sur le matériau Cu_{0.5}HA au jour 7 de culture témoigne d'un ralentissement de la prolifération, de l'existence d'une surmortalité des cellules par rapport aux autres matériaux ou d'une combinaison de ces deux phénomènes.

D'après la répartition des noyaux (Figure 42), l'organisation des C166 à la surface des matériaux pourrait être différente selon les matériaux sur lesquels elles sont cultivées. Cette organisation est observée par la suite en visualisant leur réseau d'actine. La Figure 44 regroupe des observations du réseau d'actine filamentaire des C166 au jour 3 sur pastilles quand les cellules forment un tapis cellulaire recouvrant le matériau.

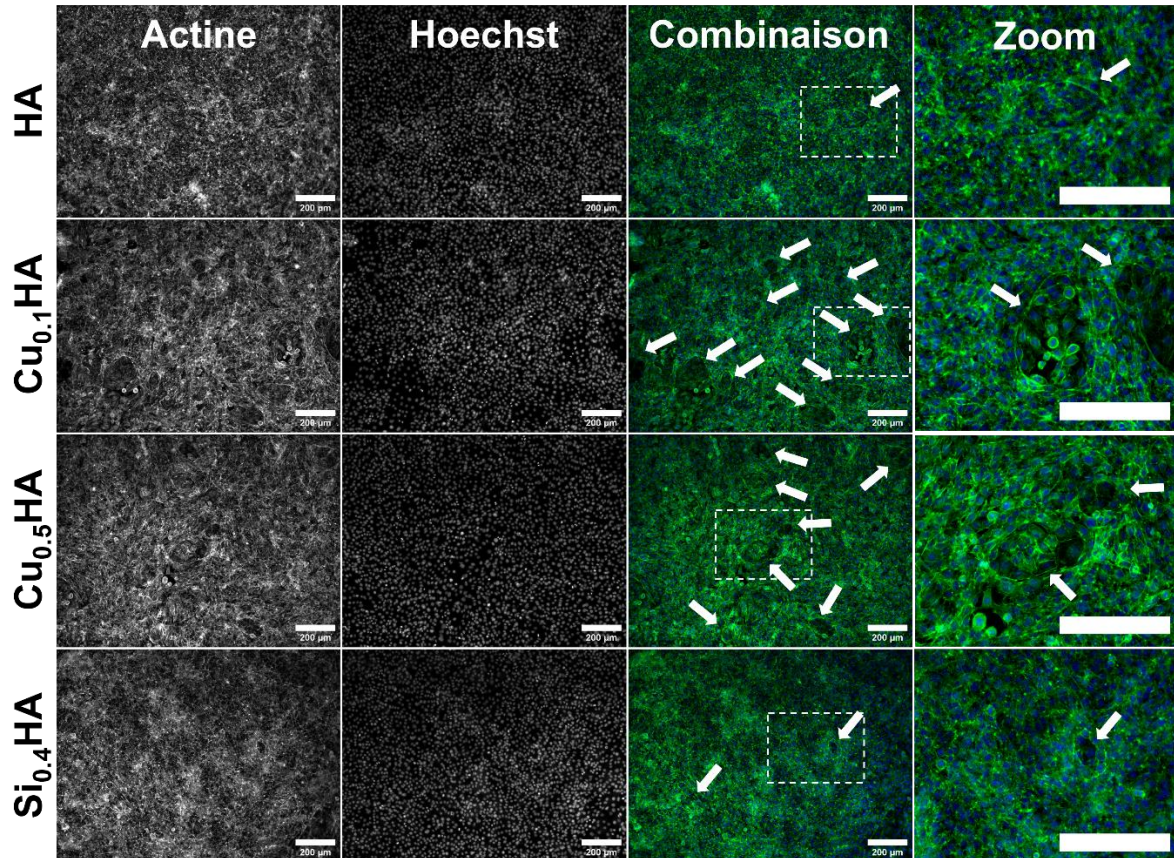


Figure 44 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 3 jours de culture à la surface des pastilles

Flèches blanches : structures circulaires. Cadre en pointillés : zone du zoom. Bleu : noyau. Vert : actine. Barre d'échelle = 200 µm.

L'actine dans les C166 au troisième jour de culture (Figure 44) cultivées à la surface du matériau de référence HA, forme un réseau de petits filaments qui ne correspondent pas au cytosquelette d'actine de cellules endothéliales quiescentes. Quelques structures de configuration circulaire et formées de plusieurs cellules sont visibles à la surface du matériau (Figure 44, flèches blanches). Cette organisation du réseau d'actine des C166 est également observée sur le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (Figure 44). L'apparente diminution de la quantité d'actine sur le côté droit de l'image $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (Figure 44) est liée à la non-planéité de l'échantillon et à la limite de la profondeur de champ de l'objectif. Sur les matériaux Cu_xHA , par rapport aux matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$, le réseau d'actine des C166 est composé de filaments plus longs, plus larges et d'un plus grand nombre de structures circulaires multicellulaires (Figure 44, flèches blanches). Ces structures semblent plus nombreuses sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ que sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$.

Des images au grossissement supérieur permettent de mieux appréhender ces différences dans l'organisation du réseau d'actine des C166 et sont présentées dans la Figure 45.

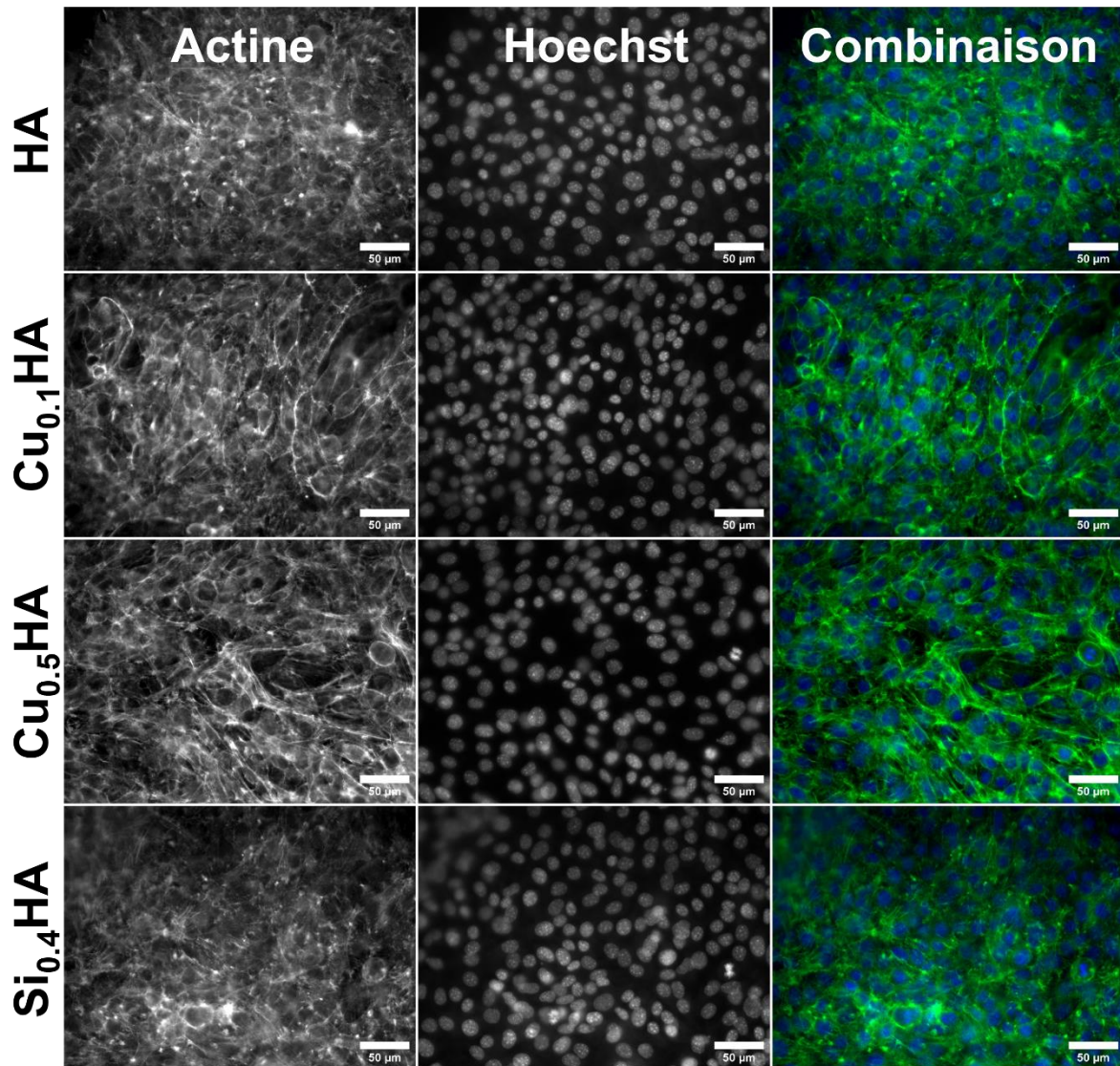


Figure 45 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 3 jours de culture à la surface des pastilles, observations au grossissement 400X

Bleu : noyau. Vert : actine. Barre d'échelle = 50 μm

Au troisième jour de culture, de nombreuses fibres de stress sont visibles dans les C166 sur l'HA (Figure 45) et le réseau d'actine n'est visuellement pas organisé dans une direction préférentielle. Le réseau d'actine des C166 sur $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ est organisé de manière similaire à celui sur HA. Sur les matériaux Cu_xHA de nombreuses cellules (visuellement, plus de la moitié du champ visuel) sont allongées et orientées dans une direction commune avec un important réseau de filaments d'actine s'étendant sous leur membrane plasmique. De nombreuses cellules possèdent des filaments d'actine s'apparentant à des fibres de stress s'étendant sur plusieurs cellules. Ces filaments font, à priori, partie de réseaux de protéines connectant mécaniquement les cellules entre elles par le biais des jonctions adhérentes (279).

D'après la littérature explorée dans la sous-partie I.2.2.2, l'existence de fibres de stress développées dans les C166 sur tous les matériaux suggère que ces cellules arrivées à confluence ne sont pas quiescentes. Cet état de tension des C166 est compatible avec une activation pro-angiogénique (26) ou inflammatoire (27). La présence de fibres de stress

orientées dans les cellules sur les matériaux Cu_xHA suggère qu'elles sont en migration et commencent à former un fuseau d'après les données de la sous-partie I.2.3.1.

Les conditions de culture utilisées dans cette étude ne sont pas entièrement comparables aux études sur l'angiogenèse *in vitro* de la littérature car le substrat ne permet pas un développement des cellules en 3D. Pour autant, les observations précédentes (Figure 44 et Figure 45) suggèrent qu'un processus angiogénique similaire à celui décrit dans la sous-partie I.2.3.1 est à l'œuvre. Les grandes étapes de l'angiogenèse *in vitro* décrites par les auteurs de l'étude (36) lorsque les cellules endothéliales arrivent à confluence sont un allongement des cellules puis leur orientation et leur organisation en fuseaux multicellulaires délimitant des structures circulaires. Les fuseaux s'agrandissent et de moins en moins de cellules restent attachées à la surface du substrat, enfin la dernière étape est la création d'une lumière au sein de ces fuseaux (36).

Les cellules C166 au troisième jour de culture sont à confluence, des structures circulaires sont présentes sur toutes les conditions (Figure 44), une orientation préférentielle des cellules et de leurs fibres de stress apparaît sur Cu_xHA (Figure 45). Ces observations sont compatibles avec l'existence d'un signal angiogénique dans toutes les conditions et avec une précocité en présence des matériaux Cu_xHA .

Les réseaux d'actine sont observés 24 h plus tard pour suivre l'évolution de ce phénomène, la Figure 46 présente des observations du réseau d'actine filamentaire de zones représentatives des populations de C166.

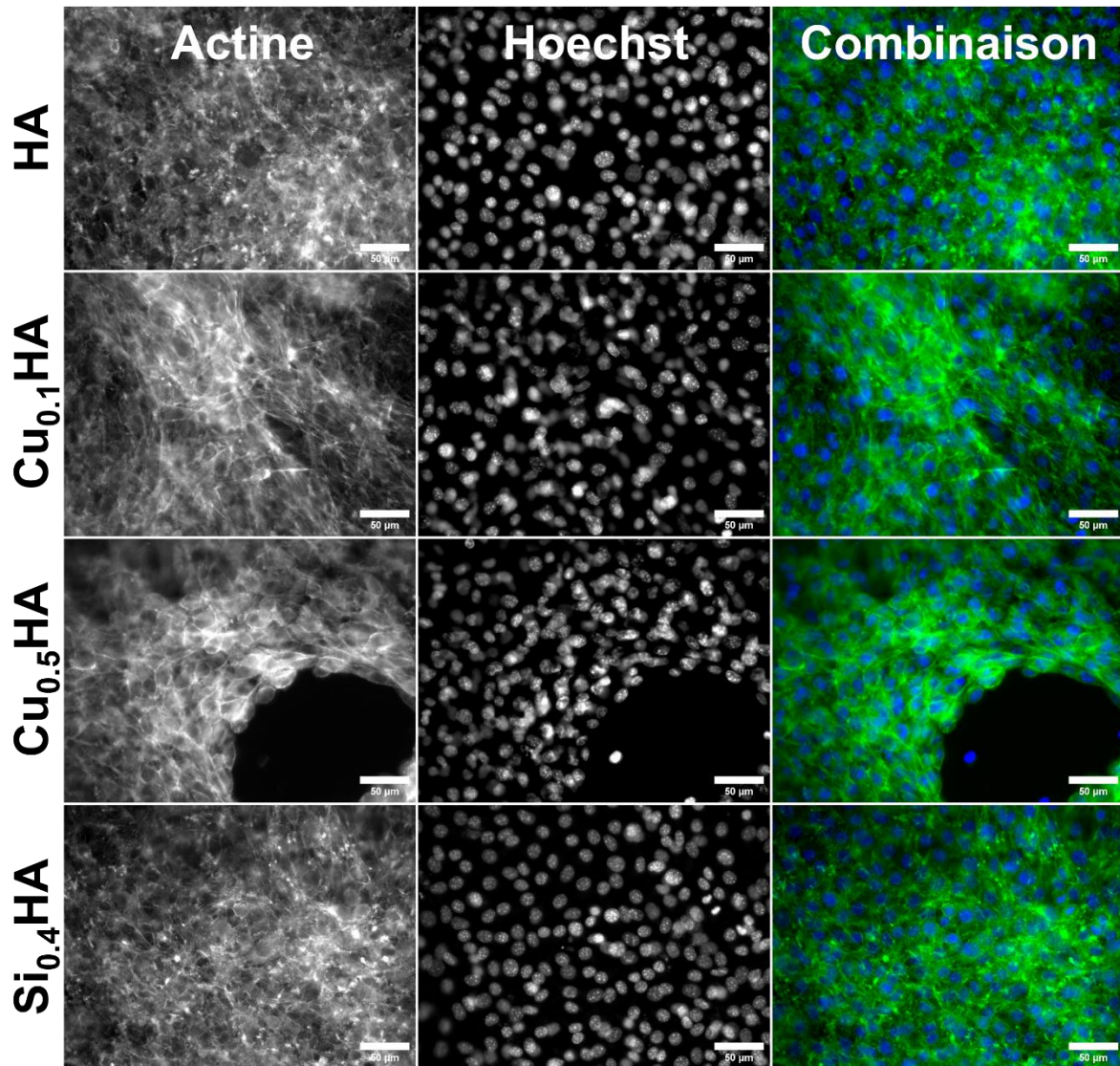


Figure 46 : Organisation du réseau d'actine des cellules C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux

Bleu : noyau. Vert : actine. Barre d'échelle = 50 µm.

Au quatrième jour de culture, le réseau d'actine des C166 (Figure 46) sur l'HA est composé essentiellement de filaments fins avec une localisation cytoplasmique plutôt que corticale, ce qui témoigne de cellules non quiescentes à la surface de l'ensemble du matériau. Le même phénotype est retrouvé sur le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Sur les matériaux Cu_xHA , le réseau d'actine est composé de filaments plus épais et plus longs que sur HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Ces filaments sont orientés selon l'axe des cellules qui s'organisent en fuseaux multicellulaires délimitant des structures circulaires. Toujours sur les matériaux Cu_xHA , les C166 possèdent un important réseau de filaments sous-membranaire ainsi que de nombreux autres passant au centre des cellules qui peuvent s'apparenter à des fibres de stress. Sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, des zones sans cellules sont visibles et les cellules présentes semblent plus arrondies que sur les autres matériaux.

L'apparition de fuseaux de cellules renforce l'hypothèse que les C166 sont engagées dans un processus d'angiogenèse *in vitro* d'après les données de la littérature de la sous-partie I.2.3.1 et ce malgré une culture à la surface d'un substrat 2D.

Les structures circulaires observées sur les matériaux Cu_xHA sont également présentes sur l'HA et le $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ au quatrième jour mais avec des dimensions moins importantes. Ces différences sont illustrées dans la Figure 47 qui présente 3 images par matériau du réseau d'actine au niveau des structures circulaires formées par les C166 au quatrième jour de culture.

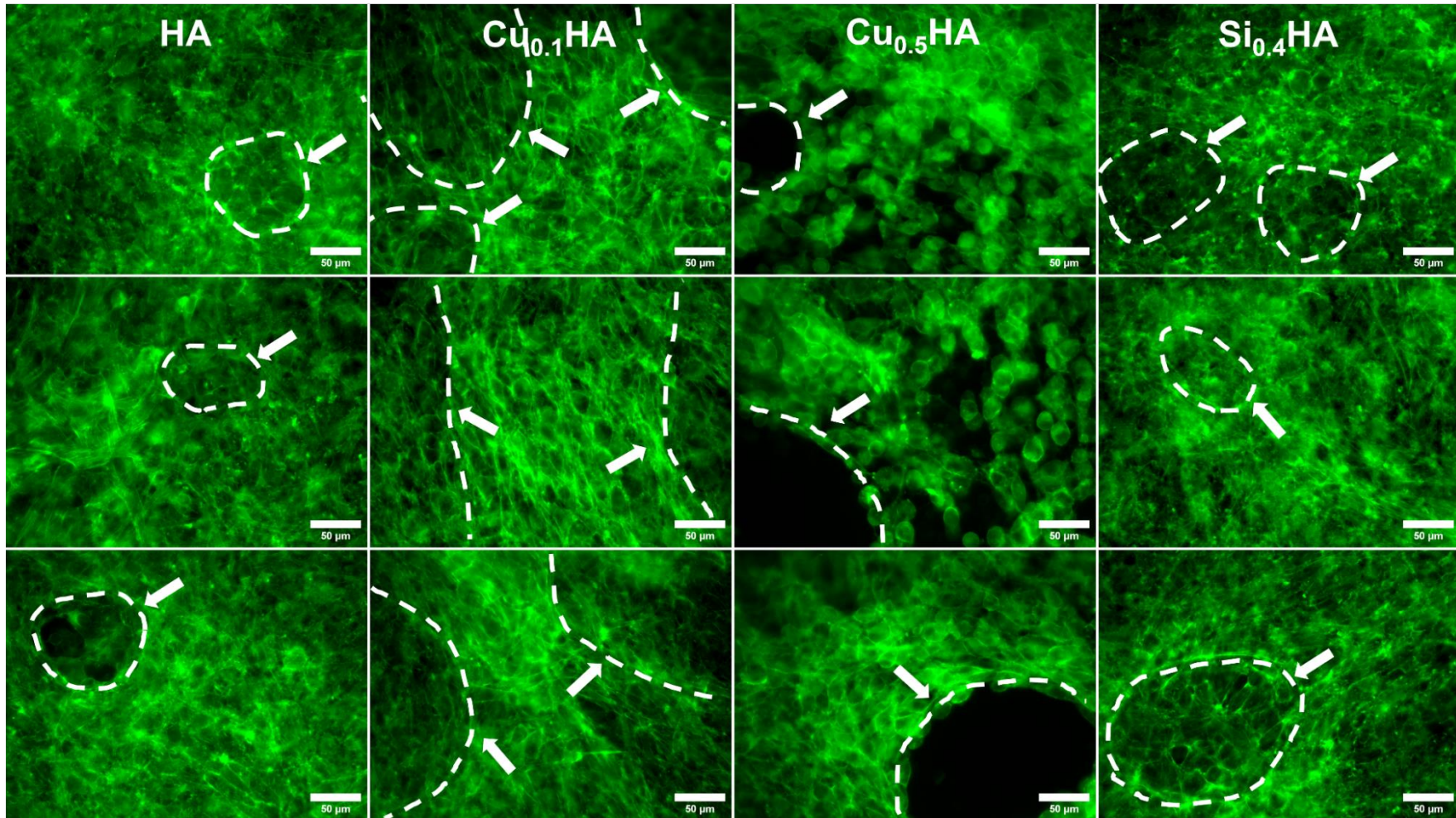


Figure 47 : Visualisation du réseau d'actine au niveau des structures circulaires formées par les C166 après 4 jours de culture à la surface des pastilles
 Vert : actine. Flèche blanche et pointillés : indiquent le contour de structure circulaire. Barre d'échelle = 50 μm



Sur ces illustrations du réseau d'actine des C166 (Figure 47), les structures circulaires multicellulaires sont présentes sur le matériau de référence HA au quatrième jour de culture. Ces structures ont visuellement un diamètre compris entre 50 et 150 μm et les cellules les formant sont peu orientées avec une taille moyenne d'environ 20 μm de diamètre. Les C166 sur le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ forment des structures très similaires de diamètre comparable avec des cellules de taille et de forme comparable. Sur les matériaux Cu_xHA les structures circulaires sont présentes mais sont plus grandes avec un diamètre compris entre 150 et 300 μm . Les cellules composant les structures sont très orientées et sont allongées sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$, avec une longueur cellulaire moyenne d'environ 30 μm . Sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, les cellules sont orientées mais sont arrondies avec un diamètre moyen d'environ 15 μm et ne sont pas toutes connectées entre elles. Les structures circulaires formées sur ce matériau délimitent des zones sans cellules.

Les C166 forment des structures circulaires, apparentées à un processus d'angiogenèse par bourgeonnement, sur tous les matériaux. HA est connue comme non stimulatrice de l'angiogenèse ce qui signifie d'une part que HA comme tous les autres matériaux permettent l'angiogenèse. D'autre part cela signifie que les C166 sont capables de faire de l'angiogenèse *in vitro* spontanément. Ce comportement est documenté (280) pour la majeure partie des modèles de cellules endothéliales cultivées *in vitro*. Ce comportement découlerait de l'induction de la prolifération provoquée par les conditions de culture. De plus les C166 surexpriment le gène *fps* (*fps/fes*). Ce gène peut moduler la signalisation des intégrines et stimulerait constitutivement la sécrétion du VEGF, acteur majeur de l'angiogenèse et son initiation (266) (comme évoqué en sous-partie II.2.2).

L'allongement des cellules observé sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ et l'organisation accrue des C166 en grands fuseaux multicellulaires et structures circulaires sur les matériaux Cu_xHA sont compatibles avec une progression accélérée d'un processus angiogénique par rapport aux cellules sur les matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$.

Sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, les cellules sont plus arrondies que sur les autres matériaux et les structures circulaires n'ont pas de cellules en leur sein. Ces effets pourraient provenir d'un stress cellulaire entraînant des dommages irréversibles conduisant à l'apoptose des cellules lors duquel elles perdent leurs adhérences à leur environnement et s'arrondissent (281). De plus, une surmortalité et/ou un stress cellulaire important inhibant la prolifération des cellules pourrait également expliquer la densité cellulaire plus faible mesurée sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ à 7 jours de culture (Figure 43). S'il s'agit d'un stress, il est possible qu'il provienne de cuivre en solution, cet élément étant capable d'altérer les fonctions du cytosquelette de cellules endothéliales aortiques dès une concentration de 2 μM (220). Il peut aussi s'agir d'un défaut d'adhérence, qui peut entraîner une mortalité cellulaire s'il est prolongé. C'est le phénomène d'anoïkose une forme d'apoptose survenant en l'absence de liaison des intégrines de la cellule (282). Cependant, la raison de sa survenue après 4 jours de culture est difficile à établir s'il n'y a pas de stress cellulaire associé. Il est également possible qu'un stress oxydatif, qui pourrait provenir de cuivre en solution, cause des dommages irréversibles (213) à des composants biologiques essentiels à la mécanotransduction et modifie l'état de tension de la cellule. Un tel phénomène existe *in vivo* avec le glycocalyx, un ensemble de protéines, de sucres et de lipides situés sur la face externe de la membrane plasmique, qui module la déformabilité mécanique des membranes plasmique et protège les cellules endothéliales contre le flux sanguin. Quand ce glycocalyx est dégradé par un stress oxydatif, l'étanchéité des vaisseaux est compromise et les cellules endothéliales sont davantage susceptibles aux stress mécaniques et chimiques environnementaux (283).



L'apparition de nombreuses fibres de stress dans les C166 sur Cu_xHA orientées selon l'axe du fuseau de cellules est caractéristique de la migration de cellules endothéliales lors de l'angiogenèse par bourgeonnement (284). Une partie de ces filaments d'actine pourrait également faire partie du cortex cellulaire. Le cortex cellulaire est une structure spécialisée formée de filaments d'actine reliés à une protéine, la spectrine, et formant un réseau ancré à la face interne de la membrane plasmique (27). Cette structure est importante pour le maintien de la rigidité des cellules et pourrait témoigner de stress mécanique accru en raison de la migration des cellules dans les fuseaux.

La superposition des cellules dans les structures formées par les C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ suggère une organisation contrôlée en 3D. Les amas de C166 visibles au quatrième jour de culture (Figure 42) ont été observés en microscopie biphotonique. La reconstruction 3D des sections optiques de noyaux obtenues par visualisation du Hoechst 33342 est présentée dans la Figure 48.

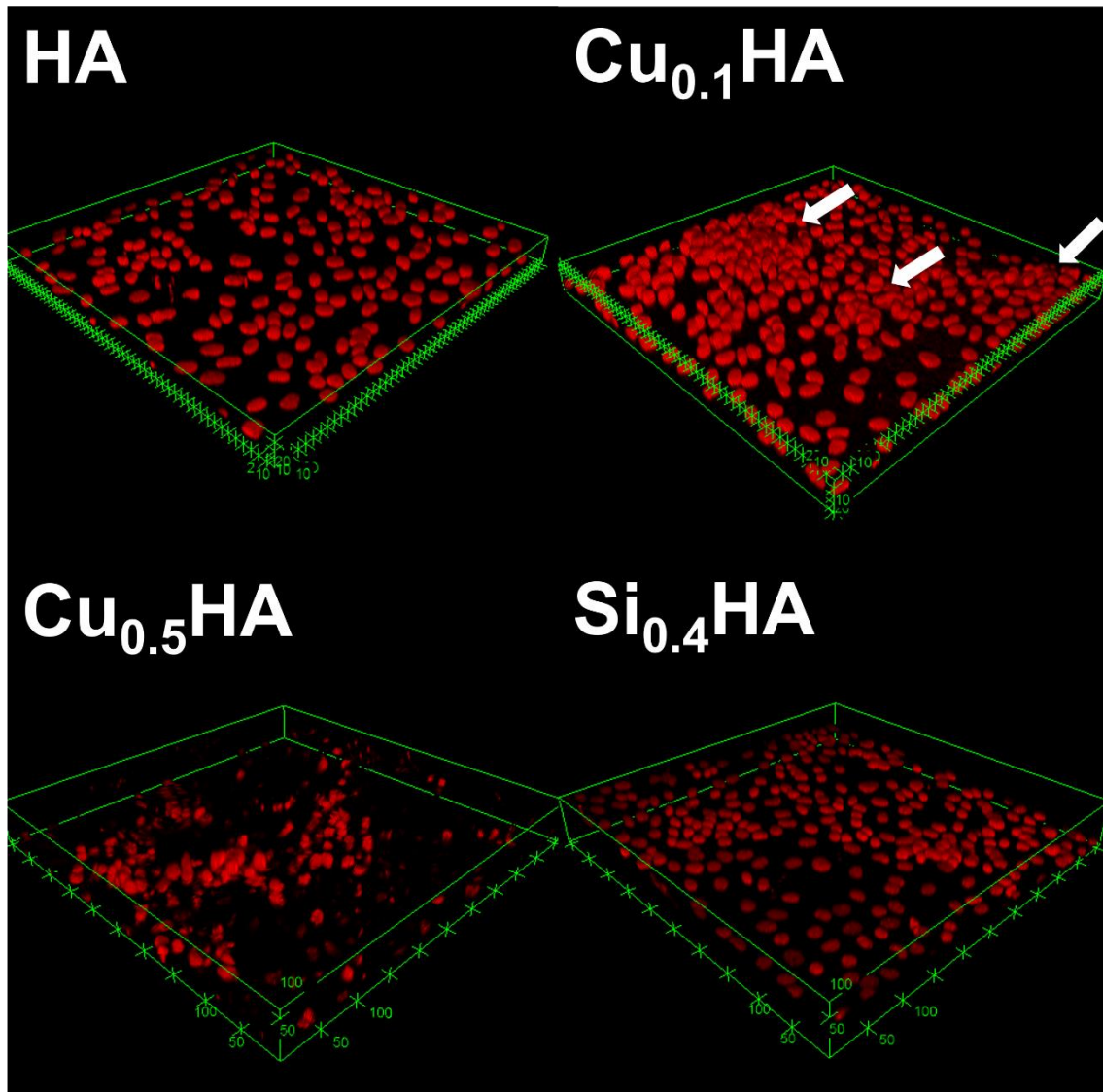


Figure 48 : Observations 3D (biphoton) des noyaux de C166 à la surface de pastilles après 4 jours de culture

Rouge : noyaux. Les flèches blanches indiquent des zones à la densité cellulaire particulièrement importante. Les valeurs des graduations vertes sont en micromètres

La Figure 49 montre un angle différent de représentation en 3D des noyaux des C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ présenté en Figure 48.

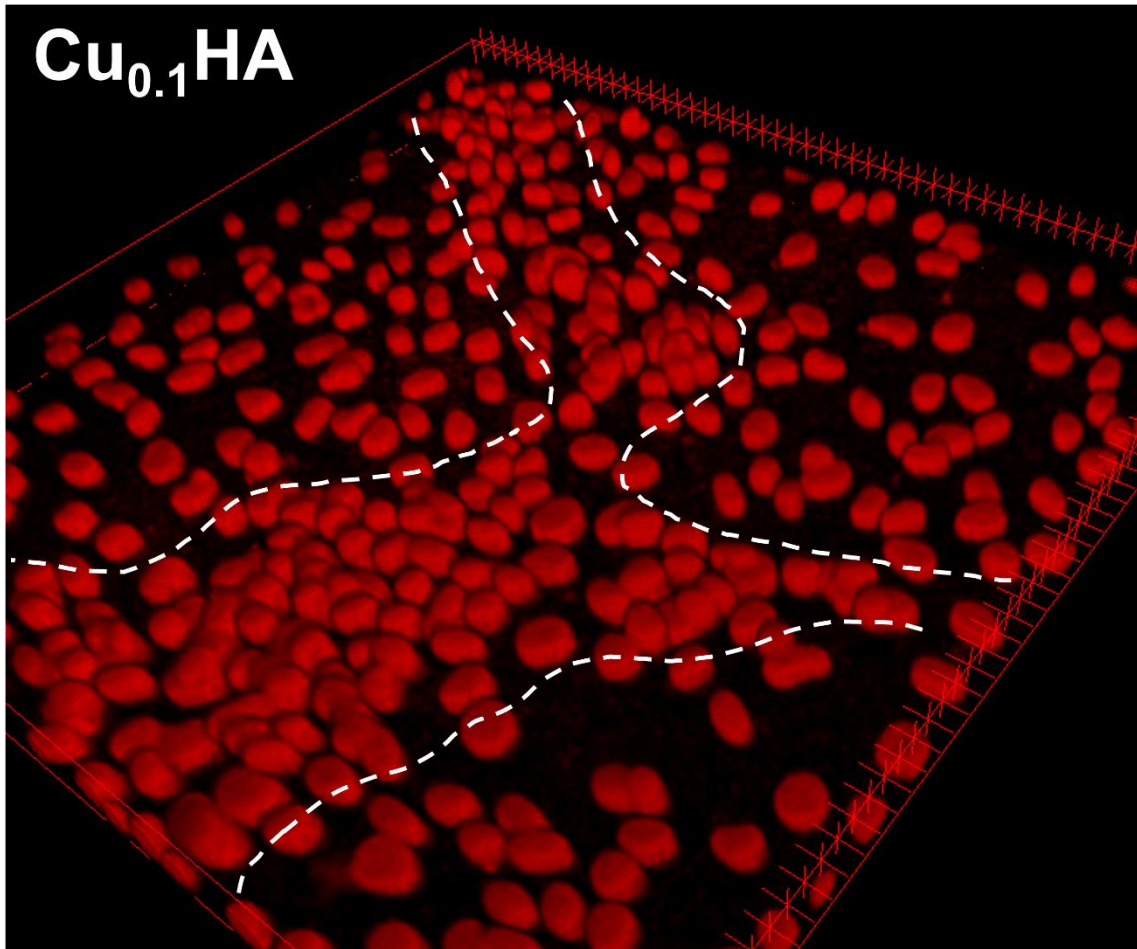


Figure 49 : Observation 3D (biphoton) des noyaux de C166 à la surface d'une pastille de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 4 jours de culture

Rouge : noyaux. Les pointillés en blanc délimitent les zones de forte densité cellulaire et représentent l'organisation supposée des structures formées par les cellules C166. Graduations rouges = 10 μm .

Ces reconstructions 3D des noyaux des C166 (Figure 48) montrent qu'il y a une répartition hétérogène de ceux-ci après 4 jours de culture sur le matériau de référence HA. Des noyaux sont regroupés dans des zones de fortes densités alors que certaines zones n'en contiennent pas ou très peu. Certains noyaux se chevauchent dans les zones de fortes densités. Les noyaux sont répartis d'une manière similaire sur le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ avec également des chevauchements de noyaux. Les noyaux sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ sont également répartis de manière hétérogène mais les zones de fortes densités cellulaires contiennent plus de cellules que sur les matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ (Flèches blanches, Figure 48). Dans ces zones, plus visibles sur l'observation à grossissement plus important (Figure 49), les chevauchements nucléaires sont communs et donnent l'impression d'un empilement de noyaux. Pour des raisons techniques les membranes plasmiques n'ont pas pu être observées dans ces expériences. De ce fait, il n'est pas possible d'affirmer que les noyaux présents superposés sur d'autres correspondent à des cellules détachées du substrat plutôt qu'à des cellules conservant une petite zone d'adhérence sur celui-ci. Le signal récupéré sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ (Figure 48) est dégradé avec des noyaux paraissant incomplets, ou fragmentés. Cela est

vraisemblablement lié à la méthode d'observation et une interaction avec la composition chimique du milieu, pas à une réalité biologique. Malgré ces artefacts, la répartition des noyaux semble similaire à celle observée sur les autres matériaux avec une densité cellulaire hétérogène et des amas de noyaux se chevauchant.

L'organisation des C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ est plus complexe que sur les matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$.

La présence probable d'un chevauchement cellulaire des C166 dans des structures s'apparentant aux fuseaux sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ (Figure 49), l'alignement des cellules et la formation de structures circulaires et de fuseaux sur les deux matériaux Cu_xHA (Figure 47) suggèrent fortement que les cellules C166 sont engagées dans un processus d'angiogenèse en 2D similaire à celui décrit précédemment pour les environnements 3D *in vitro* (36).

III.2.2.1. Instabilité du tissu de cellules sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$

Un phénomène d'instabilité des cellules C166 est présent sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ aux temps de culture de 4 et 7 jours. À ces temps de culture, la couche de cellules C166 est fragile et en cas de nombreuses manipulations (lavages, déplacements...), elle se décolle facilement du matériau. Pour cette raison, les comptages montrés plus haut en Figure 43, tout comme les images en Figure 42, sont issus d'expériences pensées en amont et demandant peu de manipulation pour conserver intacte la couche cellulaire. La Figure 50 regroupe des images d'immunofluorescence de cellules C166 après des manipulations importantes ayant partiellement décollé la couche cellulaire.

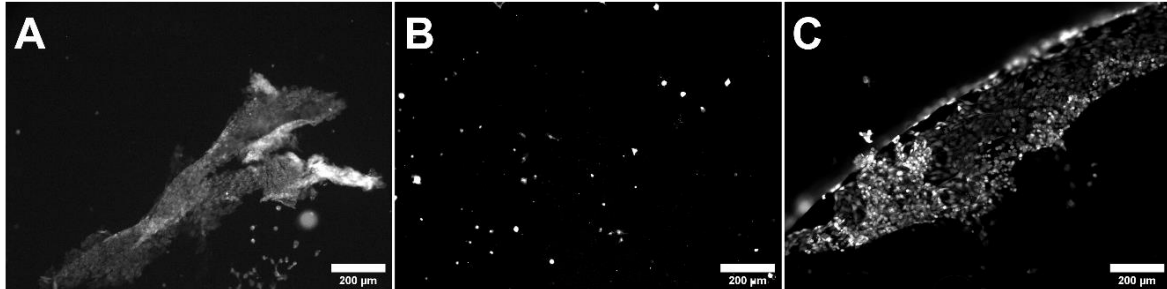


Figure 50 : Décollement des C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 4 jours de culture

Les cellules sont visualisées à l'aide du marqueur calcéine RO. A : couche de C166 s'étant enroulée suite à son décollement ; B : densité cellulaire apparente après le détachement de la majorité des cellules ; C : observation typique du bord des pastilles. Barre d'échelle = 200 µm

Sur ces images de C166 décollées du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ (Figure 50), il est visible sur la Figure 50 A que les cellules se détachent en grappes. Elles restent attachées entre elles et cette couche de cellules tend à s'enrouler. La Figure 50 B illustre que certaines cellules restent attachées au matériau après décollement, bien qu'une partie des objets visualisés sont des débris cellulaires. L'hétérogénéité de la répartition des cellules encore attachées et la faible densité cellulaire observée suggère que le feuillet se détachant est constitué des amas cellulaires observés dans la Figure 43. Le bord typique de pastilles de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ avec des cellules à la bordure qui sont détachées est illustré sur la Figure 50 C. Il n'est pas possible de dire si le maintien des cellules sur les bords des pastilles provient d'un effet mécanique lié à

la proximité du bord ou d'une interaction physique avec la couche de cellules présente sur les côtés des pastilles.

L'arrondissement des cellules et leur absence au sein des structures circulaires (Figure 46 et Figure 47) suggèrent l'existence d'un stress cellulaire et d'apoptose comme discuté précédemment. Par ailleurs, les observations de C166 cultivées à la surface du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ pendant 7 jours révèlent que certains noyaux sont condensés (phénomène non illustré dans cette partie, visible nettement en Figure 64) ce qui est caractéristique de l'apoptose (285) et renforce l'hypothèse que la mortalité observée provienne d'un tel mécanisme. Par ailleurs, en raison du détachement de cellules et de l'arrondissement d'une autre partie d'entre elles, les populations de C166 possèdent vraisemblablement sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ un ancrage moins efficace. Une autre possibilité serait une dégradation excessive des protéines d'ancrage ou des protéines adsorbées à la surface du matériau. Cette dégradation pourrait provenir de cuivre en solution qui est susceptible d'entraîner des dégâts oxydatifs à même d'altérer ou bloquer leur fonction (212).

III.2.3. Activité métabolique

Les mesures de densité cellulaire, le contrôle de l'organisation des cellules et une appréciation de la robustesse mécanique d'une couche de cellules ne sont pas suffisants pour évaluer la biocompatibilité du matériau. Il est important de contrôler l'état de ces cellules et une méthode donnant de bonnes indications à l'échelle de la population cellulaire est la mesure de l'activité métabolique. L'activité métabolique des C166 est mesurée grâce au test du MTT. Ce test entraîne le développement d'une coloration proportionnelle au niveau d'activité d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire et peu sujettes à variation en condition normale. L'absence d'activité de ces enzymes intervient généralement suite à des phénomènes cytotoxiques. Ce test permet de comparer les populations de cellules viables. Les résultats sont présentés dans la Figure 51.

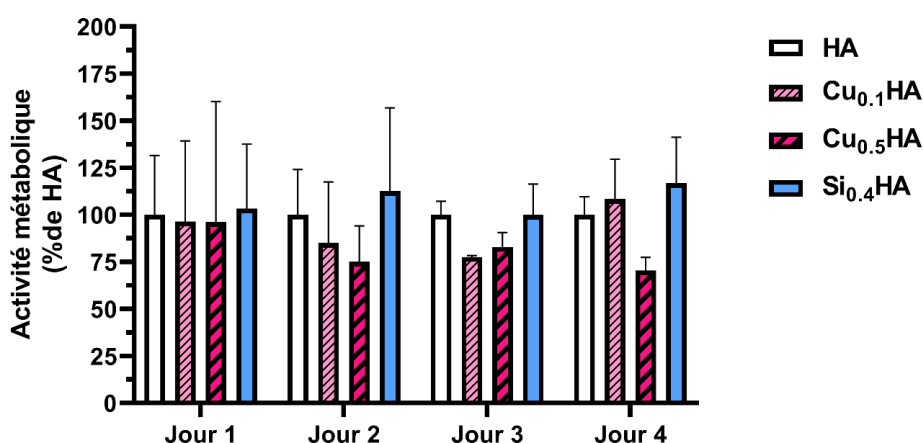


Figure 51 : Activité métabolique des cellules C166 exprimée en pourcentage de la moyenne des valeurs obtenues pour les cellules cultivées sur le matériau HA

Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. Nombre d'échantillons indépendants : Jour 1 et Jour 2 $n > 3$, Jour 3 et Jour 4 $n = 3$.

L'activité métabolique des C166 (Figure 51) sur le matériau HA est considérée pour chaque jour de culture comme la référence valant 100%. Le matériau HA est biocompatible et les

cellules à sa surface sont viables. Les variations d'activité métabolique observées sont liées aux différences de densité d'ensemencements, visibles sur la Figure 43, et aux variations inter-expérimentales. L'activité métabolique des C166 sur les matériaux Cu_xHA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ est comparable à celle observée sur le matériau de référence HA à tous les temps de culture. Les valeurs oscillent entre 80 et 120% \pm l'écart-type de l'activité métabolique des C166 sur HA.

Ces résultats sont cohérents avec les mesures de densité cellulaire (Figure 43) et attestent que les cellules C166 sont présentes dans des quantités comparables jusqu'au jour 4 de culture sur les différents matériaux. La mesure de l'activité métabolique n'informe pas à elle seule sur la dynamique mortalité/prolifération. Par conséquent, il est nécessaire de mesurer le taux de mortalité et le taux de prolifération pour savoir si les variations de densité cellulaire (Figure 43) observées sont liées à des taux de mortalité différents et/ou à des taux de prolifération différents. En effet, il pourrait exister, pour une condition, une population cellulaire proliférant très vite avec un taux de mortalité élevé qui présente une densité cellulaire comparable à une autre condition proliférant peu mais sans mortalité cellulaire. De plus, dans la mesure où les dommages cellulaires peuvent entraîner des hausses d'activité métabolique (286) et que la génération d'ions superoxydes peut fausser les résultats (287), une situation envisageable en présence de cuivre, il est nécessaire de vérifier l'état des cellules par des méthodes plus directes.

III.2.4. Mortalité des C166

La mortalité cellulaire est mesurée par l'incorporation de la molécule intercalante de l'ADN et fluorescente IP. Cette molécule ne peut pas passer à travers les membranes plasmiques intactes et permet ainsi de visualiser uniquement les noyaux des cellules en nécrose ou en apoptose tardive. La Figure 52 montre les noyaux de C166 marqués par IP et ceux marqués par le Hoechst 33342 après 7 jours de culture où les premières différences significatives d'incorporation de l'IP sont observées.

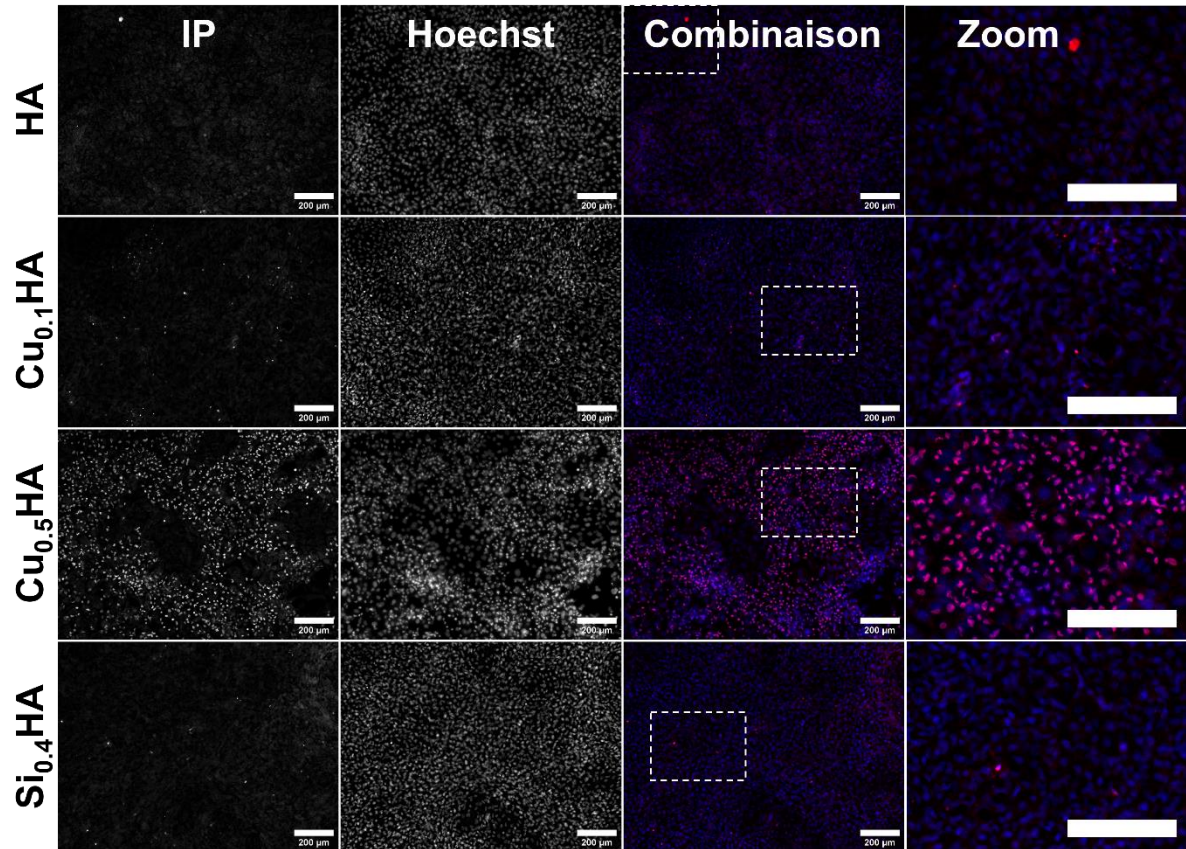


Figure 52 : Localisation de la mortalité des cellules C166 après 7 jours de culture sur les matériaux
 Cadre en pointillés : zone du zoom. Rouge : Iodure de propidium. Bleu : Noyaux. Les noyaux positifs à l'iodure de propidium apparaissent roses par superposition des couleurs. Barre d'échelle = 200 µm.

La visualisation des cellules marquées à l'IP (Figure 52) après 7 jours de culture montre que sur le matériau de référence HA très peu de cellules sont mortes. Similairement, très peu de mort cellulaire est observée parmi les C166 sur le matériau Si_{0.4}HA. Sur le matériau Cu_{0.1}HA il semble y avoir plus de cellules mortes que sur l'HA et cette mortalité est visible au niveau des zones de forte densité cellulaire. Sur le matériau Cu_{0.5}HA, une nette surmortalité des cellules C166 est observée et ces cellules mortes sont localisées majoritairement dans les zones de forte densité cellulaire. Les zones faiblement grisées dans la colonne IP pour HA et Si_{0.4}HA (Figure 52) sont du bruit de fond, seuls les marquages les plus intenses sont ceux de noyaux

marqués. Les taux de mortalité mesurés à 1, 4 et 7 jours de culture sont présentés dans la Figure 53.

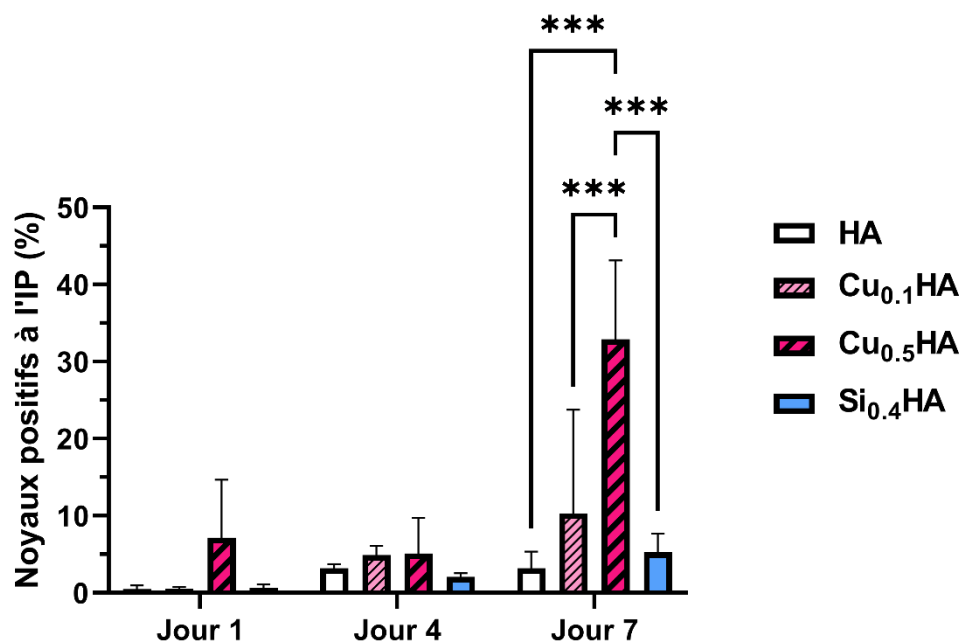


Figure 53 : Mortalité des cellules C166 à la surface des pastilles exprimée en pourcentage de cellules mourantes sur la population cellulaire totale mesurée par contremarquage nucléaire au Hoechst 33342

Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. *** : p-value < 0,001.
Nombre d'échantillons indépendants = 3

Les taux de mortalité des cellules C166 (Figure 53) sur le matériau de référence HA est d'environ 0,5% à 1 jour de culture et d'environ 5% à 4 et 7 jours de culture. A ces temps de culture, des taux de mortalité cellulaire comparables sont observés sur le matériau Si_{0.4}HA. Des taux de mortalité cellulaire similaires sont également observés sur les matériaux Cu_xHA au jour 1 et au jour 4. Au septième jour de culture, le taux de mortalité des C166 est significativement plus élevé sur le matériau Cu_{0.5}HA avec 32,9% ± 10,3% de cellules mourantes contre des valeurs de mortalité sur HA de 3,2% ± 2,2%, sur Cu_{0.1}HA de 10,3% ± 13,4% et sur Si_{0.4}HA de 5,3% ± 2,4%.

En raison de la forte condensation des noyaux des C166 marqués par l'IP (phénomène visible dans la condition Cu_{0.5}HA en Figure 53 et particulièrement en Figure 64 présentée ultérieurement), la mortalité observée peut être associée à un phénomène d'apoptose plutôt que de nécrose (285).

La surmortalité des C166 observée après 7 jours de culture sur le matériau Cu_{0.5}HA s'explique probablement par sa chimie et en particulier sa concentration en cuivre. Si ce cuivre est relargué et atteint des concentrations suffisantes en solution, des effets cytotoxiques peuvent survenir. Les concentrations de cuivre susceptibles d'entraîner de tels effets sont comprises entre 20 µM à 200 µM de cuivre selon les études et les lignées de cellules endothéliales (220), (217), (11). Les concentrations d'espèces chimiques en solution ont été mesurées et sont présentées ultérieurement dans la sous-partie III.2.6.

III.2.5. Prolifération des C166

La mesure du taux de prolifération est réalisée par observation de l'incorporation de l'EdU, un analogue de la thymidine, une base de l'ADN, qui est intégré par les cellules en prolifération lors de la phase S du cycle cellulaire où l'ADN est répliqué. La Figure 54 présente, en fausse couleur, la superposition des noyaux des cellules C166 en cours de prolifération, marqués par l'EdU, et du contremarquage nucléaire au Hoechst 33342 après 3 jours de culture sur les matériaux.

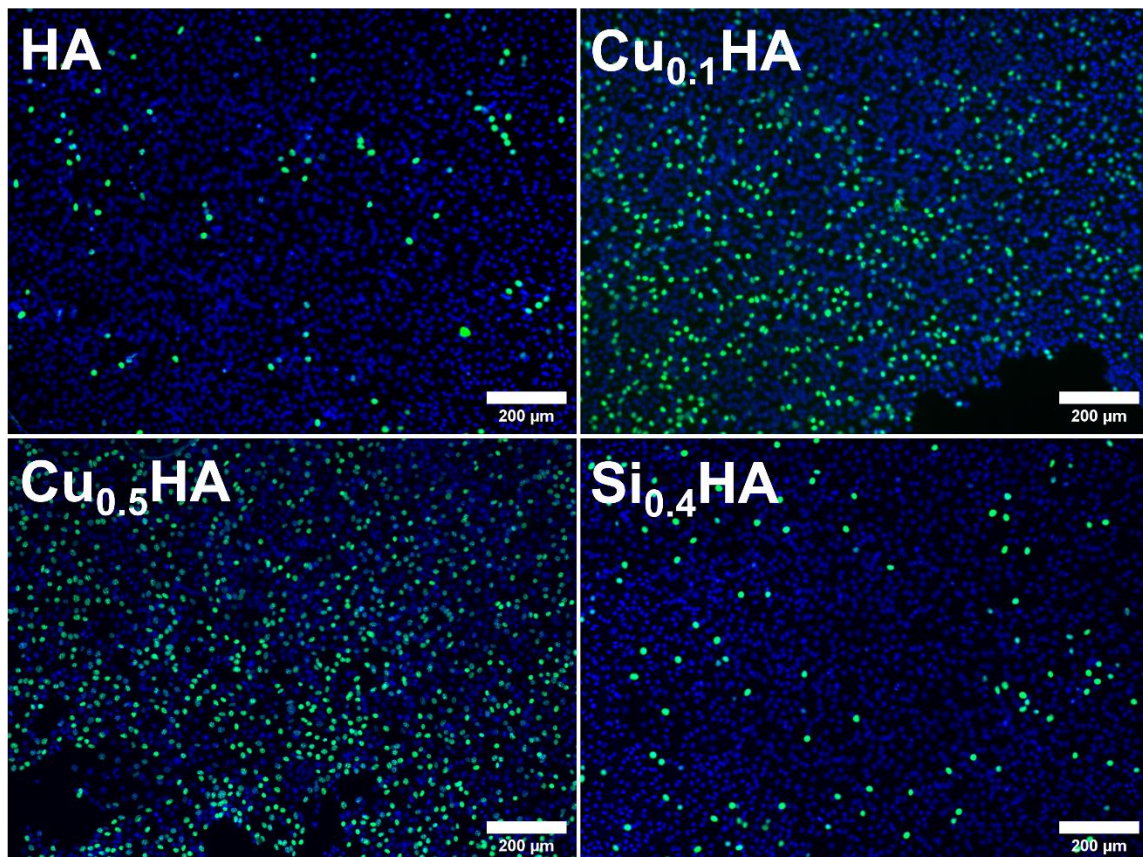


Figure 54 : Localisation des noyaux de C166 proliférantes après 3 jours de culture sur les matériaux
Bleu : noyaux ; Vert : EdU. Barre d'échelle = 200 µm.

Les cellules C166 proliférantes au troisième jour de culture (Figure 54) sur le matériau de référence HA sont peu nombreuses et distribuées aléatoirement. Cela signifie que la population de cellules se multiplie de manière homogène en tout point du matériau. La prolifération des C166 sur le matériau Si_{0.4}HA est comparable à celle observée sur l'HA. Sur les matériaux Cu_xHA, les C166 prolifèrent beaucoup plus que sur les matériaux HA et Si_{0.4}HA tout en conservant une distribution aléatoire des cellules proliférantes. Les zones sans cellules observées sur Cu_{0.1}HA et Cu_{0.5}HA (Figure 54) ne sont pas exclusives à ces conditions et proviennent de la densité cellulaire présente au jour 3 (Figure 43). Cette densité cellulaire est équivalente à la surface de tous les matériaux et laisse encore quelques espaces non colonisés.

La Figure 55 présente les taux de prolifération calculés en rapportant le nombre de cellules positives à l'EdU sur le nombre total de cellules mesuré par contremarquage nucléaire au Hoechst 33342.

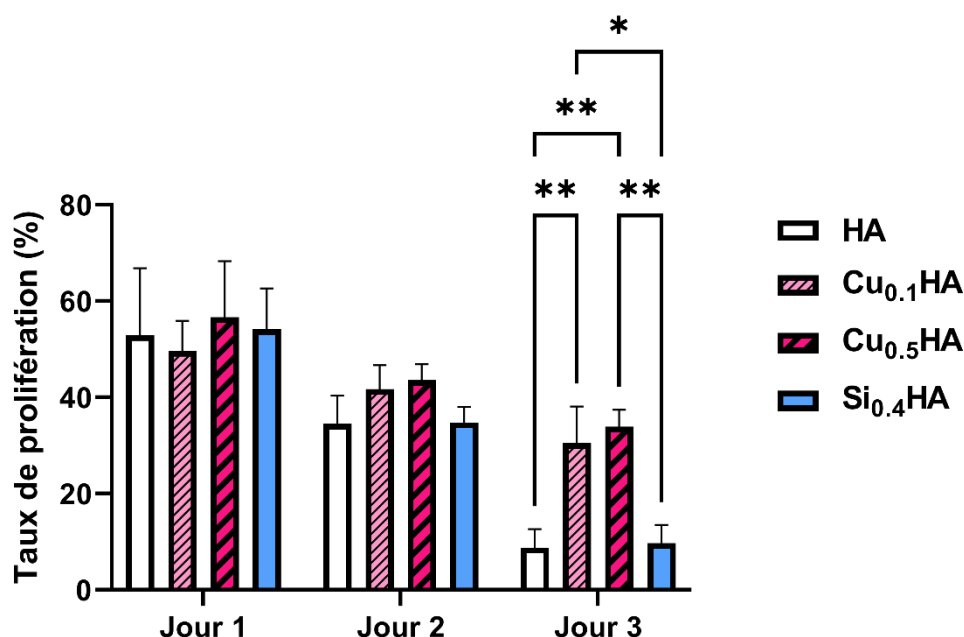


Figure 55 : Taux de prolifération des cellules C166 sur les matériaux

Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005. Nombre d'échantillons indépendants = 3

Le taux de prolifération des C166 (Figure 55) sur le matériau de référence HA est d'environ 50% après 1 jour de culture, 35% après 2 jours de culture et 9% au troisième jour de culture. Les taux de prolifération des C166 sur le matériau Si_{0.4}HA sont équivalents à tous les temps à ceux sur l'HA. Sur les matériaux Cu_xHA, les taux de prolifération des C166 sont comparables à ceux sur l'HA au jour 1 et au jour 2. Au jour 3, les taux de prolifération sont significativement augmentés sur les matériaux Cu_xHA par rapport à ceux sur l'HA et Si_{0.4}HA avec sur Cu_{0.1}HA 30,5% ± 7,6% et sur Cu_{0.5}HA 33,9% ± 3,6% contre pour HA 8,8% ± 3,8% et sur Si_{0.4}HA à 9,7% ± 3,9% de cellules proliférantes.

A cause des nombreuses manipulations inhérentes à la méthode de mesure, un phénomène de décollement cellulaire, tel que celui présenté en Figure 50 sur le matériau Cu_{0.5}HA, est observé sur tous les matériaux lors des études à 4 jours de culture. En conséquence, la mesure de l'incorporation de l'EdU n'a pas pu être réalisée efficacement au-delà de 3 jours de culture.

La diminution de la prolifération des cellules C166 au cours du temps jusqu'à un taux d'environ 9% au troisième jour de culture (Figure 55) est un phénomène attendu lié à la densité cellulaire et aux inhibitions de contact qui en résultent. Cela explique qu'au temps maximal des mesures, le taux de prolifération est le plus faible car les C166 atteignent une confluence proche de 100% sur tous les matériaux (Figure 54). Quand les cellules entrent en contact, les jonctions adhérentes nouvellement formées entraînent l'arrêt de la prolifération en inhibant l'activation de la protéine kinase Akt qui est un activateur majeur de la croissance cellulaire (288) (289).

Dans des cellules endothéliales quiescentes, les jonctions adhérentes formées par la VE-Cadhérine sont une source d'inhibition de contact (290). L'existence de cellules proliférantes malgré cette inhibition de contact s'explique probablement par la nature du proto-oncogène *fps/fes* exprimé en plusieurs copies dans les C166, discutée en sous-partie II.2.2. Ce proto-oncogène code pour la protéine tyrosine kinase Fps/Fes (Fujinami poultry sarcoma/Feline sarcoma), celle-ci est à priori capable de modifier l'intégration des signaux extracellulaires passant par le cytosquelette des C166. Cela passerait par des interactions, d'après nos connaissances, non élucidées au sein des complexes intracellulaires des adhésions focales. Ces interactions stimuleraient l'activation de la voie ERK/MAPK (Extracellular signal-regulated kinases/Mitogen-activated protein kinases) et de facteurs de transcription mitogéniques associés (266).

Les matériaux Cu_xHA stimulent la prolifération des C166 au troisième jour de culture mais la densité cellulaire n'est pas plus importante sur ces conditions aux jours 3 ou 4 de culture (Figure 43). Cela peut s'expliquer si la stimulation est rapidement compensée par l'accroissement des inhibitions de contact permettant aux autres conditions d'atteindre des densités cellulaires comparables.

Cette stimulation de la prolifération pourrait s'expliquer par la présence de cuivre. Celui-ci est capable, dès 5 μM , d'augmenter la prolifération d'HUVEC (13). Ce seuil est plus bas que ceux théoriquement nécessaires à l'apparition de la mortalité cellulaire constatée précédemment sur le matériau $Cu_{0.5}HA$ après 7 jours de culture (Figure 53). Un effet stimulateur du cuivre après 3 jours de culture et une mortalité augmentée après 7 jours de culture pourrait s'expliquer par un relargage progressif du cuivre ou une toxicité chronique. Les concentrations d'espèces chimiques en solution ont été mesurées et sont présentées ultérieurement dans la sous-partie III.2.6.

III.2.6. Relargage d'éléments chimiques par les matériaux

Les éléments présents dans les CPCs (calcium, phosphore, cuivre, silicium...) sont tous susceptibles d'avoir des effets biologiques si leur concentration dépasse un seuil comme discuté dans la sous-partie I.5.2.2. Les CPCs ont toujours un certain degré de solubilité dans un milieu aqueux et une partie de leurs éléments chimiques y sera retrouvée (6). Cependant, il n'est pas garanti que ces éléments se retrouvent en solution libres ou liés à des chaperons protéiques car des échanges dynamiques entre les matériaux et le milieu sont possibles tout comme une utilisation rapide par les cellules n'est pas à exclure. Il est donc essentiel de mesurer les éléments chimiques présents dans les milieux des matériaux. Pour cela, le calcium, le phosphore, le cuivre et le silicium sont dosés par ICP-OES. Les dosages sont réalisés sur des milieux surnageants des pastilles de ϕ 10 et ϕ 13. Pour rappel, comme décrit en sous-partie II.2.6.1, les milieux de culture n'ont pas été renouvelés. L'étude de la biocompatibilité présentée précédemment a été réalisée intégralement sur des pastilles ϕ 10 comme précisé en sous-partie II.2.6.1. L'étude présentée ultérieurement en Partie IV a été réalisée avec des pastilles ϕ 10 et ϕ 13, ceci explique l'étude du relargage des éléments chimiques par les deux tailles de pastille dans les paragraphes suivants.

La Figure 56 présente les mesures du calcium en solution.

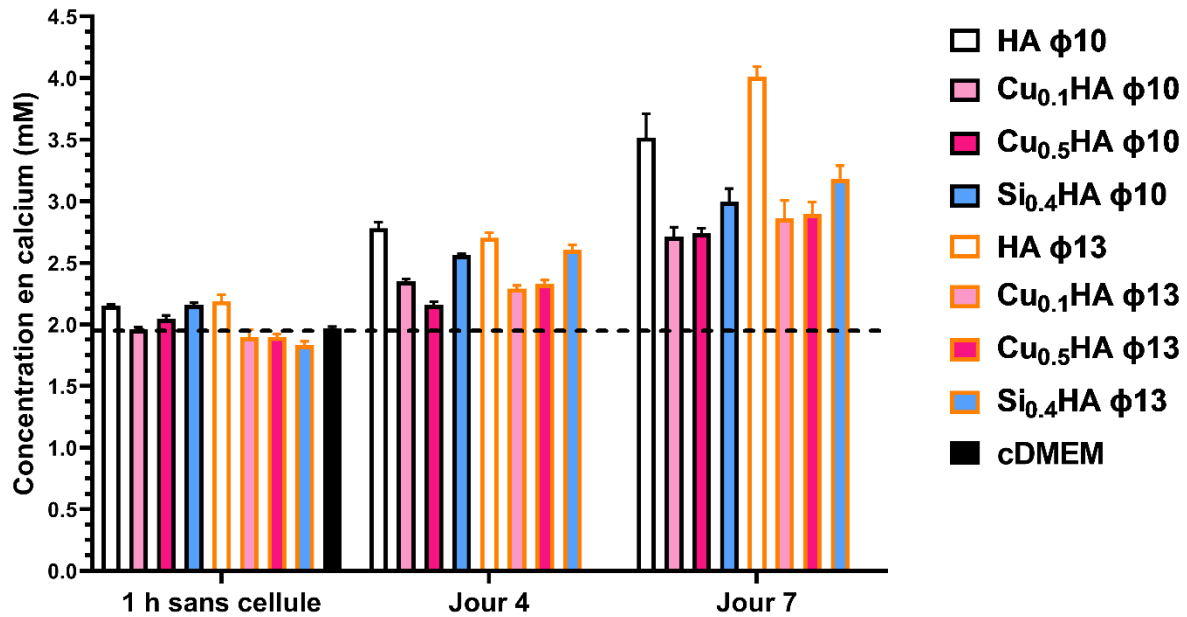


Figure 56 : Concentrations de calcium en solution en présence de pastilles

Données issues du regroupement de 5 à 7 échantillons indépendants de milieux et mesurés lors d'une unique série d'analyse réalisant trois mesures séquentielles. Jour 4 et 7 : milieux de pastilles sur lesquelles des C166 sont présentes. Ligne pointillée : moyenne du niveau de base (cDMEM)

Les mesures de concentration en calcium dans le milieu de pastilles des différents matériaux (Figure 56) montrent que les pastilles relâchent toutes du calcium dans le milieu. Les milieux en présence des pastilles pendant 1 h et en l'absence de cellules ont des concentrations de calcium très proches de celle du milieu de culture seul soit environ 2 mM.

A 4 jours de culture en présence de cellules C166, la concentration de calcium dans le milieu augmente avec pour les ϕ 10 : HA : $2,78 \pm 0,05$ mM, Cu_{0.1}HA : $2,35 \pm 0,02$ mM, Cu_{0.5}HA : $2,16 \pm 0,02$ mM et Si_{0.4}HA : $2,56 \pm 0,01$ mM. Pour les ϕ 13 HA : $2,7 \pm 0,05$ mM, Cu_{0.1}HA : $2,29 \pm 0,03$ mM, Cu_{0.5}HA $2,33 \pm 0,03$ mM et Si_{0.4}HA : $2,6 \pm 0,04$ mM.

A 7 jours de culture en présence de C166, la concentration de calcium dans le milieu augmente encore par rapport à 4 jours avec pour les ϕ 10 : HA : $3,52 \pm 0,19$ mM, Cu_{0.1}HA : $2,71 \pm 0,08$ mM, Cu_{0.5}HA : $2,74 \pm 0,04$ mM et Si_{0.4}HA : $3 \pm 0,1$ mM. Pour les ϕ 13 HA : $4,01 \pm 0,08$ mM, Cu_{0.1}HA : $2,86 \pm 0,15$ mM, Cu_{0.5}HA $2,90 \pm 0,1$ mM et Si_{0.4}HA : $3,18 \pm 0,11$ mM.

La plus faible concentration de calcium en présence de Cu_xHA suggère une plus faible solubilité de l'apatite, néanmoins celle-ci n'a pas été étudiée précédemment. L'effet biologique potentiel de ces concentrations est discuté à la fin de cette sous-partie.

Les mesures du phosphore en solution sont présentées dans la Figure 57.

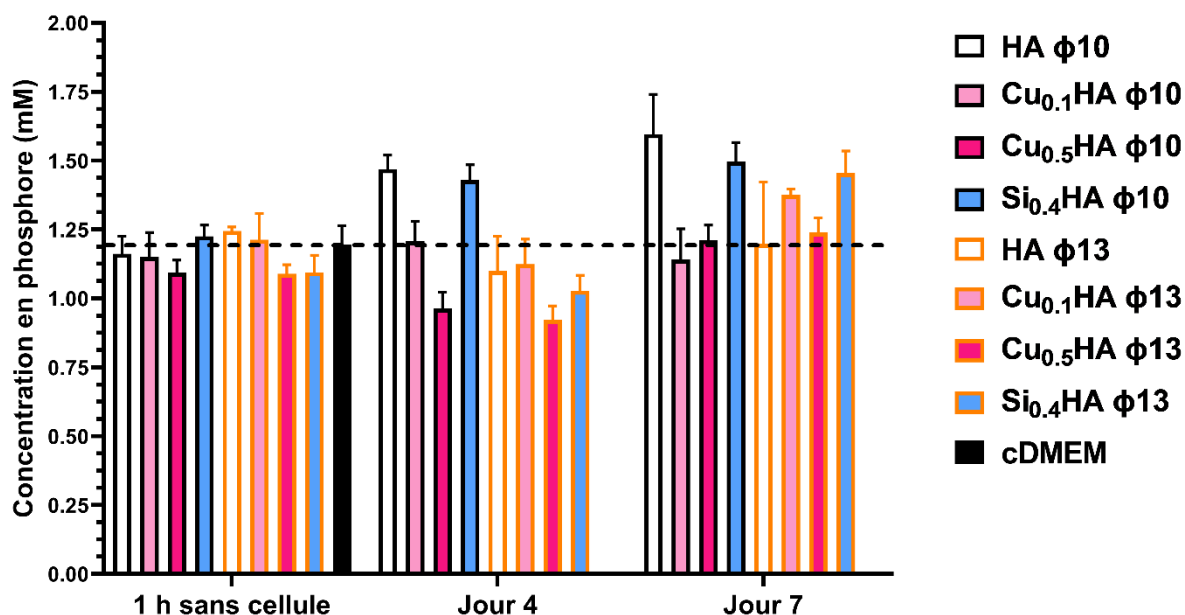


Figure 57 : Concentrations de phosphore en solution en présence de pastilles

Données issues du regroupement de 5 à 7 échantillons indépendants de milieux et mesurés lors d'une unique série d'analyse réalisant trois mesures séquentielles. Jour 4 et jour 7 : milieux de pastilles sur lesquelles des C166 sont présentes. Ligne pointillée : moyenne du niveau de base (cDMEM)

La concentration en phosphore dans le milieu de pastilles des différents matériaux (Figure 57) à 1 h en absence de cellules est comparable entre tous les milieux et est similaire à celle du milieu sans matériau, à savoir 1,2 mM. Les concentrations en phosphore évoluent par la suite différemment selon les matériaux et la taille des pastilles utilisées.

A 4 jours de culture en présence de C166 les différentes concentrations de phosphore mesurées dans les milieux sont pour les φ10 : HA : $1,47 \pm 0,05$ mM, Cu_{0.1}HA : $1,21 \pm 0,08$ mM, Cu_{0.5}HA : $0,96 \pm 0,06$ mM et Si_{0.4}HA : $1,43 \pm 0,06$ mM. Pour les φ13 HA : $1,1 \pm 0,13$ mM, Cu_{0.1}HA : $1,12 \pm 0,09$ mM, Cu_{0.5}HA $0,92 \pm 0,05$ mM et Si_{0.4}HA : $1,03 \pm 0,06$ mM.

A 7 jours de culture en présence de C166 la concentration de phosphore dans le milieu augmente par rapport à 4 jours, sauf pour Cu_{0.1}HA φ10 qui reste similaire avec pour les φ10 : HA : $1,60 \pm 0,14$ mM, Cu_{0.1}HA : $1,14 \pm 0,11$ mM, Cu_{0.5}HA : $1,21 \pm 0,05$ mM et Si_{0.4}HA : $1,5 \pm 0,07$ mM. Pour les φ13 HA : $1,20 \pm 0,22$ mM, Cu_{0.1}HA : $1,38 \pm 0,02$ mM, Cu_{0.5}HA $1,24 \pm 0,05$ mM et Si_{0.4}HA : $1,45 \pm 0,08$ mM.

Les données à 7 jours en présence de cellules montrent qu'il existe une solubilisation du phosphore puisque les concentrations augmentent toutes par rapport au jour 4 à l'exception de Cu_{0.1}HA en φ10 (Figure 57). L'effet biologique de ces concentrations est discuté à la fin de cette sous-partie.

Les mesures du cuivre en solution sont présentées dans la Figure 58.

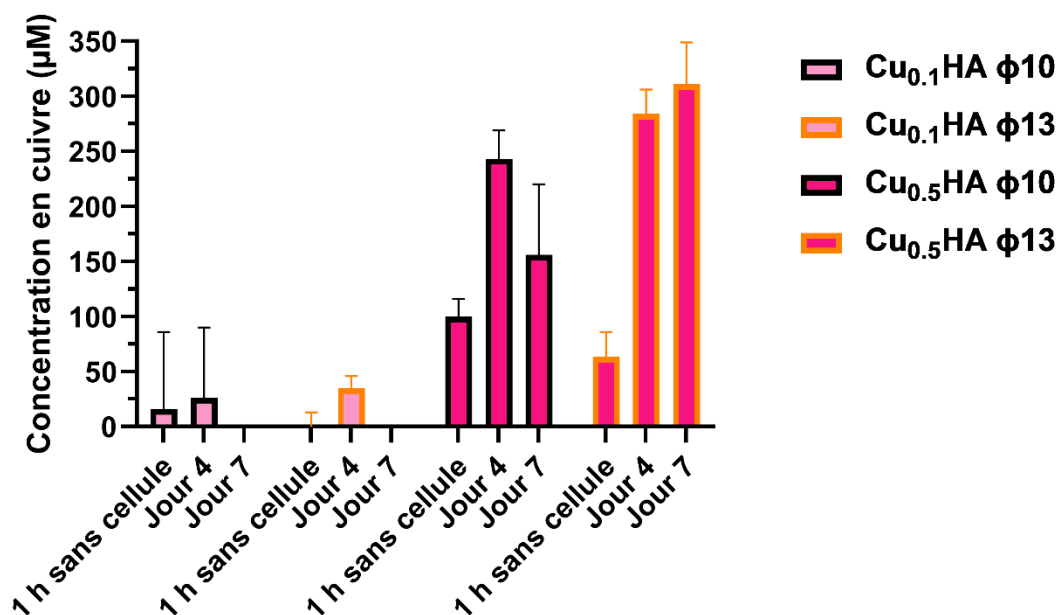


Figure 58 : Concentrations de cuivre en solution en présence de pastilles

Données issues du regroupement de 5 à 7 échantillons indépendants de milieux et mesurés lors d'une unique série d'analyse réalisant trois mesures séquentielles. Jour 4 et jour 7 : milieux de pastilles sur lesquelles des C166 sont présentes.

Le cuivre n'étant pas présent dans le milieu seul et dans celui conditionné par HA et Si_{0.4}HA, seules les concentrations de cuivre dans le milieu des pastilles de Cu_xHA sont présentées (Figure 58). Les concentrations en cuivre dans les milieux sont :

- avec le matériau Cu_{0.1}HA φ10 à 1 h en présence de milieu de culture : 16 ± 70 µM, après 4 jours en présence de C166 : 26 ± 64 µM. Après 7 jours en présence de C166, le cuivre n'est pas détecté dans le milieu.
- Pour les Cu_{0.1}HA φ13 1 h en présence de milieu de culture : 2 ± 35 µM, après 4 jours en présence de C166 : 35 ± 11 µM. Après 7 jours en présence de C166, le cuivre n'est pas détecté dans le milieu.
- Pour les Cu_{0.5}HA φ10 à 1 h en présence de milieu de culture : 100 ± 16 µM, après 4 jours en présence de C166 : 243 ± 26 µM, après 7 jours en présence de C166 : 156 ± 64 µM.
- Pour les Cu_{0.5}HA φ13 à 1 h en présence de milieu de culture : 63 ± 23 µM, après 4 jours en présence de C166 : 284 ± 22 µM, après 7 jours en présence de C166 : 311 ± 38 µM.

La diminution de la concentration de cuivre dans le milieu entre 4 et 7 jours de culture peut être le fait d'une précipitation à la surface du matériau, du puits ou d'une internalisation par les C166. L'absence de diminution constatée sur Cu_{0.5}HA φ13 à 7 jours en présence de C166 est peut-être due à une plus grande présence de cuivre disponible en raison d'une moindre internalisation par les cellules. L'effet biologique de ces concentrations est discuté à la fin de cette sous-partie. L'absence de détection du cuivre pour Cu_{0.1}HA φ10 à 7 jours et pour Cu_{0.1}HA φ13 à 1 h et 7 jours signifie que celui-ci est en-dessous des concentrations minimales

déTECTABLES par l'appareil utilisé. D'après les conditions expérimentales la concentration en cuivre minimale détectable pour $\text{Cu}_{0.1}\text{HA } \phi 10$ à 7 jours est de 2,6 ppm soit environ 41 μM , pour $\text{Cu}_{0.1}\text{HA } \phi 13$ à 1 h de 1,2 ppm soit 19 μM et pour $\text{Cu}_{0.1}\text{HA } \phi 13$ à 7 jours de 2,6 ppm soit environ 41 μM .

Le silicium en solution a été recherché car celui-ci est à priori soluble dans les conditions expérimentales, à savoir un milieu aqueux à 37°C avec un pH oscillant autour de 7 (229). Cependant, celui-ci n'a pas été détecté, ce qui indique d'après les limites techniques de l'appareil utilisé et des conditions expérimentales que les concentrations de silicium en solution sont inférieures à 1,2 ppm soit environ 40 μM .

Suite à ces expériences, il est possible d'extraire des informations détaillées dans les paragraphes suivants.

Les mesures de relargage des éléments calcium (Figure 56) et phosphore (Figure 57) confirment la solubilité de tous les matériaux. Les variations des concentrations de ces éléments chimiques (et du cuivre en Figure 58) au cours du temps montrent l'existence d'équilibres dynamiques avec peut-être des précipitations ou des internalisations des éléments par les cellules.

Les concentrations de calcium n'ont vraisemblablement pas d'impact sur la biocompatibilité des matériaux. Comme évoqué dans la sous-partie I.5.2.2.1, une augmentation de la concentration de calcium extracellulaire est susceptible d'augmenter passivement et de manière proportionnelle la concentration intracellulaire de calcium, sans que cette augmentation provienne de calcium stocké dans les organites de la cellule (183). Mais cela n'est pas suffisant pour activer des voies de signalisation qui nécessitent une variation soudaine et importante de sa concentration (plusieurs ordres de magnitude supérieurs à la concentration basale). Toujours d'après les données de la bibliographie, l'effet des concentrations mesurées sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales n'est pas connu mais elles ne devraient pas être défavorables à leur fonction ou leur développement (183), (184).

D'après les données de la sous-partie I.5.2.2.2, les concentrations de phosphore retrouvées ne sont pas susceptibles d'affecter les cellules endothéliales de façon significative. Les variations par rapport au niveau de base sont peu importantes avec une augmentation maximale de 0,4 mM en 7 jours pour un maximum de 1,6 mM dans le milieu contenant le matériau HA. Le phosphore est cytotoxique à partir de 2,5 mM sous forme inorganique (194), (291). Les cellules C166 sur l'HA ont le plus faible taux de mortalité de l'expérience (Figure 53) alors que leur milieu a la plus forte concentration de phosphore ce qui suggère que les concentrations rencontrées dans cette étude sont non cytotoxiques.

Le silicium n'est pas retrouvé dans le milieu des matériaux $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ ce qui suggère qu'il peut avoir précipité à la surface du matériau et/ou que le silicium sous forme soluble a une concentration inférieure à 40 μM . Les mesures de calcium (Figure 56) et de phosphore (Figure 57) issus du matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ attestent qu'il se solubilise. Du silicium en faible concentration doit donc être présent en solution à des niveaux non détectables. Des concentrations de silicium d'environ 25 μM sont capables de stimuler des processus angiogéniques comme la formation de tubules dans du Matrigel™ ou d'accroître la sécrétion de VEGF (234). Il est donc possible que le silicium relâché par les matériaux $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ soit en concentration suffisante pour avoir un effet positif sur l'activité angiogénique des cellules endothéliales sans qu'il soit détecté mais aucun effet n'a été détecté sur la biocompatibilité.

Le cuivre mesuré dans le milieu des matériaux Cu_xHA ϕ 10 pourrait expliquer les phénomènes observés sur ces matériaux par rapport à HA. D'après les données de la sous-partie I.5.2.2.3, le cuivre en solution stimule la prolifération de cellules endothéliales avec des concentrations efficaces rapportées dès 5 μM et un effet dose-dépendant (13). Après 3 jours de culture sur les matériaux Cu_xHA , la prolifération des C166 est triplée (Figure 55), la concentration de cuivre n'a pas été mesurée à ce temps de culture mais les mesures au jour 4 (Figure 58) indiquent que les concentrations pour $Cu_{0.1}HA$ et pour $Cu_{0.5}HA$ sont proches de 35 μM et 243 μM respectivement. Ces concentrations sont susceptibles d'accroître la prolifération des cellules endothéliales. Les cellules ne prolifèrent pas plus que celles sur les matériaux HA et $Si_{0.4}HA$ avant 3 jours de culture, cela pourrait provenir d'un taux de prolifération natif très important des C166 en raison de leur nature transgénique qui placerait les cellules au maximum de leur capacité proliférative en condition basale. Le cuivre pourrait alors forcer la prolifération des cellules malgré les inhibitions de contact en simulant une hypoxie via la génération de ROS (64). D'après les données de la sous-partie I.5.2.2.3.2, cela peut être suffisant pour stimuler la prolifération de cellules endothéliales en activant l'angiogenèse. Parallèlement, la génération de ROS pourrait permettre la surexpression de MMP-9 (292)(293) qui peut dégrader les sites extra-cellulaires de la VE-Cadhérine aux jonctions adhérentes (79). La VE-Cadhérine est un inhibiteur de la prolifération induite par le VEGF (294), comme rapporté en sous-partie I.2.5.1, et participe aux inhibitions de contact (290).

La présence de cuivre dans le milieu des Cu_xHA renforce l'hypothèse que les structures multicellulaires observées (Figure 47) sont issues d'un processus angiogénique accéléré car des concentrations de cuivre inférieures à 1 μM sont capables de stimuler l'expression du marqueur d'initiation de l'angiogenèse VEGF et d'eNOS (218). Cet aspect sera traité en détail dans la Partie IV.

III.2.7. Conclusion de l'étude de la biocompatibilité en modèle statique

Cette étude a évalué les aspects fondamentaux de l'état physiologique d'une population cellulaire : la morphologie (sous-partie III.2.2), le métabolisme (sous-partie III.2.3), la prolifération (sous-partie III.2.5), la mortalité (sous-partie III.2.4).

La conclusion de cette étude de biocompatibilité *in vitro* est que les matériaux dopés $Cu_{0.1}HA$ et $Si_{0.4}HA$ sont biocompatibles pour les cellules C166. Tous les paramètres étudiés démontrent que les cellules se développent de façon appropriée et possèdent des viabilités comparables au matériau de référence HA dont la biocompatibilité est solidement établie. La similitude des propriétés biologiques du matériau $Si_{0.4}HA$ et du matériau de référence HA montre que ni le dopage au silicium ni la surface spécifique accrue de $Si_{0.4}HA$ n'affectent significativement la biocompatibilité des matériaux dans le contexte expérimental. La biocompatibilité du matériau $Cu_{0.5}HA$ est plus complexe à caractériser en raison de résultats contrastés et de choix expérimentaux. Il apparaît de prime abord non biocompatible d'après le stress qu'il provoque vraisemblablement dans les C166 qui s'arrondissent après 4 jours de culture et d'après sa cytotoxicité avérée après 7 jours de culture où 30% de mortalité cellulaire y est mesurée en moyenne, a priori par apoptose en raison de la condensation de leur noyau (285). Ces effets entraînent une diminution de la densité cellulaire à sa surface après 7 jours de culture par rapport aux C166 à la surface des autres matériaux. A ce temps de culture, les cellules C166 sur le matériau $Cu_{0.5}HA$ ne sont cependant pas toutes en état de stress, visuellement certaines sont étalées avec de nombreux prolongements cellulaires, et la population cellulaire y est près de dix fois plus importante qu'au moment de l'ensemencement. Malgré le stress et la cytotoxicité qu'il provoque, ce matériau n'empêche pas le développement

et le maintien d'une population de cellules. De plus, la caractérisation physicochimique des matériaux (sous-partie III.1) permet d'attribuer sans équivoque les résultats spécifiques des matériaux Cu_xHA (prolifération augmentée, stress et cytotoxicité à la plus forte dose) à leur dopage au cuivre. Cette étude a été réalisée pendant 7 jours sans changement de milieu pour étudier les équilibres chimiques. Or, l'apport de nouvelles protéines du sérum lors d'un changement de milieu est à même de neutraliser la réactivité du cuivre (204). Des facteurs de croissance renouvelés auraient également une meilleure activité de protection contre la mortalité des cellules par le biais de leur signalisation anti-apoptotique. Il serait donc intéressant de réaliser la même étude avec des changements de milieu pour répondre à cette interrogation. Pour ces différentes raisons, dans des conditions expérimentales plus proches de conditions physiologiques, le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ pourrait être biocompatible pour des cellules C166. La cause de la cytotoxicité du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ observée à 7 jours pourrait également être investiguée plus en profondeur avec, par exemple, un test des comètes permettant d'évaluer qualitativement l'état de l'ADN d'une population cellulaire (295). L'état d'oxydation des cellules pourrait être caractérisé en mesurant la quantité intracellulaire du tripeptide antioxydant glutathion sous sa forme réduite (296). Une autre méthode serait de mesurer la quantité de malondialdéhyde intracellulaire qui est un composé produit lors de la peroxydation des lipides (297). De plus, les résultats de cette étude suggèrent que les deux matériaux Cu_xHA stimulent l'activité angiogéniques des C166. Par conséquent, il a été décidé de continuer à étudier les effets biologiques du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, afin notamment d'évaluer l'effet de la dose de cuivre sur les fonctions angiogéniques.

En plus d'une méthode adaptée, il est important d'utiliser des conditions expérimentales répliquant au mieux les conditions *in vivo*. Pour estimer la biocompatibilité *in vivo* des matériaux, il est essentiel de prendre en compte la finalité de ces céramiques qui est de servir de substitut aux greffes osseuses avec une implantation dans un site où l'os présente un défaut de masse important. La formation de vaisseaux sanguins au sein de la céramique est un prérequis au succès de l'implantation mais il faut également que le matériau ne soit pas toxique pour les cellules osseuses qui vont devoir s'y développer et pour les cellules progénitrices présentes à proximité. Or, comme discuté dans la sous-partie I.5.2.2.3.3, les cellules osseuses sont plus sensibles au cuivre que les cellules endothéliales. Une étude montre une diminution de la prolifération sur 4 jours de culture de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 et de cellules souches de moelle osseuse de rat dès 12 μM et 0,7 μM de cuivre en solution respectivement (217). La concentration de cuivre minimale retrouvée dans le milieu du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 4 jours de culture est de 243 μM . Cela suppose qu'il sera également cytotoxique pour ces cellules dans des conditions de culture similaire. Une précédente étude réalisée au laboratoire sur le même matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et une même HA de référence montre une diminution de la viabilité de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 Sc14 après 4 jours de culture à sa surface (158). Il est dès lors probable que le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ soit toxique pour les cellules osseuses. Par ailleurs, un minimum de 26 μM de cuivre est mesuré dans le milieu du matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ à 4 jours de culture ce qui suppose qu'il serait également toxique pour les cellules osseuses en conditions de culture similaires. Ces suppositions sont appuyées par les données de l'étude (158), qui montrent que le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ entraîne une diminution de la viabilité de cellules MC3T3-E1 Sc14.

Ces données soulignent le besoin d'évaluer la biocompatibilité de matériaux dans des conditions biologiques plus similaires à la situation *in vivo*. Une voie d'amélioration importante est l'utilisation de cocultures pertinentes. En effet, une combinaison de cellules endothéliales

et de pré-ostéoblastes serait plus représentative de la biocompatibilité *in vivo* d'un matériau et pourrait engendrer d'importantes différences de résultats car ces cellules se stimulent mutuellement. Ces stimulations se font au moyen de sécrétions paracrines, de la déposition de protéines de leur matrice extra-cellulaire et des jonctions adhérentes formées entre les cellules. Les voies de signalisation impliquées sont alors susceptibles d'augmenter la résistance des cellules à un stress (145), (298). La difficulté à apporter un avis définitif sur les propriétés d'un matériau souligne également la nécessité de développer des modèles d'analyse des biomatériaux *in vitro* plus proches des conditions *in vivo* et notamment capables de répliquer l'effet du mouvement des fluides interstitiels. La génération de flux permet d'exposer les cellules à un niveau d'élément dopant plus représentatif des concentrations réellement rencontrées *in vivo*. C'est dans cette optique qu'une mise en place d'un système de cultures *in vitro* dynamique en bioréacteur à perfusion par flux, utilisant des monocultures et une coculture, est présentée dans la partie V.

La biocompatibilité des matériaux étudiés est satisfaisante ou suffisante pour permettre l'étude de voies importantes impliquées dans l'angiogenèse. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie IV.

Partie IV. Etude *in vitro* des propriétés angiogéniques des matériaux en conditions de cultures 2D statiques

IV.1. Démarche expérimentale de l'évaluation des propriétés angiogéniques des matériaux

Pour évaluer les propriétés des 4 matériaux sur l'angiogenèse, ceux-ci sont étudiés en parallèle. L'HA pure est utilisée comme référence à laquelle les 3 autres matériaux sont comparés. L'objectif de l'étude étant de comprendre l'effet des dopants sur l'angiogenèse, l'HA constitue un contrôle satisfaisant puisqu'elle ne possède pas d'effet stimulant sur l'angiogenèse (8). Des cellules endothéliales C166 sont cultivées à la surface des matériaux ou sont exposées à des milieux conditionnés par ces derniers. L'étude a été réalisée sur une période maximale de 7 jours car cette période est suffisante pour observer *in vitro* toutes les étapes clés de l'angiogenèse qu'un matériau « idéal » stimulerait : la migration des cellules endothéliales, leur assemblage en de nouveaux vaisseaux et enfin la maturation de ces vaisseaux. La migration *in vitro* des cellules endothéliales en réponse à un signal pro-angiogénique provenant d'une molécule soluble survient au bout de quelques heures à quelques jours selon l'intensité du signal (40). L'assemblage des cellules endothéliales en un nouveau vaisseau et sa maturation peuvent être observés *in vitro* entre 72 h et 120 h de culture dans des cocultures de cellules endothéliales et de péricytes (40). Observer un phénomène de maturation en monoculture est possible car les voies de signalisation entraînant la maturation des vaisseaux proviennent des cellules endothéliales (299). Par conséquent, les éventuels effets biologiques des matériaux affectant la capacité angiogénique des cellules endothéliales devraient pouvoir être observés dans la période de 7 jours sélectionnée.

Pour mesurer l'état des processus angiogéniques à l'œuvre dans les C166 à la surface des matériaux étudiés, la nature exacte du processus observé doit être confirmée ou déterminée. De plus, les différences dans la progression de ce processus entre les conditions doivent être caractérisées. Ces informations sont obtenues en étudiant l'expression, la localisation et la sécrétion de protéines centrales dans l'angiogenèse. La sécrétion de VEGF par les cellules C166 est mesurée, la localisation des protéines centrales de l'angiogenèse VEGF164 et VEGFR2 est précisée ainsi que celle de la protéine MMP-9 essentielle à la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. Les protéines membranaires PECAM-1 et VE-Cadhérine sont observées car elles sont essentielles à l'assemblage des cellules endothéliales entre elles lors de la migration et la maturation des vaisseaux. Les expressions géniques de MMP-9, eNOS et VWF sont quantifiées.

Des tests sont conduits pour comprendre l'origine des propriétés biologiques des matériaux. Les effets de leurs produits de dissolution sont mesurés par des tests de fermeture de blessure (« wound healing assay »). La génération d'espèces radicalaires intracellulaires est quantifiée. La voie de l'hypoxie est investiguée en suivant la localisation et l'expression de la protéine HIF-1 α .

IV.1.1. Sécrétion de VEGF164

Le VEGF est le facteur de croissance central de l'angiogenèse permettant l'initiation de la migration des cellules endothéliales et dirigeant celles-ci vers la zone en besoin de perfusion. Son action est essentielle lors de la réparation osseuse (300) (sous-partie I.4.8.3) et un niveau de sécrétion basal est attendu dans les cellules endothéliales (48). La sécrétion de VEGF par les C166 cultivées à la surface des différents matériaux est mesurée par test

ELISA dans le milieu extra-cellulaire après 4 et 7 jours de culture, la Figure 59 présente les résultats obtenus.

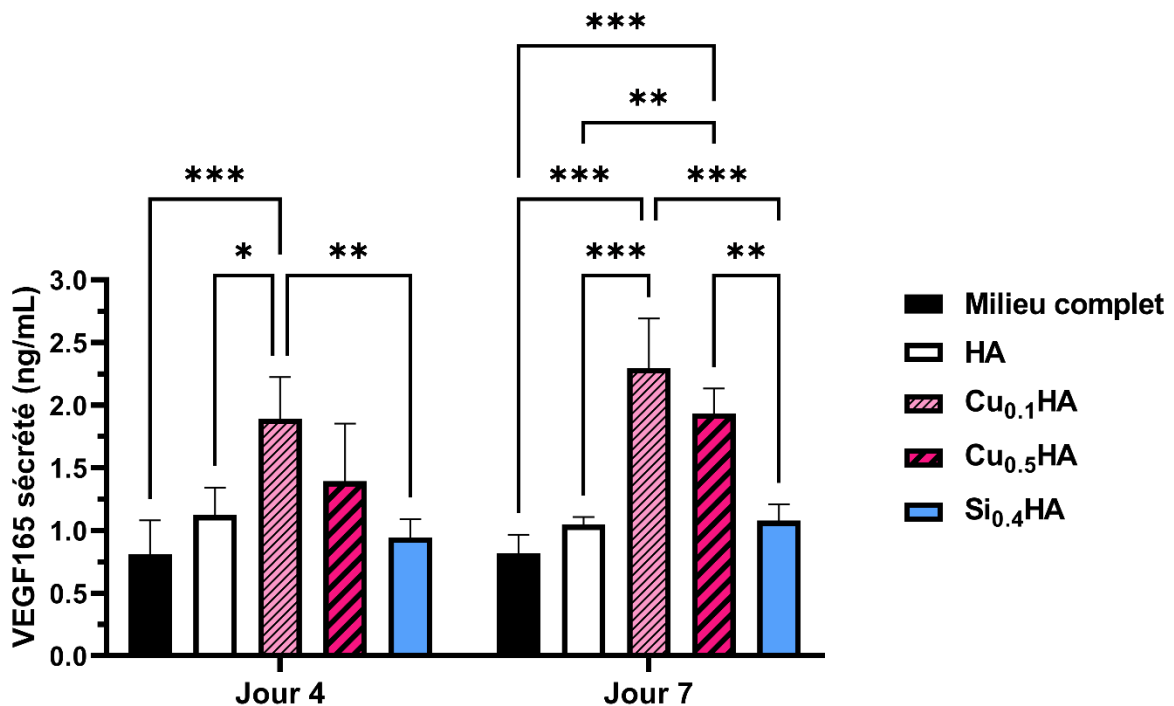


Figure 59 : Sécrétion de VEGF par les C166 après 4 et 7 jours de culture sur les matériaux

Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3.

La sécrétion de VEGF164 par les C166 (Figure 59) après 4 jours de culture sur le matériau de référence HA entraîne, dans les conditions expérimentales une concentration de VEGF dans le milieu de culture d'environ $1,1 \pm 0,22$ ng/mL. Le VEGF est présent en trop faible quantité dans le milieu de culture seul pour être détecté, les concentrations détectées proviennent donc de la sécrétion des C166 uniquement. La sécrétion sur le matériau de référence HA est comparable à celles retrouvées dans les milieux du matériau Si_{0.4}HA et dans les milieux des C166 cultivées sans matériaux avec une concentration de $0,94 \pm 0,15$ ng/mL et une concentration de $0,81 \pm 0,27$ ng/mL respectivement. Le matériau Cu_{0.1}HA possède un effet stimulateur sur la sécrétion du VEGF par les C166 par rapport au matériau de référence HA, au Si_{0.4}HA et aux puits plastiques. La concentration de VEGF retrouvée y est significativement supérieure avec $1,89 \pm 0,33$ ng/mL mesuré. La concentration de VEGF est de $1,39 \pm 0,46$ ng/mL dans le milieu du matériau Cu_{0.5}HA sans qu'une différence statistique soit retrouvée par rapport aux 4 autres conditions.

Après 7 jours de culture sur le matériau HA, les C166 sécrètent du VEGF. Une concentration de $1,05 \pm 0,6$ ng/mL est retrouvée dans le milieu de culture. Les sécrétions de VEGF des C166 cultivées sur le matériau Si_{0.4}HA et en l'absence de matériau sont comparables à celles cultivées sur le matériau de référence HA. La concentration de VEGF en présence de Si_{0.4}HA est de $1,08 \pm 0,13$ ng/mL et de $0,82 \pm 0,15$ ng/mL en l'absence de matériau. Elles sont similaires à celles mesurées après 4 jours de culture. La sécrétion de VEGF par les C166 est significativement augmentée en présence des Cu_xHA par rapport au matériau de référence

HA, au $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ et en l'absence de matériau. La concentration de VEGF en présence de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ est de $2,3 \pm 0,39$ ng/mL et de $1,93 \pm 0,2$ ng/mL en présence de $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$. Ces deux concentrations ne sont pas significativement différentes entre elles.

La localisation du VEGF164 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux est également contrôlée *in situ* par immunofluorescence et présentée dans la Figure 60.

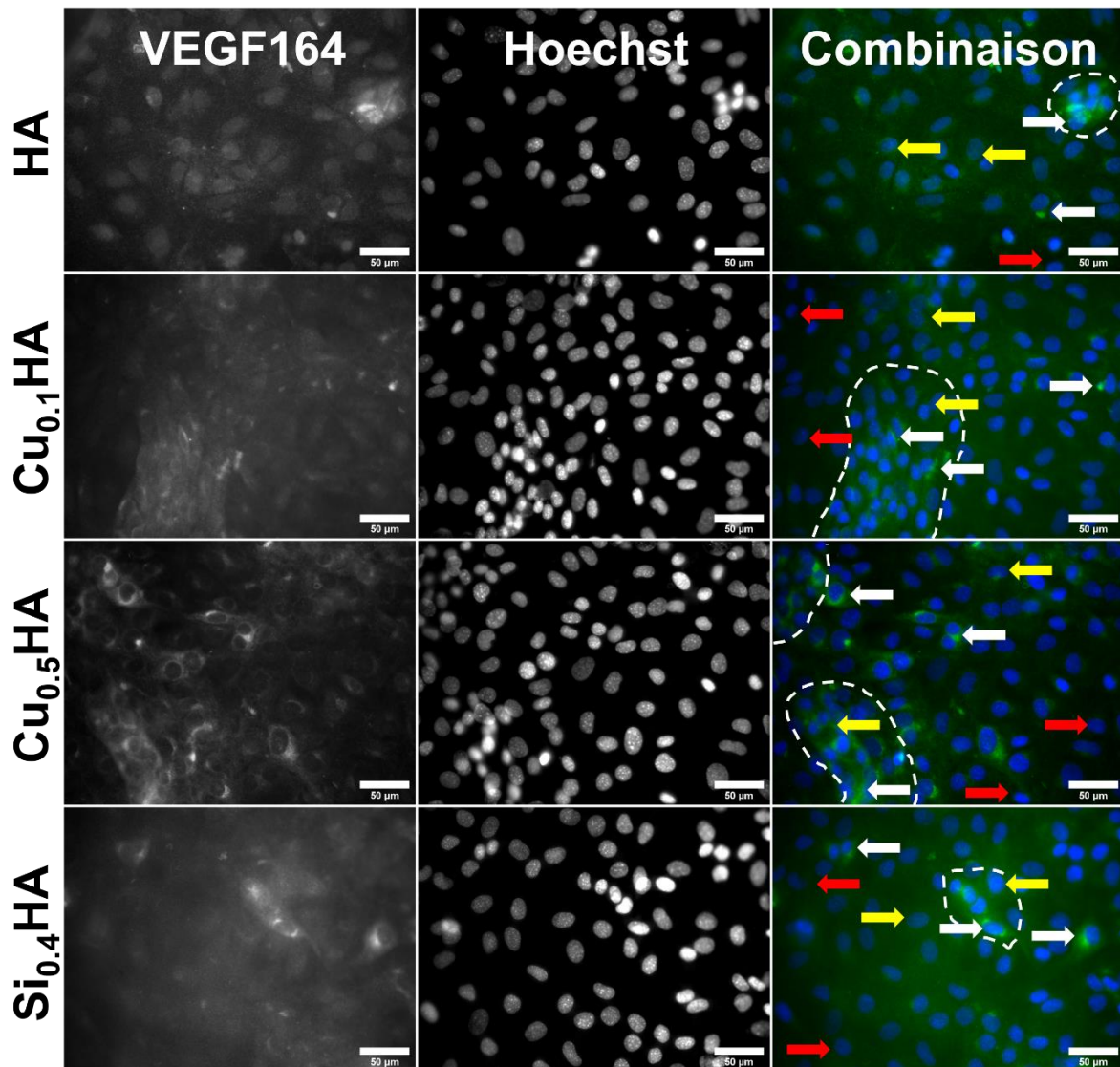


Figure 60 : Observation *in situ* de la localisation de l'expression du VEGF164 dans les populations de C166 après 4 jours de culture sur les matériaux, images composites

Bleu : noyaux ; Vert : VEGF164. Flèche blanche : indique une cellule où l'expression de VEGF164 est concentrée dans des organites intracellulaires. Flèche jaune : indique une cellule où l'expression de VEGF164 est cytoplasmique ou membranaire. Flèche rouge : indique une cellule exprimant pas ou peu VEGF164. Zone en pointillés : délimite des zones de forte densité cellulaire. Barre d'échelle = 50 µm.

La localisation du VEGF164 (Figure 60) dans les populations de C166 sur le matériau de référence HA révèle l'existence de trois phénotypes d'expression différents. Une première catégorie de cellules exprime fortement le VEGF164 dans des structures intracellulaires périnucléaires pouvant correspondre à du réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi

(Figure 60 flèches blanches). Une deuxième exprime du VEGF164 de manière diffuse dans leur cytoplasme ou leur membrane plasmique (Figure 60 flèches jaunes). Troisièmement, certaines cellules n'expriment pas de VEGF164 (Figure 60 flèches rouges). La première catégorie est principalement retrouvée dans les zones de plus forte densité cellulaire (Figure 60 pointillés). Les cellules de la première catégorie sont entourées de celles de la deuxième. Les cellules de la troisième catégorie se retrouvent dans les zones de faible densité cellulaire (Figure 60 hors des pointillés). Ces différents phénotypes d'expression sont observés à l'identique dans les cellules sur les matériaux $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$. Les cellules C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ ont également ces trois phénotypes d'expression mais l'organisation des cellules est différente. Les cellules de la première catégorie (Figure 60 flèches blanches) sont très présentes dans et en dehors des zones de forte densité cellulaire (Figure 60 pointillés).

La concentration de VEGF164 retrouvée dans toutes les conditions provient de sécrétion récente. En effet, le VEGF164 a une demi-vie inférieure à deux heures *in vitro* dans une solution aqueuse contenant 0,2 M de PBS (301). Cependant, cette demi-vie peut être accrue par l'action de protéines comme l'albumine présente dans les milieux de culture complets. Cette protection peut prendre la forme d'une barrière contre les ROS présents dans le milieu (302) ou d'interactions non covalentes avec le VEGF164 (303). Ce type d'interaction non covalente peut, dans le meilleur cas rapporté, multiplier par 10 le temps de demi-vie d'une protéine de taille comparable au VEGF164. La demi-vie théorique du VEGF164 en milieu de culture est alors vraisemblablement comprise entre 2 h et 20 h.

La concentration de VEGF, dans toutes les conditions est au-dessus du seuil d'environ 0,2 ng/mL, où il stimule la prolifération d'HUVECs. Le taux de prolifération d'HUVECs augmente avec sa concentration et elle est maximale à partir de 10 ng/mL (304). La sécrétion de VEGF164 pourrait expliquer la forte prolifération des C166 observée dans toutes les conditions (sous-partie III.2.5). Les concentrations de VEGF164 de toutes les conditions sont contenues dans la gamme où l'effet mitogène est augmenté avec la dose. Par conséquent, la sécrétion plus importante de VEGF164 par les C166 à la surface de $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ et la tendance à la hausse de la sécrétion de VEGF164 par les C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ pourraient expliquer en partie le maintien d'une prolifération importante des C166 à la surface des matériaux Cu_xHA au 3^{ème} jour de culture (Figure 55).

La localisation du VEGF164 apparaît physiologique dans les populations de C166 étudiées. Le VEGF164 avant sécrétion est concentré dans les organites responsables de la production et la transformation de protéine, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cela est cohérent avec les observations des cellules de la première catégorie qui expriment fortement le VEGF164 dans des organites intracellulaires dont les localisations peuvent correspondre. Le VEGF164 est également présent au niveau de la membrane plasmique et/ou du cytoplasme. L'accumulation dans la membrane plasmique est davantage probable car elle est physiologique. En effet, la sécrétion du VEGF164 peut être faite sous forme libre à partir de vésicule d'exocytose, mais aussi sous une forme liée à la membrane plasmique. Lors de ce dernier cas des morceaux de membrane plasmique sur lesquels du VEGF164 s'est accumulé sont « sécrétés » par la cellule (305). Ce mécanisme est cohérent avec la présence diffuse de VEGF164 dans les cellules de la deuxième catégorie. Celles-ci accumulent du VEGF164 à la surface de leur membrane plasmique.

En dehors du phénotype spécifique à la population de cellules exprimant du VEGF164 sur le matériau $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ les phénotypes sont comparables entre HA, $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$. Cela suggère que la sécrétion accrue de VEGF164 mesurée sur $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$ (Figure 59) peut

s'expliquer de deux façons. Premièrement, dans la mesure où à 4 jours, les densités cellulaires sont équivalentes entre toutes les conditions, il est possible que sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ les C166 s'organisent davantage en amas où sont présentes les cellules de la première et deuxième catégorie, ce qui entraînerait une sécrétion accrue de VEGF164. Cette hypothèse est appuyée par des observations visuelles de grands amas de cellules exprimant VEGF164 (comme observé en Figure 60 dans la zone en pointillés) à la surface du matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$. Cette hypothèse est cohérente avec les observations de l'organisation de la population de cellules à la surface des matériaux (Figure 46 et Figure 48 notamment). Ces précédentes observations montrent qu'à la surface du matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ les nombreux amas de C166 sont plus organisés et de plus grande taille que ceux à la surface des matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. L'autre hypothèse serait que le mécanisme de sécrétion du VEGF164 des C166 dans les conditions Cu_xHA est modifié. Cependant, une étude sur des cellules endothéliales humaines, montre qu'une sécrétion augmentée passe par une accumulation plus importante de VEGF165 aux membranes plasmiques (305). Cela n'est pas observé dans les conditions Cu_xHA (Figure 60). L'augmentation de la sécrétion par les C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ s'explique vraisemblablement par la présence de nombreuses cellules sécrétrices sans qu'elles possèdent une localisation préférentielle dans les amas (Figure 60).

L'origine des effets stimulateurs des Cu_xHA sur la sécrétion de VEGF164 pourrait être une stimulation par le cuivre comme il a déjà été rapporté après l'exposition d'HUVECs à des concentrations supérieures à $157 \mu\text{M}$ (218). L'origine de cet effet pourrait être une stimulation du gène codant pour VEGF suite à l'activation de la voie de réponse à l'hypoxie HIF-1 comme rapporté dans la sous-partie I.5.2.2.3.2. La plus faible augmentation de sécrétion de VEGF des C166 sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ par rapport à celles sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 4 jours de culture est probablement causée par la combinaison entre la densité cellulaire pouvant y être légèrement inférieure (Figure 43) et le stress cellulaire observé (Figure 47 et Figure 50) qui est vraisemblablement responsable après 7 jours de culture des effets cytotoxiques constatés sur ce matériau (Figure 53).

La présence d'une plus grande concentration de VEGF164 dans l'environnement des C166 à la surface de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ après 4 jours de culture, la tendance à la hausse observée pour la condition $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ après 4 jours de culture, et la sécrétion significativement augmentée dans les conditions Cu_xHA après 7 jours de culture, sont cohérentes avec le processus angiogénique constaté dans les expériences précédentes. La plus grande concentration de VEGF164 en présence de $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ et la biocompatibilité de ce matériau peuvent expliquer le développement plus important des structures multicellulaires à la surface de celui-ci.

IV.1.2. VEGFR2

Le VEGFR2 est le récepteur principal au VEGF, c'est par lui que la majorité de son action pro-angiogénèse est transmise. C'est un marqueur des « tip cells » dans la compétition dynamique survenant lors de la migration des cellules endothéliales par bourgeonnement. Il est important de suivre les différences d'évolution et de localisation de son expression pour identifier les cellules réceptrices au VEGF et les éventuelles compétitions dynamiques en place. La localisation *in situ* de VEGFR2 dans les C166 observée par immunofluorescence à 4 jours de culture est présentée dans la Figure 61.

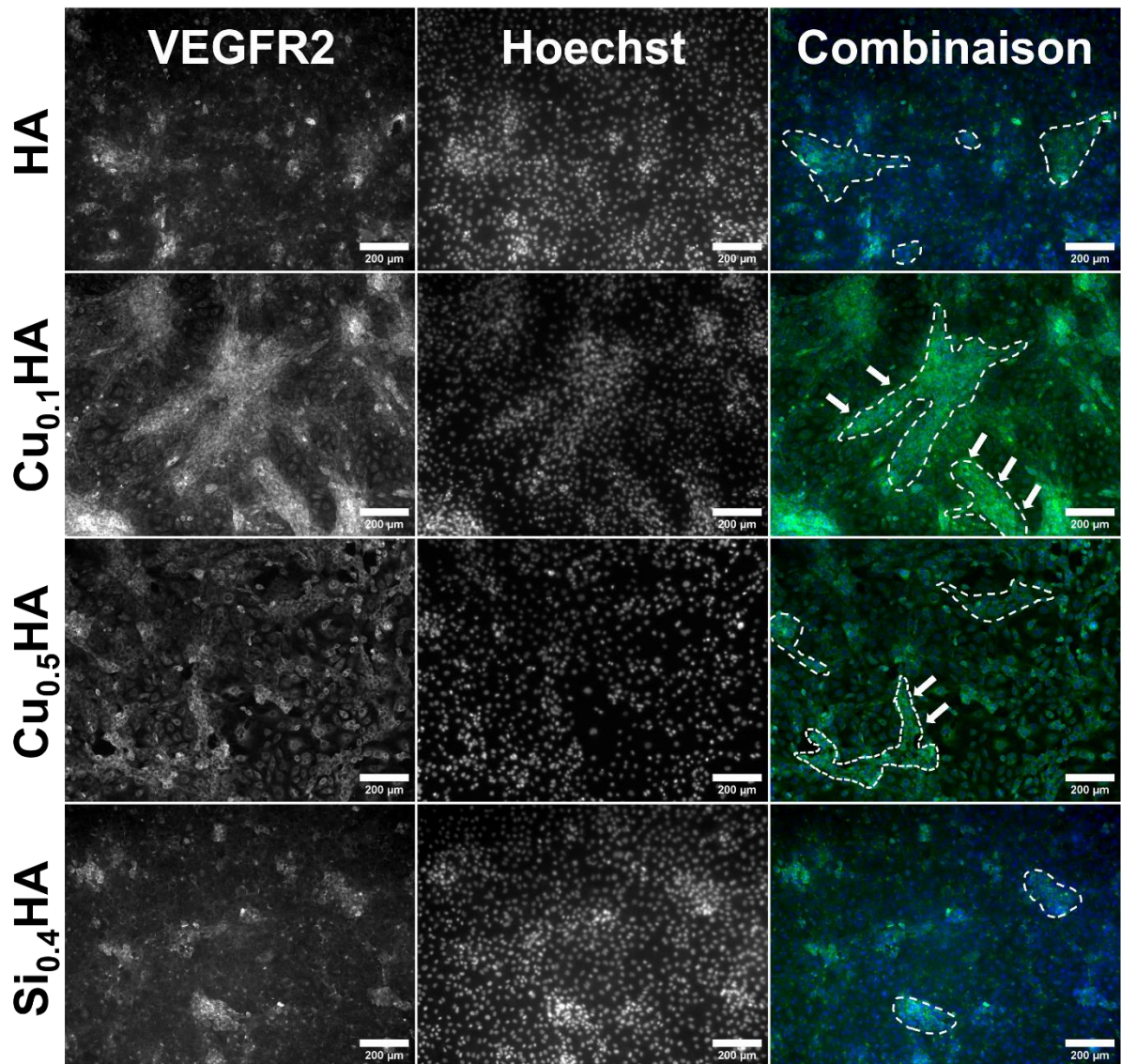


Figure 61 : Expression *in situ* de VEGFR2 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux
 Vert : VEGFR2 ; Bleu : noyaux. Zones en pointillés : délimitation de certaines des structures multicellulaires organisées. Flèche blanche : indique certaines structures multicellulaires organisées en fuseaux. Barre d'échelle = 200 µm

L'expression *in situ* de VEGFR2 dans les C166 après 4 jours de culture (Figure 61) sur l'HA est concentrée dans certaines cellules localisées dans ou à proximité d'amas de cellules où la densité cellulaire est forte. Les cellules en dehors de ces amas l'expriment peu ou pas. Ces amas de cellules s'organisent en structures multicellulaires de formes variables et de tailles allant de 50 à 300 µm de diamètre (Figure 61 pointillés). Les C166 sur le matériau Si_{0.4}HA expriment VEGFR2 de manière similaire aux cellules cultivées sur HA avec des amas comparables en taille et en forme (Figure 61 pointillés). Les cellules C166 sur les matériaux Cu_xHA présentent une expression variable de VEGFR2 et les cellules l'exprimant fortement se retrouvent essentiellement dans des amas multicellulaires (Figure 61). Ces amas sont visuellement de plus grande taille et sont plus allongés que ceux formés par les C166 sur les matériaux HA et Si_{0.4}HA avec des fuseaux multicellulaires allant de 300 à 500 µm de long (Figure 61 pointillés et flèches blanches). Les fuseaux observés sur le matériau Cu_{0.1}HA sont

visuellement plus épais que ceux retrouvés sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$. Sur ce dernier matériau les cellules sont aussi plus arrondies et les fuseaux qu'elles forment sont moins linéaires.

La localisation *in situ* de VEGFR2 dans des observations à plus fort grossissement et centrées sur des amas cellulaires est présentée dans la Figure 62.

L'expression de VEGFR2 par les C166 est également observée après 7 jours de culture et est présentée dans la Figure 63 avec 3 images représentatives des amas multicellulaires.

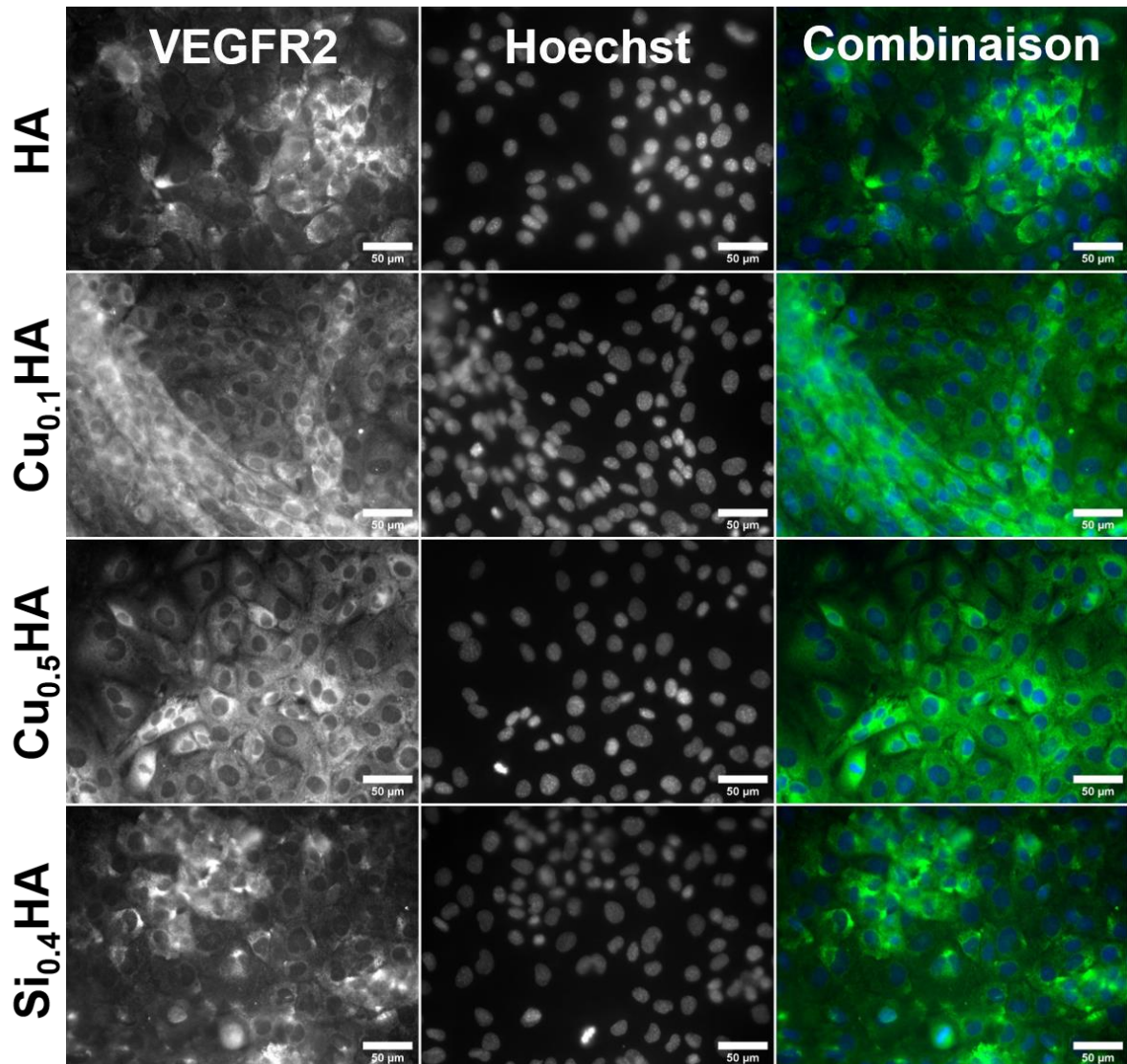


Figure 62 : Expression *in situ* de VEGFR2 dans les C166 formant des amas cellulaires après 4 jours de culture sur les matériaux

Vert : VEGFR2 ; Bleu : noyaux. Barre d'échelle = 50 µm

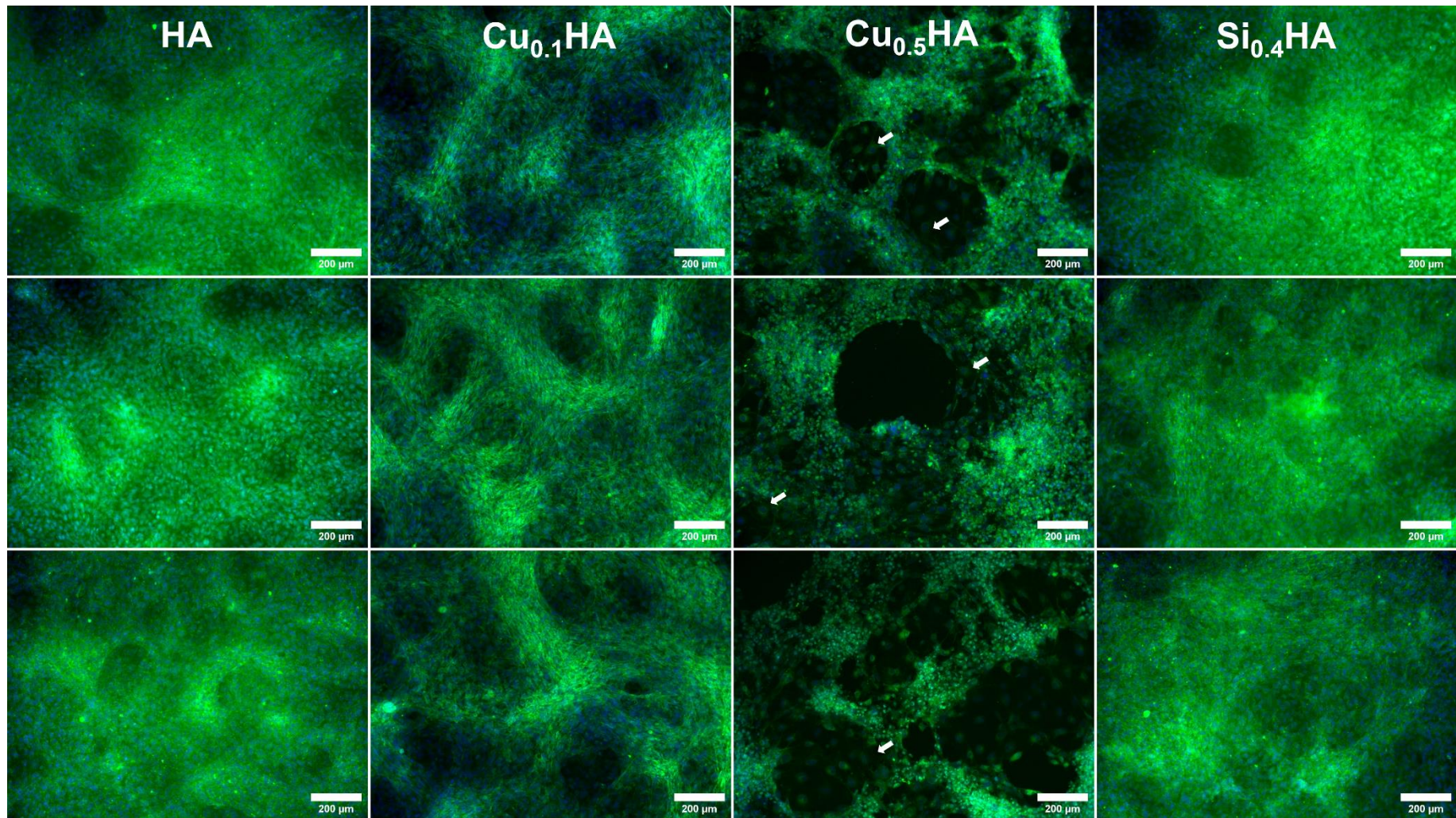


Figure 63 : Expression *in situ* de VEGFR2 dans les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux. Images combinées.

Vert : VEGFR2 ; Bleu : noyaux. Flèches blanches : cellule étalée de grande taille. Barre d'échelle = 200 µm



L'expression *in situ* de VEGFR2 au sein des C166 formant des amas (Figure 62) à la surface du matériau HA après 4 jours de culture est principalement membranaire ou cytoplasmique. Il existe dans certaines cellules exprimant fortement VEGFR2 des zones intracellulaires où l'expression y est plus importante. Ces zones sont majoritairement périnucléaires ce qui suggère que VEGFR2 est présent au sein d'organites spécialisés dans la synthèse de protéines comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. Ce phénotype est observé dans tous les amas de C166 sur les matériaux $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$, $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$.

L'expression *in situ* de VEGFR2 dans les C166 après 7 jours de culture (Figure 63) sur l'HA est similaire à celle à 4 jours de culture (Figure 61). Des cellules l'expriment fortement et sont localisées dans les amas cellulaires et des cellules l'expriment peu ou pas et sont positionnées en dehors des amas. A 7 jours de culture, les amas de cellules exprimant VEGFR2 sont organisés en structures multicellulaires de grande taille dans lesquelles des fuseaux multicellulaires distinguables du reste de l'amas sont particulièrement denses en cellules. Les C166 sur le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ expriment VEGFR2 de manière similaire à celles sur l'HA avec des amas comparables en taille et en forme. Les cellules C166 sur les matériaux Cu_xHA ont également une expression de VEGFR2 importante ou faible voir absente. Les cellules l'exprimant fortement se retrouvent dans des amas multicellulaires presque exclusivement organisés en fuseaux multicellulaires. Ces fuseaux délimitent clairement des structures circulaires au sein desquels les C166 expriment faiblement VEGFR2. Les fuseaux observés sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ sont plus épais et mieux délimités que ceux sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$. Sur ce dernier matériau, les cellules sont aussi plus arrondies, celles dans les amas sont plus petites et moins connectées entre elles que dans les autres conditions. Des cellules de grande taille et très étalées (Figure 61 flèches blanches) sont présentes au sein des structures circulaires délimitées par les amas exprimant fortement VEGFR2.

L'expression *in situ* de VEGFR2 au sein des amas de C166 à 7 jours de culture est présentée dans la Figure 64.



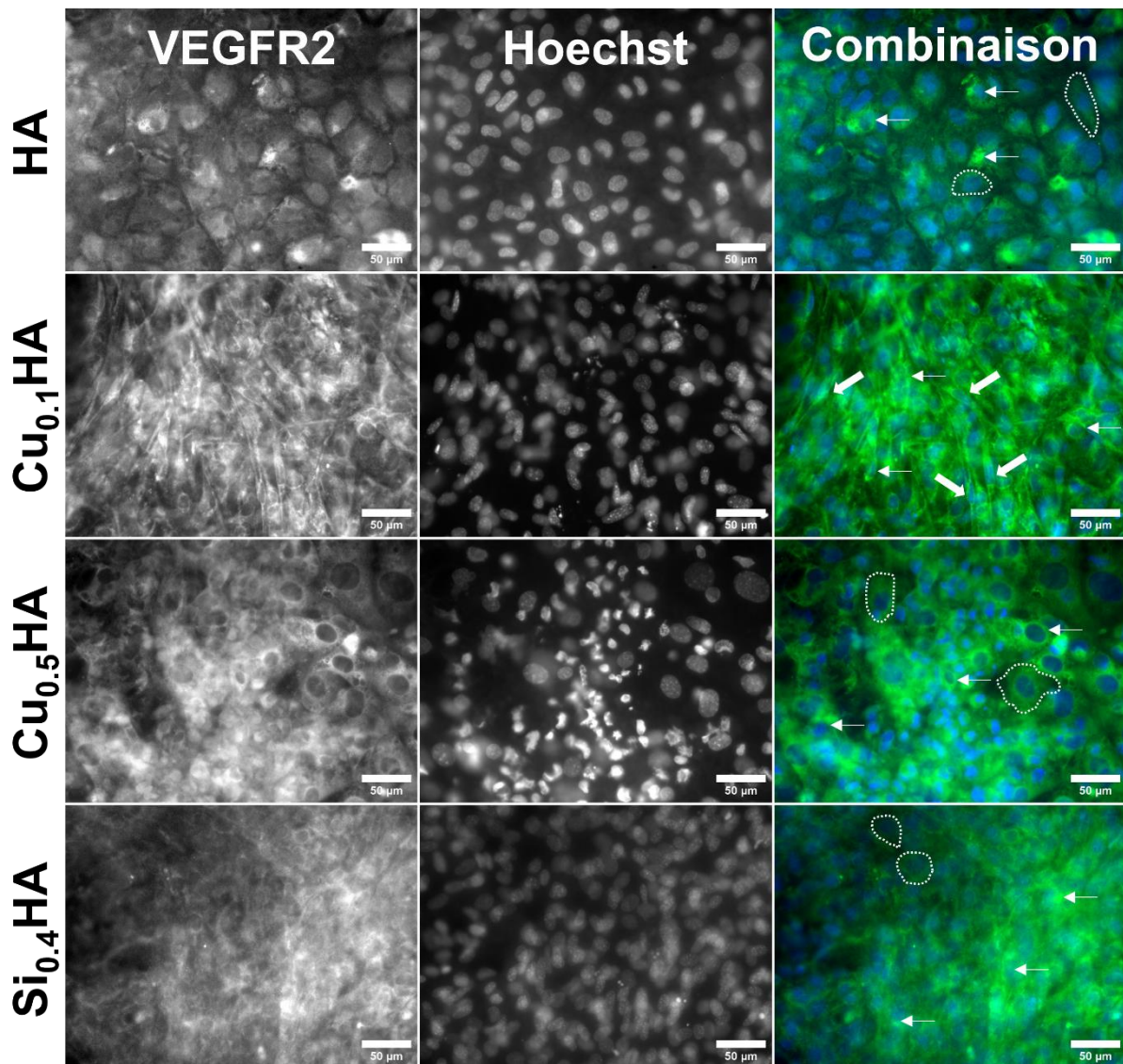


Figure 64 : Expression *in situ* du récepteur membranaire VEGFR2 dans les C166 formant des amas cellulaires après 7 jours de culture sur les matériaux

Vert : VEGFR2 ; Bleu : noyaux. Flèches larges et blanches : indiquent des cellules très allongées.

Flèches fines et blanches : indiquent des cellules exprimant VEGFR2 dans des organites intracellulaires. Zone en pointillés : délimite une cellule où l'expression de VEGFR2 est cytoplasmique ou membranaire. Barre d'échelle = 50 µm

Après 7 jours de culture, l'expression de VEGFR2 par les C166 formant des amas (Figure 64) est sur l'HA très similaire à celle observée après 4 jours de culture (Figure 62) : certaines cellules, en bordure de l'amas, expriment peu VEGFR2, celles dans l'amas l'expriment davantage dans leur cytoplasme ou sur leur membrane plasmique (Figure 64 pointillés). Parmi les cellules exprimant VEGFR2, certaines ont une très forte expression de VEGFR2 dans des organites intracellulaires (Figure 64 flèches fines et blanches). La localisation périnucléaire de ces organites suggère qu'il s'agit du réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi. Ces trois phénotypes d'expression de VEGFR2 sont présents dans toutes les cellules C166 sur les autres matériaux $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$, $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Les C166 formant des amas sur les matériaux HA, $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ adoptent principalement une morphologie cuboïde typique des cellules endothéliales à confluence (264). A la surface du matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$, les C166 dans les amas

sont très allongées (Figure 64 flèches larges et blanches). Des noyaux très condensés sont visibles sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ ce qui est une conséquence de la mortalité cellulaire mesurée à ce jour de culture (Figure 53).

L'expression de VEGFR2 par les C166 sur tous les matériaux apparait physiologique et est caractéristique des cellules endothéliales à confluence. Dans une population de cellules endothéliales certaines expriment fortement VEGFR2 et d'autres peu. Celles l'exprimant fortement seront à l'origine des amas puis des fuseaux multicellulaires en réponse à la liaison du VEGF sur VEGFR2 (41). La présence de zones intracellulaires enrichies en VEGFR2 correspond à sa localisation physiologique dans l'appareil de Golgi depuis lequel il est transporté vers la membrane plasmique en réponse à la liaison avec le VEGF (306). Ce phénomène explique l'expression accrue de VEGFR2 au sein des amas multicellulaires et des fuseaux qu'ils forment.

D'après l'étude *in situ* de la localisation de VEGFR2 dans les C166, ces cellules sont bien dans un processus angiogénique quel que soit le matériau à la surface duquel elles sont cultivées. Ce processus est engagé de manière autocrine car, comme évoqué en sous-partie I.2.4.1, c'est la liaison de VEGF à VEGFR2 qui initie la migration et l'élongation des cellules. Les cellules cultivées à la surface de HA et de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ sont moins allongées, ce qui s'explique par la plus faible concentration de VEGF retrouvée dans le milieu d'après les résultats de la sous-partie précédente. La sécrétion basale de VEGF par les C166 à la surface des matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ est suffisante pour que les cellules exprimant fortement VEGFR2 initient la formation de fuseaux multicellulaires. Ceux-ci sont moins développés que les fuseaux formés par les C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA , où la sécrétion de VEGF est plus importante.

IV.1.3. MMP-9

L'expression de MMP-9 dans les C166 est mesurée car c'est une métalloprotéase matricielle essentielle à la progression des cellules endothéliales à travers la matrice extracellulaire et à l'activation du VEGF qui y est emprisonné. Elle est également nécessaire à la progression de l'angiogenèse en réponse à un gradient de VEGF (51) et elle module la signalisation de ce dernier (52). Son expression est un indicateur de l'activité angiogénique des cellules endothéliales, et les modifications de son expression pourraient avoir un effet significatif sur la signalisation angiogénique des C166. L'expression de MMP-9 mesurée par Western Blot à 1, 4 et 7 jours de culture est présentée dans la Figure 65.

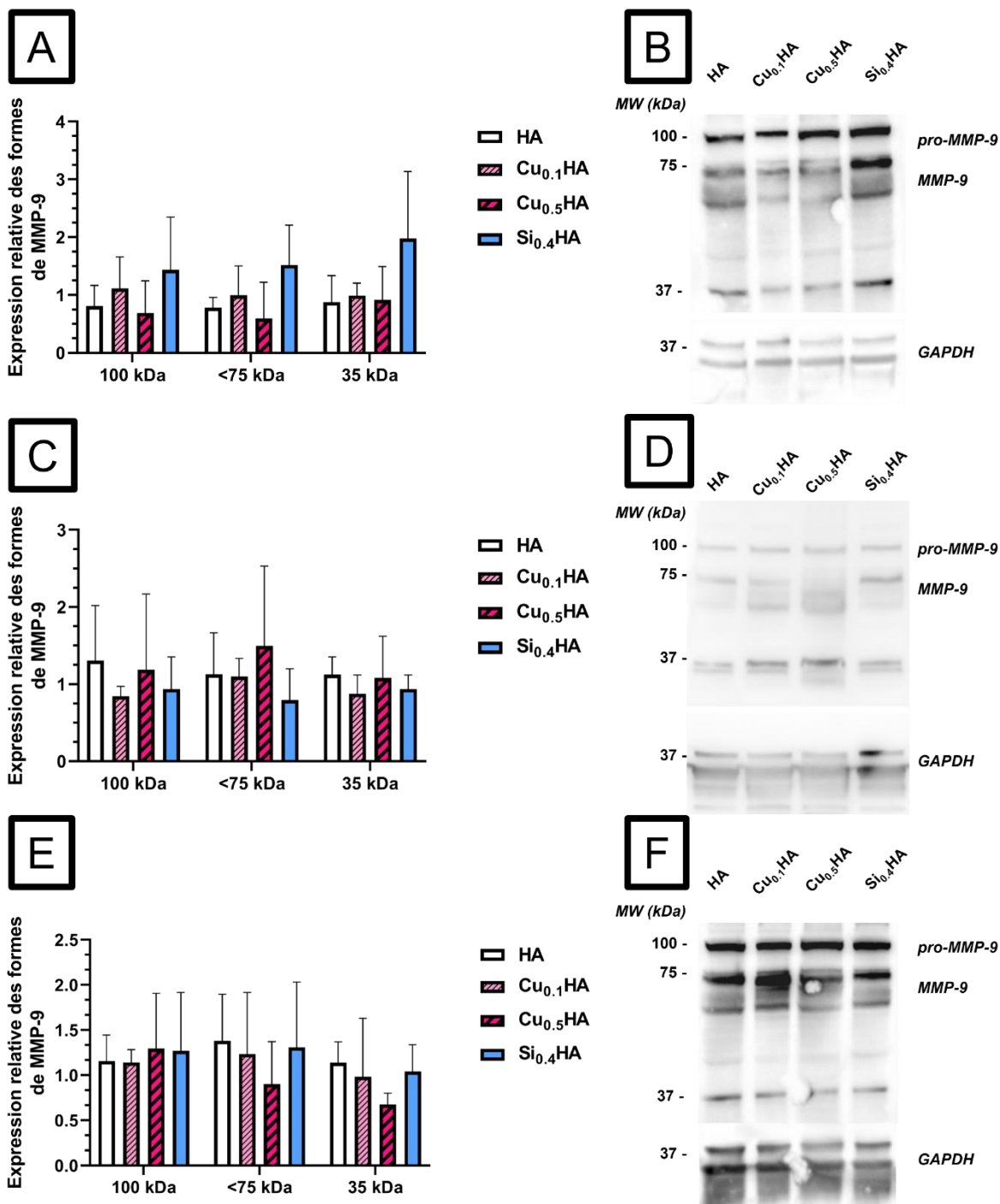


Figure 65 : Expressions relatives de MMP-9 dans les C166 après 1, 4 et 7 jour(s) de culture sur pastille

A et B : données à 1 jour ; C et D : données à 4 jours ; E et F : données à 7 jours. Expression relative = Proportion globale du signal de la bande / proportion globale du signal GAPDH

L'expression relative des formes de MMP-9 au cours du temps (Figure 65) dans les cellules C166 sur le matériau HA est comparable entre les trois formes de MMP-9 au jour 1 (Figure 65 A et B). Ces trois formes sont une pro-forme inactive aux alentours de 100 kDa, deux bandes rapprochées de formes clivées et actives inférieures à 75 kDa et une forme aux alentours de 35 kDa. Les deux premières formes (100 kDa et 75 kDa) sont comparables aux poids

moléculaires attendus de la forme inactive et des formes actives (56), (292), (307). La dernière forme à 35 kDa, moins documentée, correspondrait à des fragments actifs sécrétés (56). Au niveau de la double bande de formes actives de taille inférieure à 75 kDa, la bande supérieure a un niveau d'expression légèrement plus important (Figure 65 B). L'expression relative de ces 3 formes de MMP-9 dans les C166 sur les matériaux Cu_xHA à 1 jour de culture est comparable à celle des cellules sur l'HA (Figure 65 A et B). Les C166 sur le matériau $Si_{0.4}HA$ expriment équitablement les 3 formes de MMP-9 mais les surexpriment légèrement par rapport aux C166 sur les autres matériaux. Dans cette condition $Si_{0.4}HA$, les expressions de la forme à 100 kDa et des formes inférieures à 75 kDa sont environ 1,5 fois supérieures, et celle de la forme à 35 kDa est 2 fois supérieures, à celles des C166 sur les autres matériaux (Figure 65 A et B). Au jour 4 de culture, l'expression relative des 3 formes de MMP-9 dans les C166 sur l'HA est comparable mais il existe une variabilité importante de l'expression de la forme à 100 kDa (Figure 65 C et D). Le niveau d'expression de ces formes de MMP-9 dans les C166 sur les matériaux $Cu_{0.1}HA$, $Cu_{0.5}HA$ et $Si_{0.4}HA$ est comparable à celle des C166 sur l'HA malgré des variations importantes de l'expression de la forme à 100 kDa, et celles à moins de 75 kDa sur le matériau $Cu_{0.5}HA$ (Figure 65 C et D). Sur les matériaux HA et $Si_{0.4}HA$, la forme inférieure à 75 kDa n'est présente que dans la bande supérieure, alors que sur $Cu_{0.1}HA$ et $Cu_{0.5}HA$ les C166 expriment essentiellement la bande inférieure (Figure 65 D). Au jour 7 de culture, l'expression relative des trois formes de MMP-9 est comparable dans les C166 sur l'HA (Figure 65 E et F). Les expressions de ces formes de MMP-9 dans les C166 sur les matériaux $Cu_{0.1}HA$ et $Si_{0.4}HA$ sont équivalentes à celles des cellules sur l'HA (Figure 65 E et F). Les C166 sur le matériau $Cu_{0.5}HA$ expriment la forme de MMP-9 à 100 kDa à un niveau comparable aux cellules à la surface des autres matériaux mais les formes inférieures à 75 kDa et la forme à 35 kDa sont environ 40% moins exprimées (Figure 65 E et F).

Au jour 4 de culture, la diminution de l'expression intracellulaire d'une des bandes de forme active de MMP-9 de 75 kDa suggère que celle-ci est sécrétée, ou sécrétée en plus grande quantité que l'autre. Ces résultats amènent à observer *in situ* l'expression de MMP-9 par immunofluorescence au jour 4, pour rechercher une éventuelle modification de la localisation de MMP-9 associée aux variations de la bande à 75 kDa. Ces observations sont présentées dans la Figure 66.

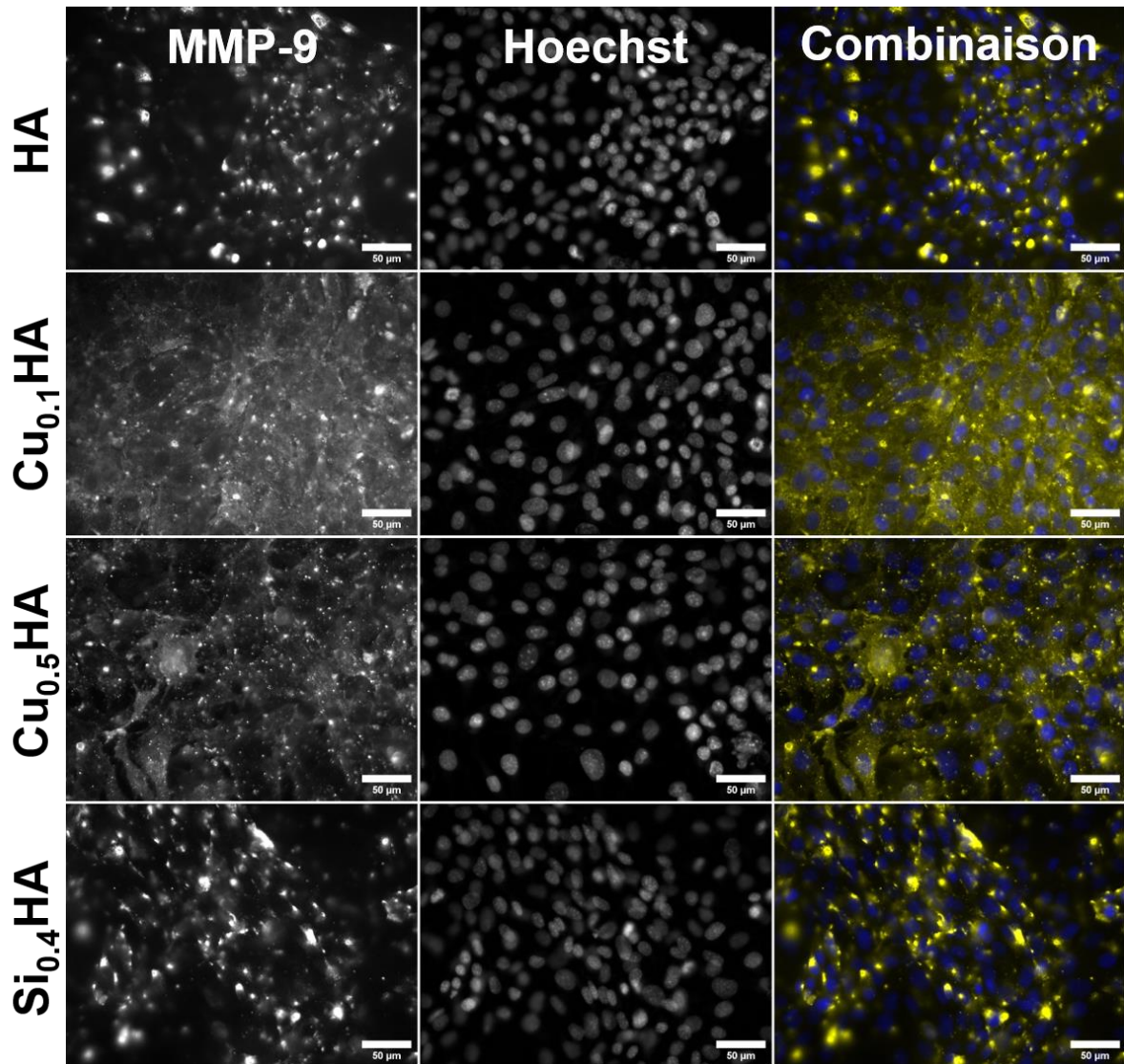


Figure 66 : Expression *in situ* de MMP-9 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux.

Jaune : MMP-9 ; Bleu : noyaux. Barre d'échelle = 50 µm.

L'expression *in situ* de MMP-9 dans les C166 (Figure 66) sur le matériau HA après 4 jours de culture n'est pas identique dans toutes les cellules : certaines cellules l'expriment peu ou pas et d'autres fortement. Dans les C166 qui l'expriment fortement, MMP-9 est présente suivant deux localisations. Premièrement, une présence diffuse à priori membranaire et qui permet de distinguer partiellement le contour des cellules. Deuxièmement, une localisation de MMP-9, vraisemblablement dans des organites intracellulaires, très délimitée où une grande quantité de MMP-9 est présente. Ces deux localisations sont physiologiques, MMP-9 est stockée dans des vésicules au sein du cytoplasme et peut être présente sur la membrane plasmique sous une forme activée (56). La présence de cellules exprimant fortement MMP-9 et d'autres l'exprimant peu est observée dans toutes les cultures de C166 à la surface des matériaux. Dans les C166 cultivées à la surface du matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$, le phénotype d'expression de MMP-9 est comparable à celui retrouvé dans les C166 sur l'HA. Les C166 à la surface des matériaux Cu_xHA qui expriment MMP-9 le font différemment de celles sur HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. La localisation de MMP-9 est principalement membranaire et elle est présente, à priori, sur toute la surface

cellulaire. La quantité de MMP-9 présente dans ces localisations est plus importante dans les C166 sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ que celles sur le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$. La forte expression de MMP-9 dans des organites intracellulaires, correspondant à priori aux vésicules cytoplasmiques où elle est stockée, sont visuellement moins nombreuses et plus petites dans les C166 à la surface des deux matériaux Cu_xHA que dans celles cultivées à la surface des matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$.

La Figure 67 correspond à des images prises en microscopie à fluorescence de MMP-9 dans les C166 à la surface des matériaux à plus faible grossissement, ce qui permet de mieux apprécier la présence de cellules l'exprimant peu.

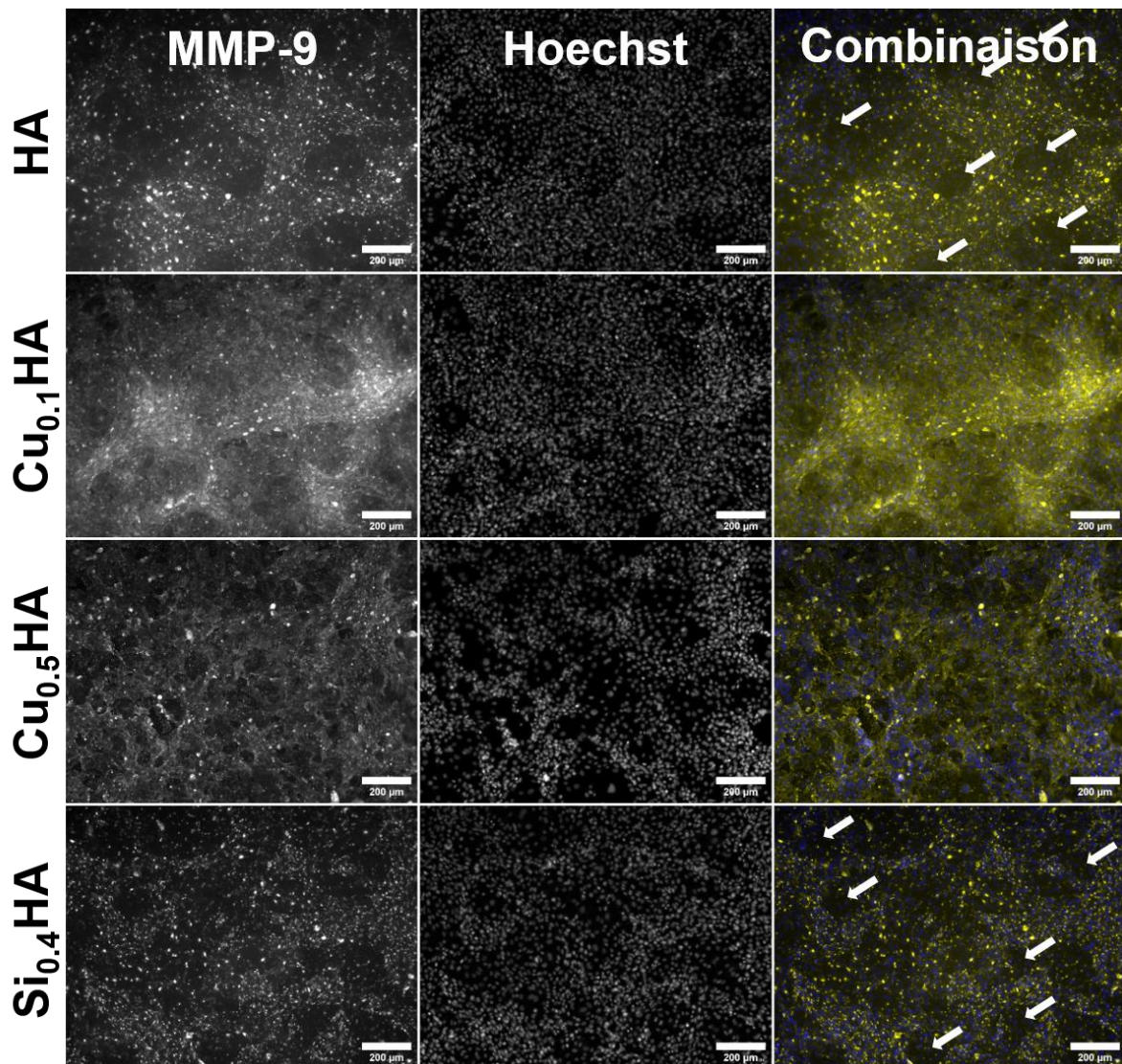


Figure 67 : Expression *in situ* de MMP-9 dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux
Jaune : MMP-9 ; Bleu : noyaux. Flèche blanche : zone contenant des C166 exprimant peu MMP-9.
Barre d'échelle = 200 µm

L'expression *in situ* de MMP-9 dans les C166 cultivées à la surface des 4 matériaux, observée à faible grossissement (Figure 67), est répartie entre une population de cellules exprimant fortement MMP-9 et une autre l'exprimant peu (Figure 67, flèches blanches). L'expression de

MMP-9 est intense dans les C166 formant des fuseaux multicellulaires sur le matériau $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$.

La localisation de MMP-9 dans les C166 après 4 jours de culture à la surface de tous les matériaux est physiologique. Les zones bien délimitées dans les C166 où l'expression de MMP-9 est forte correspondent vraisemblablement aux vésicules cytoplasmiques où est accumulée MMP-9 avant sa sécrétion. L'expression diffuse de MMP-9 dans les C166 correspond vraisemblablement à une localisation membranaire de forme active clivée (56). La modification d'expression de la forme clivée et active de MMP-9 aux alentours de 75 kDa sur les Cu_xHA , présentée sur la Figure 65 D, peut s'expliquer par la différence de leur phénotype d'expression de MMP-9 par rapport aux C166 cultivées à la surface des matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Par rapport à celles-ci, les C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA ont visuellement moins de vésicules cytoplasmiques où est exprimée MMP-9 et elles de plus petites tailles. De plus, les C166 à la surface des matériaux Cu_xHA ont une plus forte expression d'une forme membranaire clivée et active de MMP-9. Ces deux différences suggèrent que MMP-9 est davantage sécrétée par les C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA . Cette sécrétion accrue entraîne la diminution du nombre de vésicules de stockage et l'augmentation du nombre de forme clivée et active sur la membrane plasmique.

Ces résultats suggèrent que les formes clivées et actives de MMP-9 à 75 kDa (bande haute et bande basse de la Figure 65 D) n'ont pas le même devenir après leur sécrétion. La forme basse dont l'expression diminue dans les C166 à la surface des matériaux HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ serait davantage liée à la membrane après sécrétion tandis que la forme haute serait davantage libre. Cela expliquerait que MMP-9 est observée en plus grande quantité au niveau des membranes plasmiques des C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA , et que moins de la forme haute est observée dans ces cellules. Cela suggérerait que la synthèse de MMP-9 est plus importante dans les C166 sur les matériaux Cu_xHA car les expressions relatives de la pro-forme non clivée sont comparables à 4 jour de culture dans toutes les conditions. Le VEGF est capable de stimuler l'expression et la sécrétion de MMP-9 dans différents types cellulaires comme l'épithélium pigmentaire de la rétine (307), les cellules musculaires lisses vasculaires (308) et des cellules endothéliales issues de certaines tumeurs primaires en cas de liaison de VEGF à VEGFR1 (309). Les C166 sur les matériaux Cu_xHA ne semblent pas surexprimer MMP-9 (Figure 65) mais la méthode retenue ne mesure que MMP-9 intracellulaire alors que la sécrétion d'une de ses formes est vraisemblablement augmentée (Figure 66 et Figure 67). Cela est compatible avec la sécrétion augmentée de VEGF par les C166 cultivées sur Cu_xHA . Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer la quantité de MMP-9 sécrétée dans le milieu de culture à l'aide de test ELISA.

La surexpression des formes de MMP-9 dans les C166 sur $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ à 1 jour de culture est trop faible pour être considérée comme significative et n'a pas été analysée qualitativement par immunofluorescence. Il est cependant possible que cette légère surexpression soit due à la surface spécifique plus importante des pastilles (Tableau 13) de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ qui pourrait entraîner un plus grand dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire ou du sérum. L'expression des MMPs étant très sensible à l'environnement extra-cellulaire (55), un lien entre ces deux paramètres ne peut être exclu.

Ces résultats suggèrent que la sécrétion accrue d'une forme active de MMP-9 par les C166 sur les matériaux Cu_xHA est à-même de favoriser leur migration et permettre une signalisation physiologique du VEGF.

IV.1.4. PECAM-1

PECAM-1 est une protéine membranaire spécifique aux cellules endothéliales qui a un rôle structurel essentiel pour l'intégrité physique des vaisseaux sanguins. L'accumulation de PECAM-1 indique la formation de jonctions cellules-cellules consécutives à la maturation d'un vaisseau sanguin. Sa présence est également essentielle à la capacité de migration des cellules endothéliales et à leur capacité de formation de tubules car elle permet la déphosphorylation des FAK comme évoqué en sous-partie I.2.5.2 (81). Compte tenu des différences constatées dans la formation des amas cellulaires et des fuseaux observés dans les expériences précédentes, l'expression de PECAM-1 doit être contrôlée. La Figure 68 illustre la répartition de PECAM-1 *in situ* dans les C166 formant des amas après 4 jours de culture sur les différents matériaux.

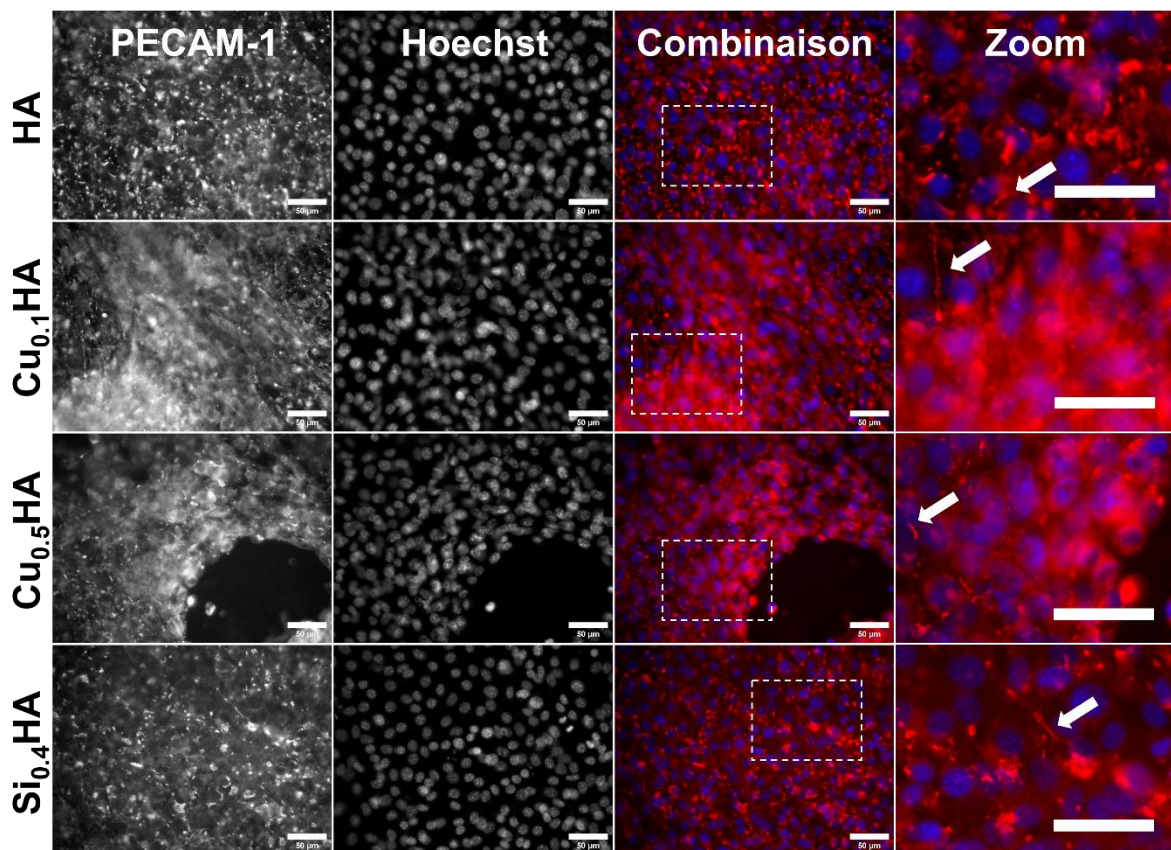


Figure 68 : Observation *in situ* de PECAM-1 dans les C166 formant des amas après 4 jours de culture sur les matériaux

Rouge : PECAM-1. Bleu : noyaux. Les flèches blanches illustrent des zones enrichies en PECAM-1 et orientées le long des jonctions cellules-cellules et/ou de l'axe des cellules environnantes. Barre d'échelle = 50 µm.

L'expression *in situ* de PECAM-1 dans les C166 au sein d'amas après 4 jours de culture (Figure 68) sur l'HA se décompose en deux localisations. Premièrement, il existe des zones intracellulaires d'apparence globulaire, ou occasionnellement allongées, où PECAM-1 est fortement présente. Les zones allongées où PECAM-1 est fortement exprimée sont situées à l'interface entre des cellules (Figure 68 flèches blanches). Deuxièmement, PECAM-1 est aussi exprimée de manière diffuse suivant une localisation cytoplasmique ou membranaire avec un niveau d'expression variable selon les cellules. Ces 2 types de localisation de PECAM-1 sont

retrouvées dans les C166 sur tous les autres matériaux mais à des niveaux d'expression différents. Ces localisations sont celles attendues de PECAM-1 qui est présente sur l'ensemble de la membrane plasmique et qui s'accumule dans des zones de contact entre cellules endothéliales (310). Les C166 sur $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ ont un phénotype d'expression de PECAM-1 comparable à celui sur l'HA. Le phénotype d'expression de PECAM-1 des C166 sur les matériaux Cu_xHA est différent avec des zones d'amas cellulaires où de très nombreuses cellules ont une forte expression diffuse de PECAM-1.

La présence de zones allongées où l'expression de PECAM-1 est importante à l'interface entre des cellules sur tous les matériaux est typique d'une population cellulaire à confluence sans chevauchement cellulaire. La localisation de PECAM-1 étant déterminée par les zones de contact entre les cellules, cela signifie que les cellules ne participant pas aux fuseaux multicellulaires ont une organisation et une mobilité réduite, qui sont similaires entre toutes les conditions.

L'accumulation de PECAM-1 dans les cellules des amas cellulaires formant des fuseaux sur les matériaux Cu_xHA , est compatible avec la formation d'une couche de cellules en migration. La proximité des cellules dans le fuseau et la superposition, au moins partielle, de leur membrane plasmique favorise l'accumulation de PECAM-1 et les jonctions formées peuvent favoriser la migration des cellules (81), (80). Ces résultats suggèrent que les C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA ont une mobilité accrue, compatible avec la migration de cellules endothéliales pendant l'angiogenèse par bourgeonnement.

IV.1.5. VE-Cadhérine

La VE-Cadhérine est une protéine membranaire essentielle à l'organisation structurelle des vaisseaux sanguins (75). Elle participe aux jonctions adhérentes des cellules endothéliales et sa localisation renseigne sur leur activité. Une forte expression membranaire sur tout le contour cellulaire est caractéristique de cellules quiescentes tandis qu'une localisation membranaire, parfois enrichie aux pôles cellulaires, est typique de cellules endothéliales en migration comme évoqué en sous-partie I.2.5.1. La Figure 69 présente la localisation de VE-Cadhérine dans les C166 sur les matériaux après 4 jours de culture.

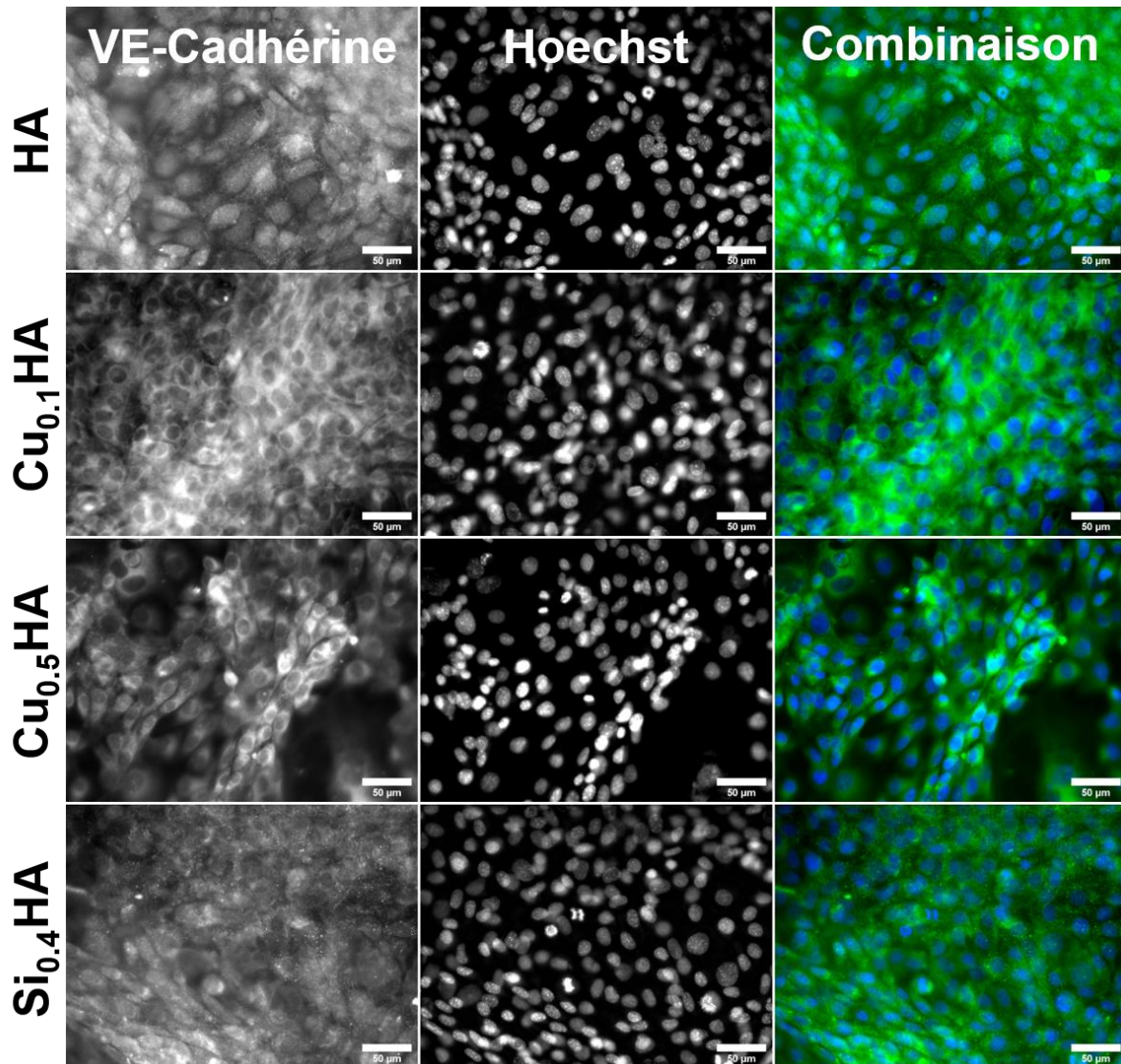


Figure 69 : Expression *in situ* de VE-Cadhérine dans les C166 après 4 jours de culture sur les matériaux

Vert : VE-Cadhérine ; Bleu : noyaux. Barre d'échelle = 50 µm

La VE-Cadhérine dans les C166 après 4 jours de culture (Figure 69) sur l'HA est exprimée par l'ensemble des cellules. Les C166 présentes dans des amas cellulaires l'expriment davantage. Au sein des cellules il existe des zones exprimant plus de VE-Cadhérine, sans que leur localisation suggère une présence aux interfaces entre les cellules. Ce phénotype d'expression est retrouvé dans toutes les C166 à la surface des autres matériaux $\text{Cu}_{0,1}\text{HA}$, $\text{Cu}_{0,5}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0,4}\text{HA}$. Les zones intracellulaires enrichies en VE-Cadhérine sont très présentes dans les cellules faisant partie des amas en forme de fuseaux multicellulaires sur les matériaux Cu_xHA .

D'après la localisation de VE-Cadhérine, toutes les cellules dans toutes les conditions sont en migration ce qui est cohérent avec les précédentes observations des filaments d'actine de la sous-partie III.2.2, qui indiquent l'absence de quiescence de la population cellulaire. Comme rapporté en sous-partie I.2.5.1, l'expression de VE-Cadhérine plus importante dans certaines

zones intracellulaires dans les cellules des amas et des fuseaux cellulaires est similaire à ce qui est attendu dans le cas de l'angiogenèse par bourgeonnement.

Le mécanisme d'internalisation de la VE-Cadhérine suite à l'activation de VEGFR2 par le VEGF, décrit dans la sous-partie I.2.5.1, pourrait aussi expliquer en partie la présence diffuse de VE-Cadhérine dans le cytoplasme en dehors des zones où les jonctions adhérentes devraient être localisées.

Ce mécanisme est en accord avec la présence dans toutes les conditions de VEGF sécrété (Figure 59) et d'une expression intense de VEGFR2 par les C166 dans les amas multicellulaires (Figure 61) où la VE-Cadhérine est fortement exprimée (Figure 69). Il est également possible qu'une partie de la VE-Cadhérine est absente des jonctions adhérentes des conditions étudiées en raison de l'expression et la sécrétion de MMP-9 (Figure 66 et Figure 67). MMP-9 est capable de cliver la VE-Cadhérine, ce qui conduit à la dissociation des jonctions adhérentes et accroît la perméabilité de vaisseaux sanguins *in vitro* et *ex vivo* (79).

IV.1.6. Expression de marqueurs régulateurs de l'angiogenèse

Les protéines eNOS et vWF sont largement impliquées dans l'angiogenèse comme décrit dans les sous-parties I.2.4.6 et I.2.4.5. La protéine eNOS agit tantôt en tant qu'initiateur ou qu'inhibiteur de l'angiogenèse selon le contexte. La protéine vWF agit en tant qu'inhibiteur de l'angiogenèse. L'expression des ARNm codant pour ces deux protéines est contrôlée par RT-qPCR à 7 jours de culture.

IV.1.6.1. eNOS

L'expression de l'ARNm d'eNOS dans les C166 cultivées pendant 7 jours sur les matériaux a été mesurée par RT-qPCR, les résultats sont présentés dans la Figure 70.

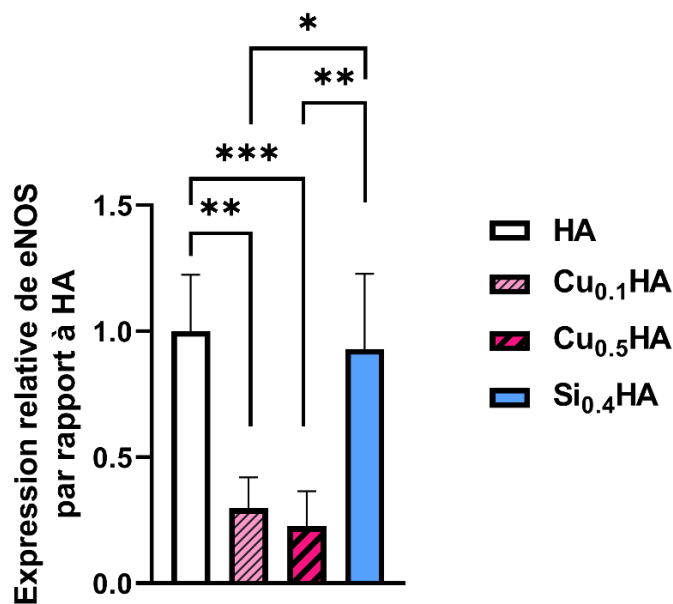


Figure 70 : Expression d'eNOS par les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux

Tests statistiques réalisés sur les $\Delta\Delta Ct$, ANOVA à 1 voie suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3. La valeur de référence pour HA est fixée à 1, son écart-type est calculé à partir de la déviation à la moyenne des différents n.

L'expression relative d'eNOS dans les C166 après 7 jours de culture (Figure 70) à la surface de l'HA est de $1,0 \pm 0,3$. A la surface de Cu_{0,1}HA l'expression relative par rapport à HA est de $0,3 \pm 0,16$, sur Cu_{0,5}HA de $0,23 \pm 0,19$ et sur Si_{0,4}HA de $0,93 \pm 0,44$. Les expressions relatives d'eNOS dans les C166 sur les Cu_xHA à 7 jours sont significativement plus faibles que celles sur HA et Si_{0,4}HA qui sont quant à elles comparables.

L'expression d'eNOS est normalement augmentée par la liaison du VEGF à VEGFR2 (70). Or la sécrétion de VEGF par les C166 est augmentée après 7 jours de culture sur les matériaux Cu_xHA (rapporté dans la sous-partie IV.1.1) mais leur expression d'eNOS est réprimée. Cette répression signifie qu'un autre phénomène régule plus fortement et négativement son expression. Cette régulation négative pourrait provenir d'une augmentation de la rigidité du cortex cellulaire des C166 (311). Ce mécanisme serait cohérent avec l'observation d'importants filaments d'actine sous les membranes plasmiques des cellules C166 cultivées sur les matériaux Cu_xHA et ce dès 3 jours de culture jusqu'au 7 jours maximum des observations (Figure 45, Figure 46 et Figure 47). L'hypothèse que ces filaments font partie du cortex cellulaire avait par ailleurs été émise dans la sous-partie associée car ils suivent exclusivement la forme des membranes et sont distincts des fibres de stress intracellulaires (III.2.2). La répression de l'expression d'eNOS permettrait de stabiliser le bourgeonnement angiogénique une fois celui-ci initié par l'action conjointe de VEGF et NO. Ces données indiquent que la maturation des fuseaux de cellules est en cours après 7 jours de culture, et qu'elle est probablement active dès sa formation initiale à 3 jours, dans les C166 sur les matériaux Cu_xHA.

IV.1.6.2. vWF

L'expression de l'ARNm de vWF dans les C166 cultivées pendant 7 jours sur les matériaux a été mesurée par RT-qPCR, les résultats sont présentés dans la Figure 71.

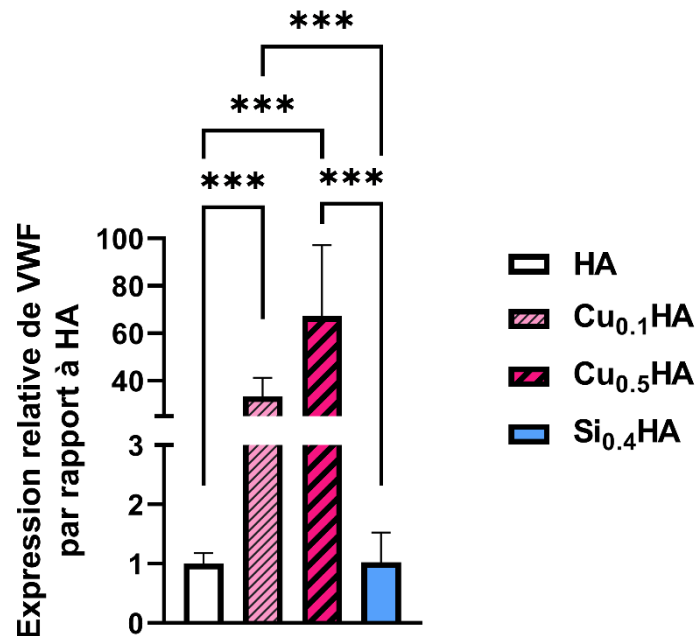


Figure 71 : Expression de vWF par les C166 après 7 jours de culture sur matériaux

Tests statistiques réalisés sur les $\Delta\Delta Ct$ ANOVA à 1 voie suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3. La valeur de référence pour l'HA est fixée à 1, son écart-type est calculé à partir de la déviation à la moyenne des différents n.

L'expression relative de vWF par les C166 cultivées pendant 7 jours (Figure 71) à la surface de l'HA est de $1 \pm 0,24$. Dans les C166 à la surface de Cu_{0.1}HA, l'expression relative par rapport à HA est de $33,5 \pm 11,2$, sur Cu_{0.5}HA de $67,3 \pm 40,2$ et sur Si_{0.4}HA de $1,0 \pm 0,7$. Les expressions relatives de vWF par les C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA à 7 jours, sont significativement plus élevées que celles sur HA et Si_{0.4}HA, qui sont quant à elles comparables entre elles.

La régulation positive de vWF dans les C166 sur les matériaux Cu_xHA peut provenir de leur sécrétion accrue de VEGF présentée dans la sous-partie IV.1.1. La protéine vWF a un rôle régulateur inhibiteur de l'angiogenèse comme rapporté en sous-partie I.2.4.5, sa forte surexpression associée à la répression du facteur initiateur de l'angiogenèse eNOS dans les C166 sur les matériaux Cu_xHA suggère que l'angiogenèse par bourgeonnement est réprimée et que les fuseaux multicellulaires sont dans une étape de maturation (24).

IV.1.7. Evaluation de la capacité de fermeture d'une blessure au sein d'une couche de cellules endothéliales C166

IV.1.7.1. Influence des milieux conditionnés par les matériaux

La vitesse de fermeture d'une blessure dans une couche de cellules dépend de la vitesse de migration des cellules et de leur taux de prolifération. L'effet des produits de dissolution des matériaux sur ces paramètres est étudié par analyse du taux de fermeture d'une blessure. Réaliser ces mesures à la surface du matériau n'a pas été possible en raison de problèmes techniques discutés dans l'Annexe 1.2. Par conséquent, la mesure du taux de fermeture de blessure s'est faite uniquement sur des cellules exposées aux produits de dissolution des matériaux. Comme précisé dans la sous-partie II.2.7.10, ces produits de dissolution sont par la suite appelés milieux conditionnés. L'observation des blessures au cours du temps en présence des milieux conditionnés par les matériaux est présentée dans la Figure 72.

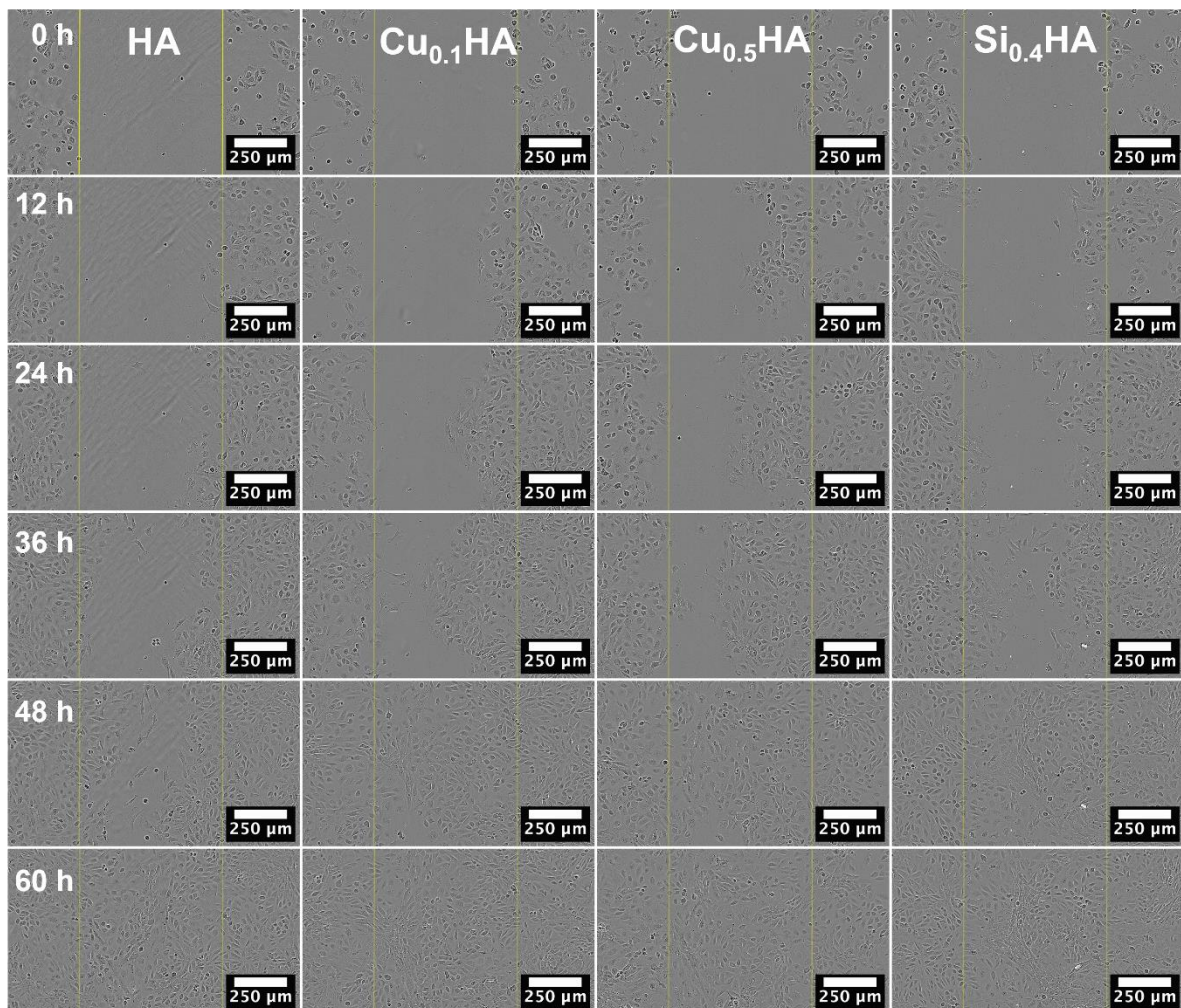


Figure 72 : Test de fermeture de blessure dans une population de C166 exposées à des milieux conditionnés par les matériaux

Lignes jaunes : taille initiale de la blessure. Barre d'échelle = 250 µm.

Un mouvement de la plaque de culture dans le système d'observation entraîne, à partir de 12 h, un décalage de la zone d'observation d'environ 100 µm vers la droite qui explique la

disparition perçue d'une partie des cellules à 12 h sur le côté gauche de la blessure (Figure 72).

Les films réalisés par le système de mesure (illustrés en Figure 72 par tranche de 12 h), montrent que la fermeture d'une blessure dans une couche de C166 (Figure 72), en présence de milieu conditionné par le matériau HA, commence avec une prolifération des cellules. Cette prolifération permet à la population de cellules d'atteindre une confluence de 100% en dehors de la blessure après 12 h à 24 h de culture. Ensuite, les cellules progressent en proliférant et en migrant par les deux bords vers le centre de la blessure, jusqu'à sa fermeture complète après 60 h (Figure 72, t = 60 h). Le même déroulement est observé en présence des milieux conditionnés par les matériaux $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$, $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Une cinétique de fermeture légèrement plus rapide est observée en présence de milieu conditionné par le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ avec une fermeture totale de la blessure fréquente dès 48 h comme illustré ici (Figure 72, $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$, t = 48 h).

Les mesures des taux de fermeture de la blessure sont présentées dans la Figure 73. Des mesures issues de conditions non présentées dans la Figure 72 et servant de contrôles (détaillées dans le paragraphe suivant) y sont rapportées.

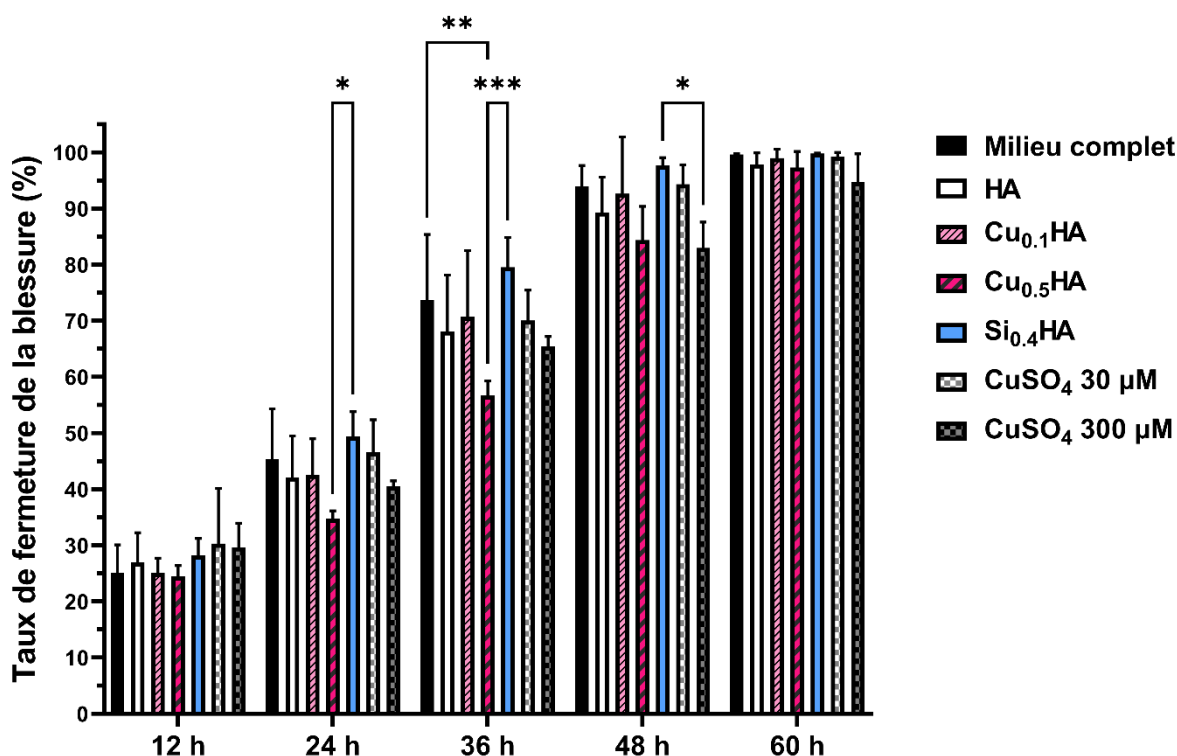


Figure 73 : Taux de fermeture d'une blessure par une population de C166 exposées à des milieux conditionnés

CuSO_4 : concentration du composé ajouté à du cDMEM. Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3

Le CuSO_4 est utilisé pour répliquer les concentrations de cuivre en solution mesurées dans les milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA . C'est un composé ayant montré des effets stimulants sur des cellules endothéliales en raison du cuivre et non de son anion SO_4^{2-} (13).

CuSO₄ à 30 µM ou à 300 µM vise à répliquer les conditions des milieux conditionnés par Cu_{0,1}HA et Cu_{0,5}HA respectivement d'après les concentrations de cuivre similaires retrouvées dans leur environnement après 4 jours de culture (Figure 58).

Le taux de fermeture d'une blessure au sein d'une population de C166 exposée à du milieu conditionné par l'HA (Figure 73) est d'environ 25% après 12 h, 45% après 24 h, 70% après 36 h, 90% après 48 h et 100% après 60 h. Le taux de fermeture de la blessure dans toutes les conditions testées est comparable à tous les temps avec ceux obtenus en présence du milieu conditionné par l'HA. En revanche, toutes les autres conditions ne sont pas comparables entre elles. Les C166 exposées à du milieu conditionné par Si_{0,4}HA, referment significativement plus rapidement la blessure que celles exposées à du milieu conditionné par Cu_{0,5}HA à 24 h, avec un taux de fermeture de 49,4% ± 4,4% contre 34,7% ± 1,4% et à 36 h avec un taux de fermeture de 79,5% ± 5,3% contre 56,7% ± 2,7%. A 36 h également, les cellules exposées à du milieu seul referment plus rapidement la blessure que celles exposées au milieu de Cu_{0,5}HA avec un taux de fermeture de 73,7% ± 11,7% contre 56,7% ± 2,7%. A 48 h, le milieu conditionné par Si_{0,4}HA accélère la fermeture de la blessure par rapport aux cellules exposées à du CuSO₄ à 300 µM avec des taux de fermeture de 97,6% ± 1,5% contre 83% ± 4,6% respectivement. De plus, deux différences dans le taux de fermeture de la blessure à 36 h à la limite de la significativité statistique (p-value = 0,05) existent avec une fermeture plus importante en présence de milieu conditionné par Cu_{0,1}HA par rapport à celui de Cu_{0,5}HA (70,7% ± 11,8% contre 56,7% ± 2,7%) et en présence de milieu conditionné par Si_{0,4}HA par rapport à celui contenant CuSO₄ à 300 µM (79,5% ± 5,3% contre 65,4% ± 1,8%).

Ces résultats indiquent que le milieu conditionné par Si_{0,4}HA est stimulateur de la vitesse de fermeture de blessure. Les milieux contenant une forte (~300 µM) concentration de cuivre, comme celui conditionné par Cu_{0,5}HA et celui contenant 300 µM de CuSO₄ ralentissent la fermeture de la blessure.

L'effet stimulateur de Si_{0,4}HA sur la vitesse de fermeture de la blessure par les C166 ne peut, à priori, pas s'expliquer par une prolifération accrue des C166, comme rapporté en sous-partie III.2.5. Cela suggère que le milieu conditionné par Si_{0,4}HA pourrait accélérer la vitesse de migration des cellules et/ou que ce milieu conditionné augmente la prolifération des cellules et que celles cultivées à la surface de Si_{0,4}HA ont leur prolifération ralentie par leur contact avec le matériau. Cependant, l'étude des paramètres physiques montre au contraire que la surface spécifique accrue de Si_{0,4}HA devrait faciliter la prolifération et/ou la migration des cellules à la surface du matériau comme discuté en sous-partie III.1.5. Il est donc probable que l'effet observé dans la Figure 72 et la Figure 73 soit issu d'une stimulation de la vitesse de migration des cellules endothéliales. Cette stimulation exercée par le milieu conditionné par Si_{0,4}HA provient de sa chimie qui entraîne la présence de silicium en solution. Ce silicium, bien que non détecté, doit être présent en solution en raison de la solubilisation du matériau comme décrit en partie III.2.6.

L'effet négatif d'une forte concentration de cuivre s'explique probablement par le stress cellulaire qu'elle induit. Ce stress cellulaire entraîne à terme une surmortalité comme décrit dans les mesures de la mortalité cellulaire par incorporation de l'IP (sous-partie III.2.4).

La faible tendance à stimuler le taux de fermeture d'une blessure du milieu conditionné par le matériau Cu_{0,1}HA, et l'absence d'effet mesurable des 30 µM de CuSO₄ peuvent s'expliquer par les cinétiques d'action du cuivre mesurées précédemment : la prolifération des C166 n'est augmentée que le 3^{ème} jour et de façon brève ce qui entraîne des densités cellulaires comparables (sous-partie III.2.5 et III.2.2) ; la sécrétion de VEGF164 est plus importante après

4 jours de culture mais elle n'a pas été mesurée après exposition à du milieu conditionné (sous-partie IV.1.1). Elle pourrait donc résulter d'une augmentation progressive de la capacité de sécrétion des C166 en raison de l'exposition prolongée au cuivre.

L'activité métabolique des cellules 3 jours après l'ajout des milieux conditionnés a été contrôlée à l'aide d'un test MTT. Cela permet de contrôler la présence d'une éventuelle cytotoxicité du cuivre à forte concentration et/ou de repérer des conditions où les cellules seraient moins nombreuses. Les résultats sont présentés dans la Figure 74.

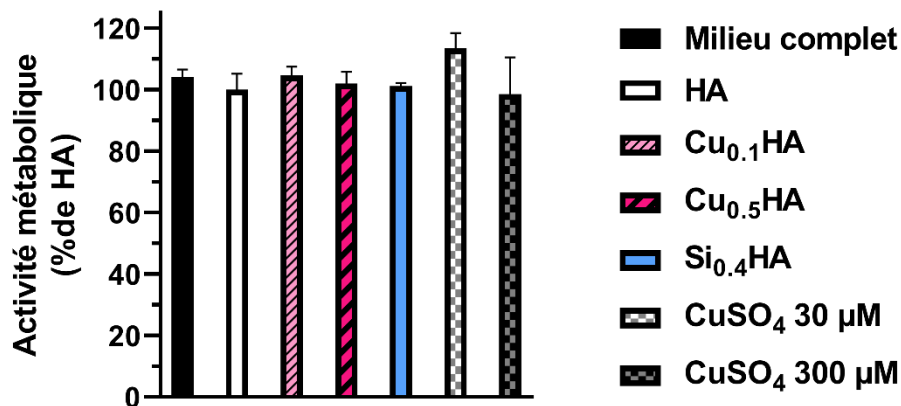


Figure 74 : Activité métabolique de C166 après 3 jours d'exposition à des milieux conditionnés
CuSO₄ : concentration du composé ajouté à du cDMEM. Tests statistiques : ANOVA à 1 voie suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. Nombre d'échantillons indépendants = 3

L'activité métabolique des C166 exposées au milieu conditionné par le matériau HA pendant 3 jours (Figure 74) sert de référence interne et est normalisée à 100 % avec un écart-type mesuré de 5 %. Les activités métaboliques des C166 de toutes les conditions ont des valeurs comparables à HA.

Les mesures précédentes des populations de C166 par comptage (Figure 43) et par test MTT (Figure 51) indiquent que l'activité métabolique est proportionnelle à la densité cellulaire dans les conditions expérimentales. Par conséquent, l'exposition pendant 3 jours aux milieux conditionnés testés (Figure 74) n'affecte pas la densité cellulaire finale des C166.

L'absence de cytotoxicité apparente des milieux contenant de fortes concentrations de cuivre (Figure 74 Cu_{0.5}HA et CuSO₄ 300 µM), mais le retard dans la fermeture de blessure qu'ils entraînent (Figure 73), suggèrent que la cytotoxicité du matériau Cu_{0.5}HA pour les C166 est provoquée par un stress cellulaire soutenu. Ce stress cellulaire provenant d'une exposition prolongée à des concentrations importantes de cuivre est probablement de nature oxydative en raison d'une génération de ROS de nature à endommager les composants cellulaires (212).

Il est également possible que les milieux conditionnés ne contiennent pas exactement les concentrations des éléments chimiques mesurées précédemment par ICP-OES (sous-partie III.2.6). L'absence des matériaux ne permet pas de renouveler les composés solubles ce qui peut entraîner l'épuisement des formes bioactives par réaction avec le milieu ou suite à leur internalisation par les cellules. Seule la concentration initiale des éléments chimiques est contrôlée dans cette expérience. L'utilisation de chambres de Boyden pour séparer les cellules

de la surface du matériau permettrait de se placer dans des conditions plus comparables aux expériences de la partie III.2.

IV.1.7.2. Effet de l'acide ascorbique sur la capacité de fermeture de blessure

La présence de cuivre en solution ayant été confirmée, l'implication de la voie de l'hypoxie suite à la génération de ROS devient une hypothèse à vérifier sur la base des travaux reliant cuivre, ROS et la voie de l'hypoxie par le biais de HIF-1 comme il a été présenté en sous-partie I.2.4.6. Les probables effets pro-angiogéniques du silicium pourraient également passer par une génération accrue de ROS et l'activation de la voie HIF-1 comme évoqué dans la sous-partie I.5.2.2.4. Une méthode pour tester l'implication de la voie de l'hypoxie est de l'inhiber en ajoutant dans le milieu de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique peut maintenir active l'enzyme PHD qui va dégrader la sous-unité HIF-1 α et empêche ainsi l'activation de HIF-1 (64) (Figure 6). L'observation des blessures au cours du temps en présence de milieux conditionnés par les matériaux, et additionnés d'acide ascorbique est présentée dans la Figure 75.

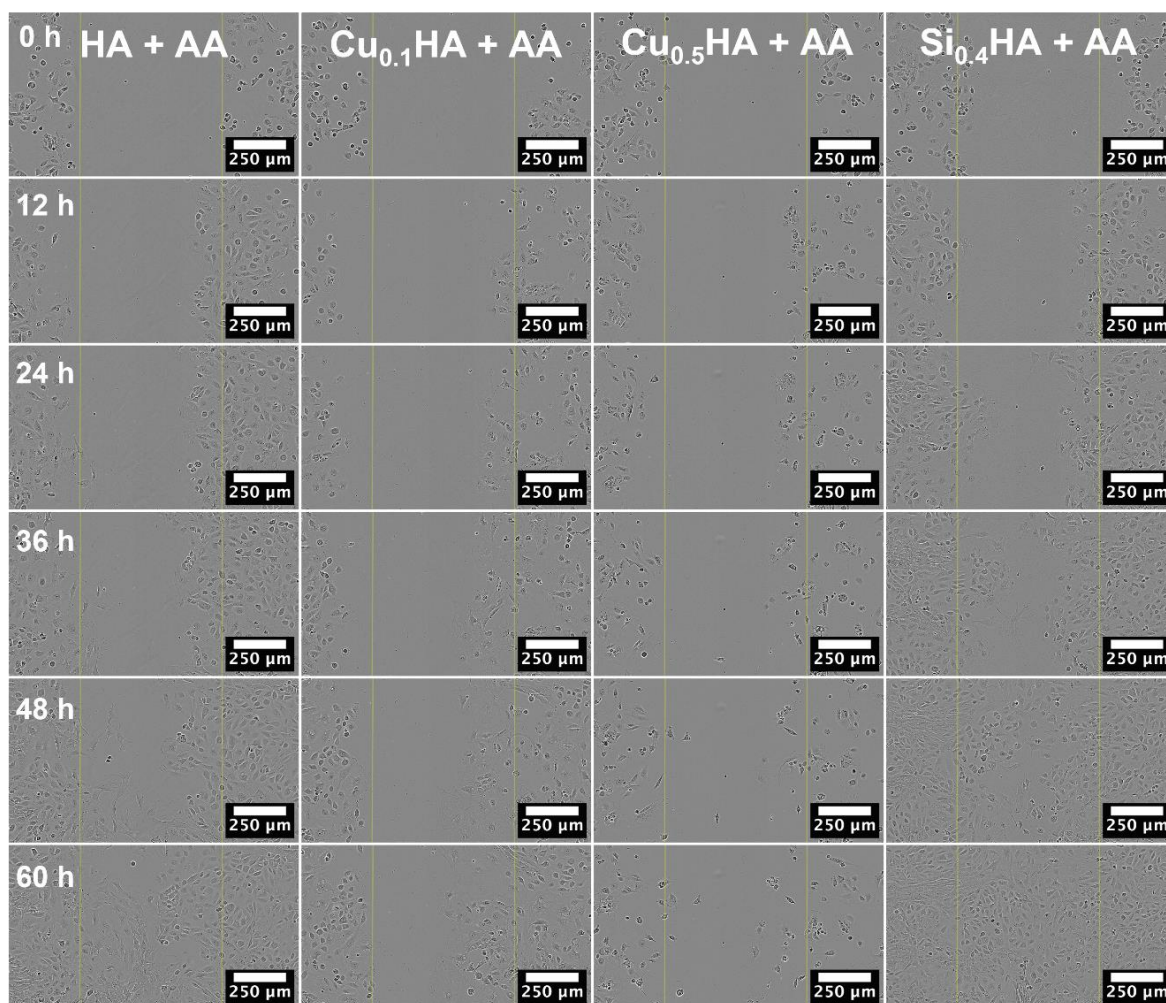


Figure 75 : Test de fermeture de blessure par les C166 exposées à des milieux conditionnés par les matériaux et en présence d'acide ascorbique

AA : Acide ascorbique à 50 µM. Lignes jaunes : taille initiale de la blessure. Barre d'échelle = 250 µm.

Un mouvement de la plaque de culture dans le système d'observation entraîne, à partir de 12 h, un décalage de la zone d'observation d'environ 100 µm vers la droite qui explique la disparition perçue d'une partie des cellules à 12 h sur le côté gauche de la blessure (Figure 75).

Les films réalisés par le système de mesure (illustrés en Figure 75 par tranche de 12 h), montrent que la fermeture d'une blessure dans une couche de C166 exposée à 50 µM d'acide ascorbique en présence de milieu conditionné par le matériau HA (Figure 75), est réalisée en deux temps. Premièrement, les cellules prolifèrent jusqu'à une confluence locale de 100%. Deuxièmement, les cellules prolifèrent et migrent vers le centre de la blessure. La confluence locale de 100% est atteinte entre 12 h et 24 h (Figure 75, HA, 12 h droite de la blessure et 24 h gauche de la blessure). Les cellules progressent ensuite vers le centre de la blessure jusqu'à 60 h après sa génération, où sa fermeture est encore incomplète. Les C166 exposées à du milieu conditionné par Si_{0.4}HA et 50 µM d'acide ascorbique se comportent similairement à celles de la condition HA et la fermeture de la blessure est également incomplète après 60 h. Les C166 exposées à du milieu conditionné par les matériaux Cu_xHA et 50 µM d'acide ascorbique, ont une vitesse de fermeture de leur blessure encore plus ralentie que celles

exposées aux milieux conditionnés par l'HA et le Si_{0,4}HA avec 50 µM d'acide ascorbique. La confluence locale de 100% n'est atteinte qu'après 48 h en présence du milieu conditionné par Cu_{0,1}HA et 50 µM d'acide ascorbique, tandis qu'elle n'est jamais atteinte avec celui de Cu_{0,5}HA et 50 µM d'acide ascorbique. La blessure n'est pas fermée après 60 h dans ces deux conditions avec une progression plus importante de la couche de cellules vers le centre de la blessure en présence du milieu de Cu_{0,1}HA. L'étude des films réalisés par le système de mesure, révèle que malgré une prolifération très limitée des C166 en présence du milieu conditionné par Cu_{0,5}HA, quelques cellules isolées migrent et se rapprochent du centre de la blessure après 60 h.

Les mesures des taux de fermeture de la blessure sont présentées dans la Figure 76. Des mesures issues de conditions non présentées dans la Figure 75 précédente et servant de contrôles y sont rapportées.

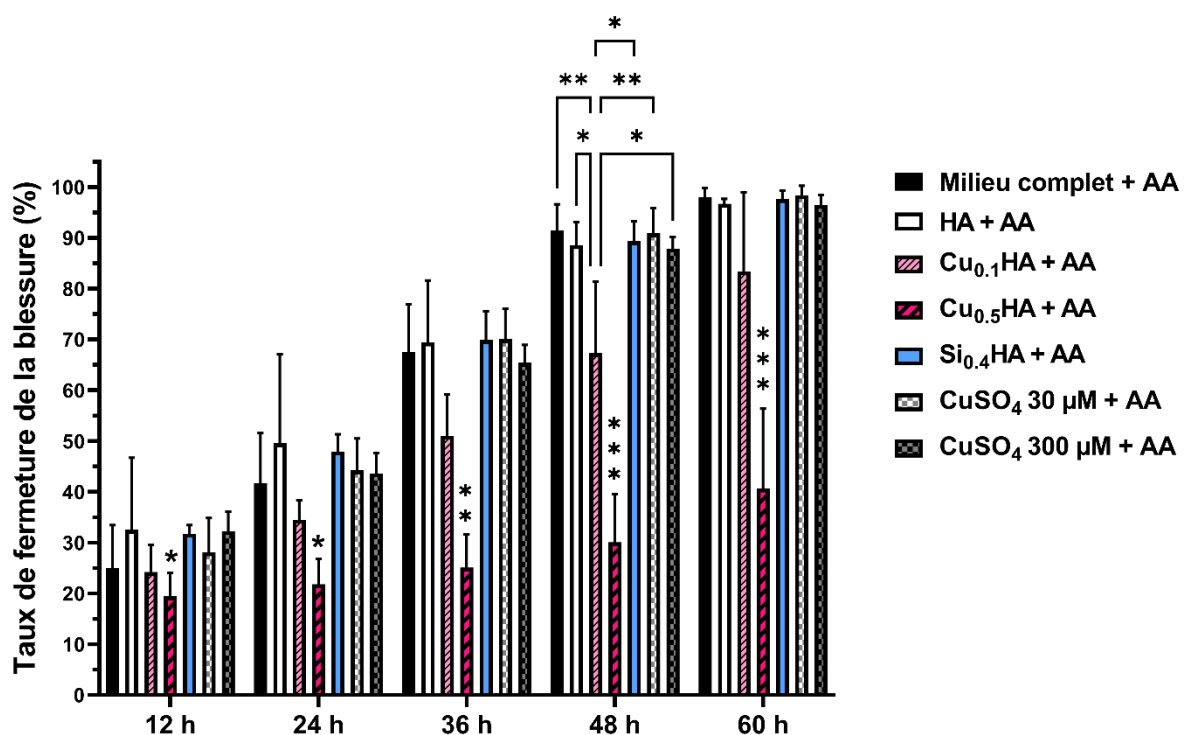


Figure 76 : Taux de fermeture d'une blessure par une population de C166 exposées à des milieux conditionnés et en présence d'acide ascorbique

AA : acide ascorbique 50 µM. CuSO₄ : concentration du composé ajouté à du cDMEM. Tests statistiques : ANOVA à 2 voies suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3. Cu_{0,5}HA + AA est significativement différent de toutes les conditions à 12 h, 24 h et 36 h sauf avec Cu_{0,1}HA + AA, puis avec toutes les conditions à 48 h et 60 h.

Toutes les conditions évoquées dans le paragraphe ci-dessous contiennent 50 µM d'acide ascorbique même si cela n'est pas systématiquement précisé.

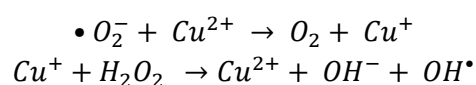
Le taux de fermeture d'une blessure au sein d'une population de C166 exposée à 50 µM d'acide ascorbique (Figure 76) et à du milieu conditionné par l'HA est d'environ 30% après 12 h, 50% après 24 h, 70% après 36 h, 90% après 48 h et moins de 100% après 60 h. Des

variations importantes des taux de fermeture de la blessure sont observées à 12 h, 24 h et 36 h. A l'exception des cellules exposées aux milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA , toutes les conditions ont des taux de fermeture comparables à tous les temps. Avec des cellules exposées au milieu conditionné par le matériau $Cu_{0.5}HA$, le taux de fermeture est d'environ 20% à 12 h jusqu'à un maximum de 40% à 60 h ce qui est significativement inférieur à toutes les autres conditions à l'exception de $Cu_{0.1}HA$ à 12 h, 24 h et 36 h. En plus de ces différences, les cellules exposées au milieu conditionné par le matériau $Cu_{0.1}HA$ referment moins rapidement la blessure à 48 h par rapport aux autres conditions. Son taux de fermeture est de $67,3\% \pm 14\%$ contre $91,4\% \pm 5,2\%$ (milieu complet), $88,6\% \pm 4,6\%$ (HA), $89,4\% \pm 3,8\%$ ($Si_{0.4}HA$), $90,9\% \pm 4,9\%$ ($CuSO_4$ 30 μM) et $87,9\% \pm 2,3\%$ ($CuSO_4$ 300 μM). Aux autres temps, le taux de fermeture de la blessure de la condition $Cu_{0.1}HA$ est comparable aux autres conditions.

La progression de la fermeture de la blessure par les C166 exposées aux milieux conditionnés par HA, $Si_{0.4}HA$, $CuSO_4$ 30 et 300 μM en présence d'acide ascorbique (Figure 75) est très similaire à ce qui est observé en absence d'acide ascorbique (Figure 72). En revanche, elle est plus lente car la blessure n'est pas refermée après 60 h (Figure 76 contre Figure 73). L'acide ascorbique a donc un effet inhibiteur sur la prolifération et/ou la migration des C166. L'inhibition de la voie HIF-1 par l'acide ascorbique peut être à l'origine d'un arrêt temporaire de la prolifération et/ou de la migration des C166 induite notamment par VEGF. Cela expliquerait le retard de ces cellules pour fermer la blessure par rapport aux conditions sans acide ascorbique. L'acide ascorbique peut également favoriser la génération de ROS qui entraîneraient des dégâts à l'ADN/aux protéines susceptibles de ralentir le cycle cellulaire à cause des réparations nécessaires. Les effets négatifs de l'acide ascorbique sont issus d'un événement bref, de quelques heures tout au plus, en raison du temps de demi-vie d'environ 20 min de l'acide ascorbique en solution aqueuse à pH neutre (312).

La perte de l'effet stimulateur sur la vitesse de fermeture de la blessure par le milieu conditionné par $Si_{0.4}HA$ en présence d'acide ascorbique suggère que cet effet stimulateur est médié par HIF-1. Comme évoqué dans le paragraphe précédent, il est aussi possible qu'une génération accrue de ROS par l'acide ascorbique bloque transitoirement la fermeture de la blessure indépendamment des stimulations exercées par le milieu. Cette hypothèse sera étudiée ultérieurement dans la partie IV.1.9.

La présence d'acide ascorbique ralentit très fortement la prolifération et la migration des C166 exposées au milieu conditionné par le matériau $Cu_{0.1}HA$. Ce ralentissement de la prolifération et la migration des cellules est encore plus intense sur les C166 exposées au milieu conditionné par le matériau $Cu_{0.5}HA$. L'hypothèse la plus probable est une génération importante de ROS suite à une interaction entre l'acide ascorbique et le cuivre. En effet, un stress oxydatif induit par la présence d'une concentration de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 d'environ 1 mM est capable d'entraîner un arrêt transitoire de la prolifération de cellules (313). L'acide ascorbique peut agir comme agent réducteur à la place du radical superoxyde dans la réaction de Haber-Weiss suivante :



D'après (212).

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est lui produit en permanence par le métabolisme des cellules. Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif produit par les cellules et possède un pouvoir

oxydant supérieure au H_2O_2 (212). En présence d'acide ascorbique, le $CuSO_4$ ne réplique pas les effets des milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA malgré une concentration de cuivre initiale comparable. Plusieurs phénomènes pourraient expliquer ces dissimilarités. Premièrement, la concentration réelle de cuivre en solution après ajout de $CuSO_4$ pourrait être inférieure à la concentration ajoutée initialement, en raison de réactions irréversibles avec l'environnement ou d'internalisation par les cellules C166. Cela pourrait expliquer l'absence de ralentissement de la vitesse de fermeture de la blessure des conditions $CuSO_4$ rapportée en Figure 76. Cependant, cette hypothèse est en contradiction avec les résultats de la Figure 73, où la vitesse de fermeture de la blessure de la condition $CuSO_4$ 300 μM est ralentie de façon similaire à celle de la condition $Cu_{0.5}HA$. Deuxièmement, il est possible que les concentrations de $CuSO_4$ ajoutées soient bien équivalentes aux concentrations de cuivre des milieux conditionnés par les matériaux. Dans ce cas-là, les résultats observés précédemment pourraient être expliqués par une différence d'accessibilité du cuivre. Cela pourrait survenir si le sérum de veau fœtal du milieu complet est dans un état différent entre les deux conditions. Bien que dans les deux cas le milieu est laissé pendant 4 jours à 37°C, 5% CO_2 en atmosphère saturée en humidité, le conditionnement par les matériaux Cu_xHA entraîne un relargage progressif du cuivre, alors que $CuSO_4$ est ajouté extemporanément. La présence continue de cuivre dans le milieu conditionné par les matériaux Cu_xHA pourrait entraîner une dégradation progressive des protéines du sérum suite à la génération de ROS. Cet aspect a été évoqué dans la sous-partie : « Rôle biologique du cuivre » (I.5.2.2.3.1). La dégradation affecterait, parmi les autres protéines, des chaperons protéïques du cuivre comme la céruléoplasmine (204). Si ces chaperons protéïques des milieux conditionnés sont moins fonctionnelles, alors davantage de cuivre peut être libre et donc réactif. Cela est susceptible d'entraîner une plus forte génération de ROS en présence d'acide ascorbique, ce qui entraînerait un stress cellulaire pouvant expliquer le retard constaté sur la Figure 75 et mesuré sur la Figure 76 (212), (213).

L'activité métabolique des cellules 3 jours après l'ajout des milieux conditionnés en présence d'acide ascorbique a été contrôlée à l'aide d'un test MTT, les résultats sont présentés dans la Figure 77.

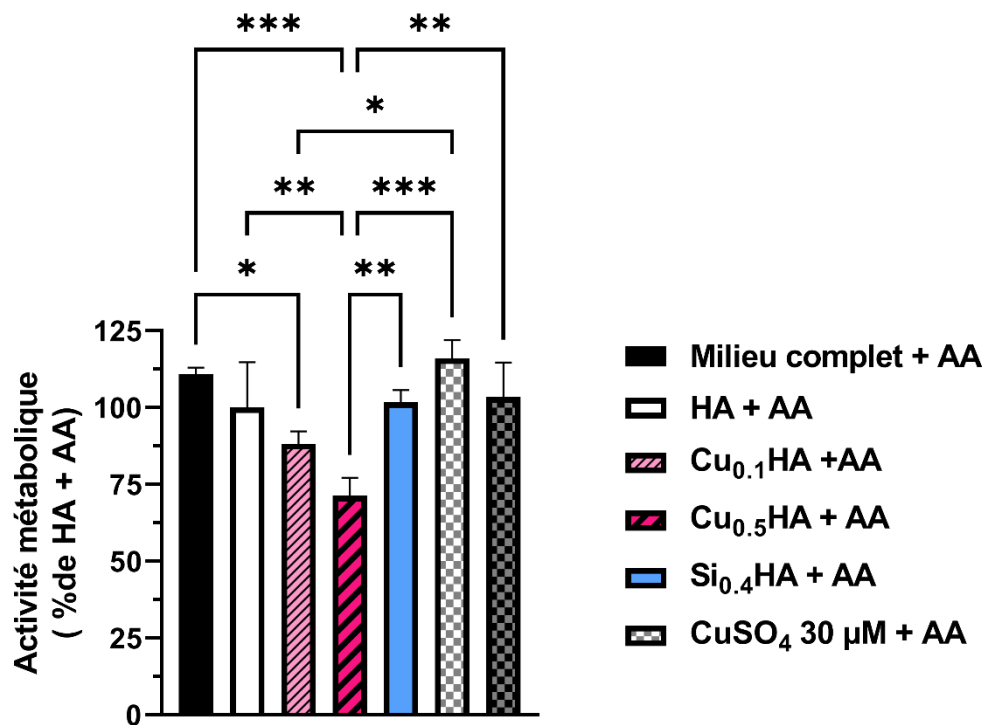


Figure 77 : Activité métabolique de C166 après 3 jours d'exposition à des milieux conditionnés en présence d'acide ascorbique.

AA : acide ascorbique 50 µM. CuSO₄ : concentration du composé ajouté à du cDMEM. Tests statistiques : ANOVA à 1 voie suivie d'un test *post-hoc* de Tukey. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; *** : p-value < 0,001. Nombre d'échantillons indépendants = 3

L'activité métabolique des C166 exposées au milieu conditionné par le matériau HA en présence de 50 µM d'acide ascorbique pendant 3 jours (Figure 77), sert de référence interne et est normalisée à 100 % avec un écart-type mesuré de 14,7 %. Les activités métaboliques des C166 des conditions milieu complet, Si_{0.4}HA, CuSO₄ 30 µM et 300 µM, en présence de 50 µM d'acide ascorbique, ont des valeurs comparables aux C166 de la condition HA. L'activité métabolique des C166 exposées au milieu conditionné par le matériau Cu_{0.1}HA en présence de 50 µM d'acide ascorbique, est significativement inférieure à celles des C166 exposées au milieu complet et au CuSO₄ 30 µM en présence de 50 µM d'acide ascorbique, avec une valeur de 88,2 ± 4,1% contre 110,9 ± 2,1% et 116,1 ± 5,8% respectivement. En présence de 50 µM d'acide ascorbique, l'activité métabolique des C166 exposées au milieu conditionné par le matériau Cu_{0.5}HA est significativement inférieure à l'activité métabolique des C166 de toutes les conditions, sauf de celles exposées au milieu de Cu_{0.1}HA en présence de 50 µM d'acide ascorbique. L'activité métabolique des C166 de la condition Cu_{0.5}HA est de 71,3 ± 5,8% contre 110,9 ± 2,1% pour le milieu seul, 100 ± 14,7% pour HA, 101,7 ± 4% pour Si_{0.4}HA, 116,1 ± 5,8% pour CuSO₄ 30 µM et 103,4 ± 11,3% pour CuSO₄ 300 µM.

En présence d'acide ascorbique, les cellules C166 ont une activité métabolique réduite et/ou sont moins nombreuses quand exposées aux milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA qu'à ceux des autres milieux conditionnés. Il existe un effet-dose du cuivre présent dans les milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA. Plus le cuivre est concentré, plus la réduction de l'activité métabolique/de la densité cellulaire en présence d'acide ascorbique est

importante. L'existence de ces réductions appuie l'hypothèse d'un stress cellulaire intense exercé par des ROS générés par la réactivité de l'acide ascorbique et du cuivre.

Les conditions contenant du cuivre par le biais d'un ajout de CuSO_4 ne répliquent pas les effets observés sur l'activité métabolique des C166 cultivées avec les milieux conditionnés par Cu_xHA , malgré des concentrations théoriquement similaires à celles rencontrées d'après les données d'ICP-OES des Cu_xHA à 4 jours de culture (Figure 58). Cela pourrait être dû à l'état dans lequel se trouve le cuivre dans cette condition supplémentée comme discuté précédemment dans cette même sous-partie.

IV.1.8. Expression *in situ* de HIF-1 α

Le cuivre et le silicium agissant probablement sur l'angiogenèse par le biais de la voie HIF-1 (comme évoqué dans les sous-parties I.5.2.2.3.2 et I.5.2.2.4.2 et d'après les résultats des parties précédentes), cette dernière doit être étudiée. Pour explorer le rôle de cette voie, son expression et sa localisation *in situ* en condition sans et avec acide ascorbique ont été recherchées. L'expression *in situ* de HIF-1 α des C166 après 7 jours de culture sur les matériaux est présentée dans la Figure 78.

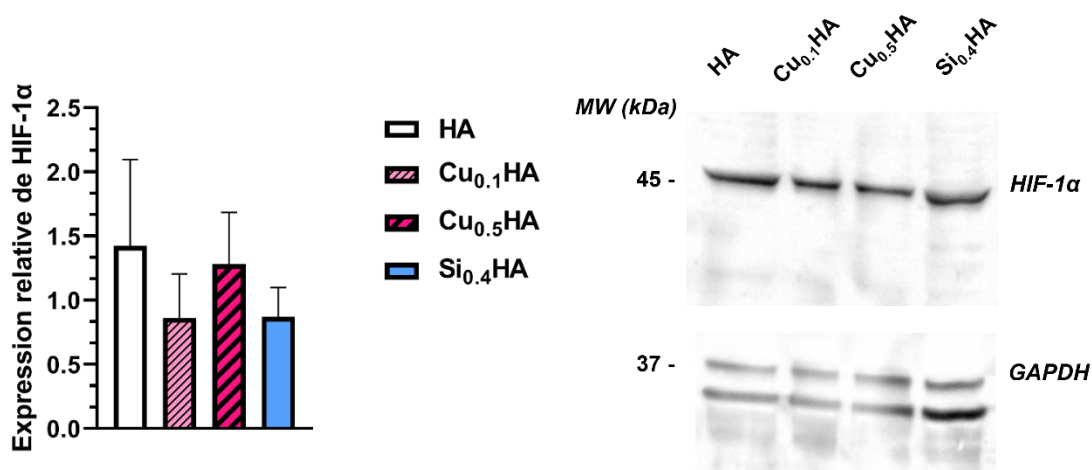


Figure 78 : Expression *in situ* de HIF-1 α dans les C166 après 7 jours de culture sur les matériaux
Gauche : Expressions relatives entre les conditions obtenues en rapportant la proportion du signal HIF-1 α sur la proportion du signal GAPDH. Droite : Membrane du Western Blot. Nombre d'échantillons indépendants = 3.

L'expression *in situ* de HIF-1 α dans les C166 après 7 jours de culture (Figure 78) est comparable sur tous les matériaux avec des moyennes proches et des écart-types se croisant.

Ce niveau d'expression comparable de HIF-1 α , montre que l'activité de la PHD n'est pas significativement modifiée dans les C166 sur les différents matériaux après 7 jours de culture. Cela suppose que le niveau de ROS est comparable entre les conditions et/ou que les cofacteurs de la PHD sont dans une disponibilité comparable.

HIF-1 α est une protéine de 836 acides aminés, chez la souris, retrouvée d'ordinaire aux alentours, ou au-dessus, de 90 kDa après migration. La forme détectée à environ 45 kDa dans toutes les conditions, ne correspond pas à un fragment dégradé car la dégradation normale de HIF-1 α passe par le protéasome. Cela engendre des fragments de quelques dizaines

d'acides aminés au maximum qui ne sont pas observés (pas de trainée visible sur les membranes à l'instar de celle présentée en Figure 78). Il est possible que HIF-1 α dans les C166 soit majoritairement modifiée par épissage alternatif²⁶ en une protéine plus courte. Chez l'humain, le pré-ARNm de HIF-1 α peut être épissé en une dizaine d'ARNm différents dont le plus court code pour un variant de 417 acides aminés uniquement. Ces variants conservent leurs fonctions et peuvent dimériser avec HIF-1 β . Certains variants peuvent être exprimés plusieurs ordres de grandeur de plus que les autres selon les conditions cellulaires et tissulaires, comme lors de cancer (314). D'après les informations de la base de données du consortium UniProt (315), l'épissage alternatif de HIF-1 α est effectif chez la souris. Cet épissage alternatif de HIF-1 α , dont la séquence complète (entrée Q61221) fait 836 acides aminés de long, engendre de façon certaine une forme de 810 acides aminés (entrée A0A0R4J1E9) et une autre de 248 acides aminés de long (entrée A0A0R4J1F0). Toujours d'après cette base de données, l'ARNm d'une forme de HIF-1 α composée de 441 acides aminés (entrée Q3UU00) a été observé. D'après ces informations, il est très probable que ce variant de 441 acides aminés est le variant majoritaire de HIF-1 α exprimé par les C166 dans les conditions de l'expérience présentée en Figure 78.

HIF-1 α est une protéine adoptant une localisation nucléaire après sa synthèse, si elle n'est pas dégradée entre-temps (comme décrit en sous-partie I.2.4.6) (64). Si HIF-1 α est stabilisée, son expression au sein du cytoplasme et du noyau est augmentée et c'est l'inverse en cas de dégradation accélérée (316). L'observation de son expression *in situ* dans les C166 sur les différents matériaux après 4 jours de culture est présentée en Figure 79.

²⁶ Mécanisme par lequel certaines séquences du pré-ARNm d'une protéine sont retirées, ce qui engendre une protéine plus courte après sa traduction, avec des propriétés, et parfois des fonctions, modifiées.

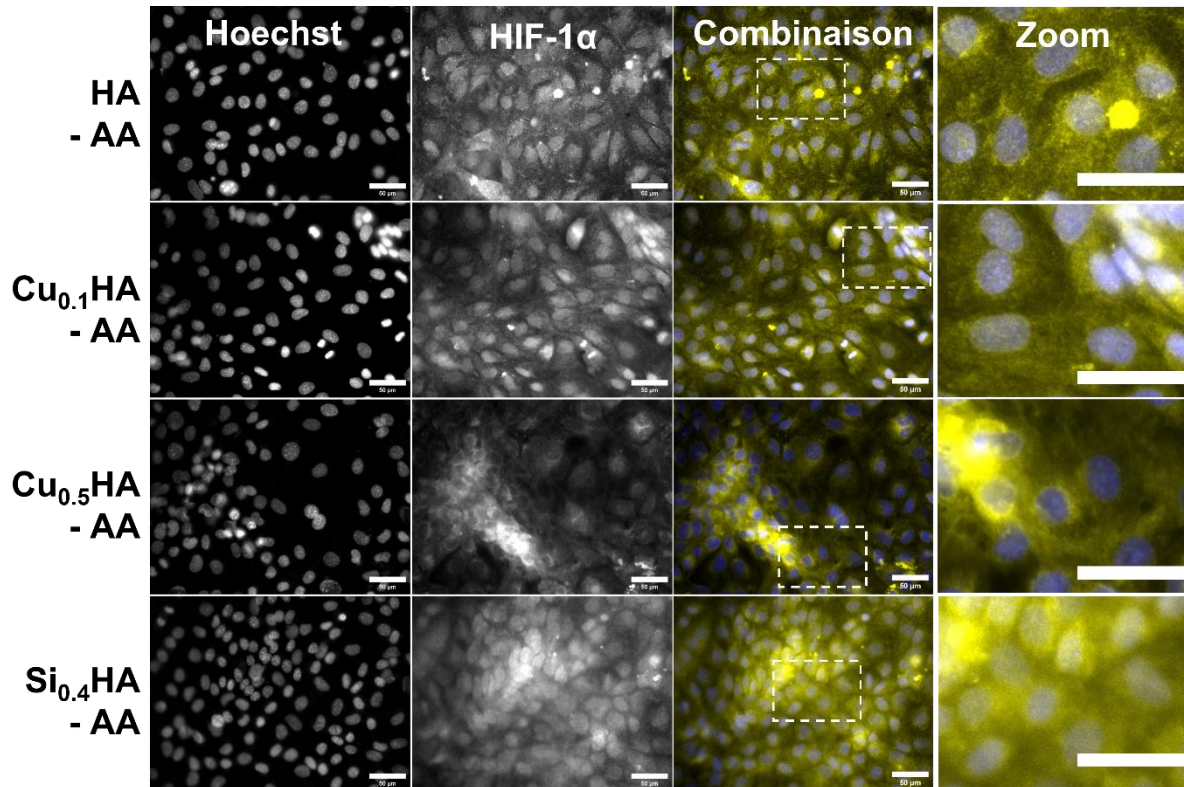


Figure 79 : Localisation de HIF-1 α dans des C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux en absence d'acide ascorbique

Jaune : HIF-1 α . Bleu : noyaux. Barre d'échelle = 50 μ m

La localisation *in situ* de HIF-1 α au sein des C166 après 4 jours de culture (Figure 79) sur le matériau HA est à la fois cytoplasmique, avec une présence diffuse, et nucléaire où il est présent en tout point. Des zones d'expression intense et très délimitée ayant une localisation périnucléaire correspondent vraisemblablement à une expression au sein de l'appareil de Golgi. Les cellules sur le matériau HA faisant partie d'amas cellulaires possèdent une forte expression cytoplasmique de HIF-1 α (non représenté, expression similaire visible dans la condition Si_{0.4}HA). Les C166 à la surface du matériau Cu_{0.1}HA expriment HIF-1 α similairement à celles sur HA, mais les cellules hors des amas en ont une expression réduite (Figure 79, Cu_{0.1}HA combinaison en haut à gauche), tandis que celles au sein des amas en ont une expression accrue (Figure 79, Cu_{0.1}HA, zoom en haut à droite). Les C166 cultivées à la surface du matériau Cu_{0.5}HA ont une expression de HIF-1 α principalement cytoplasmique et périnucléaire, les cellules en dehors des amas l'expriment peu (Figure 79, Cu_{0.5}HA, combinaison milieu droite), tandis que celles des amas l'expriment fortement (Figure 79, Cu_{0.5}HA, zoom en haut à gauche). Les C166 sur le matériau Si_{0.4}HA ont une expression de HIF-1 α similaire à celles sur HA, mais leur expression cytoplasmique apparaît plus importante.

La présence de HIF-1 α dans toute la cellule est inattendue en l'absence d'hypoxie car elle devrait être dégradée par l'action de la PHD. Une surexpression de HIF-1 α similaire à celle visualisée en Figure 79 est observée dans les cellules cancéreuses et est associée à une prolifération cellulaire augmentée (317). Comme discuté dans la sous-partie concernant les C166 (II.2.2), les voies de signalisation affectées par leur transgène codant pour la protéine Fps/Fes ne sont pas élucidées dans leur entièreté. Cependant, cette protéine entraîne une

stimulation de facteur de transcription impliqué dans la prolifération et les cancers comme le proto-oncogène *c-myc*. Il est probable que cette surexpression de HIF-1 α provienne de la nature transgénique des C166. Similairement, la localisation de HIF-1 α s'apparentant à une présence dans l'appareil de Golgi n'est pas habituelle dans les cellules endothéliales. Cette localisation est retrouvée dans des cellules cancéreuses comme les mélanomes (318). Il est possible que la nature transgénique des C166 entraîne aussi une modification de la localisation de HIF-1 α dans les C166 par des mécanismes non élucidés. D'après ces données de la littérature, l'expression diffuse et intense de HIF-1 α dans les C166 formant des amas multicellulaires peut s'expliquer par la prolifération probablement plus importante de ces cellules. En effet, les observations des populations de C166 à la surface des matériaux montrent que les amas grandissent et acquièrent une forme de fuseau (III.2.2). Les cellules de ces amas expriment fortement VEGFR2 (IV.1.2) et VEGF164 (IV.1.1) ce qui est cohérent avec une activité mitogénique augmentée.

L'acide ascorbique devrait faciliter le rôle de la PHD et permettre la dégradation systématique de HIF-1 α (évoqué en sous-partie I.2.4.6). Cependant, les ROS peuvent également stabiliser HIF-1 α et sont théoriquement générés en présence d'acide ascorbique et de cuivre. L'observation de son expression *in situ* dans les C166 sur les différents matériaux après 4 jours de culture après exposition à 50 μ M d'acide ascorbique est présentée en Figure 80.

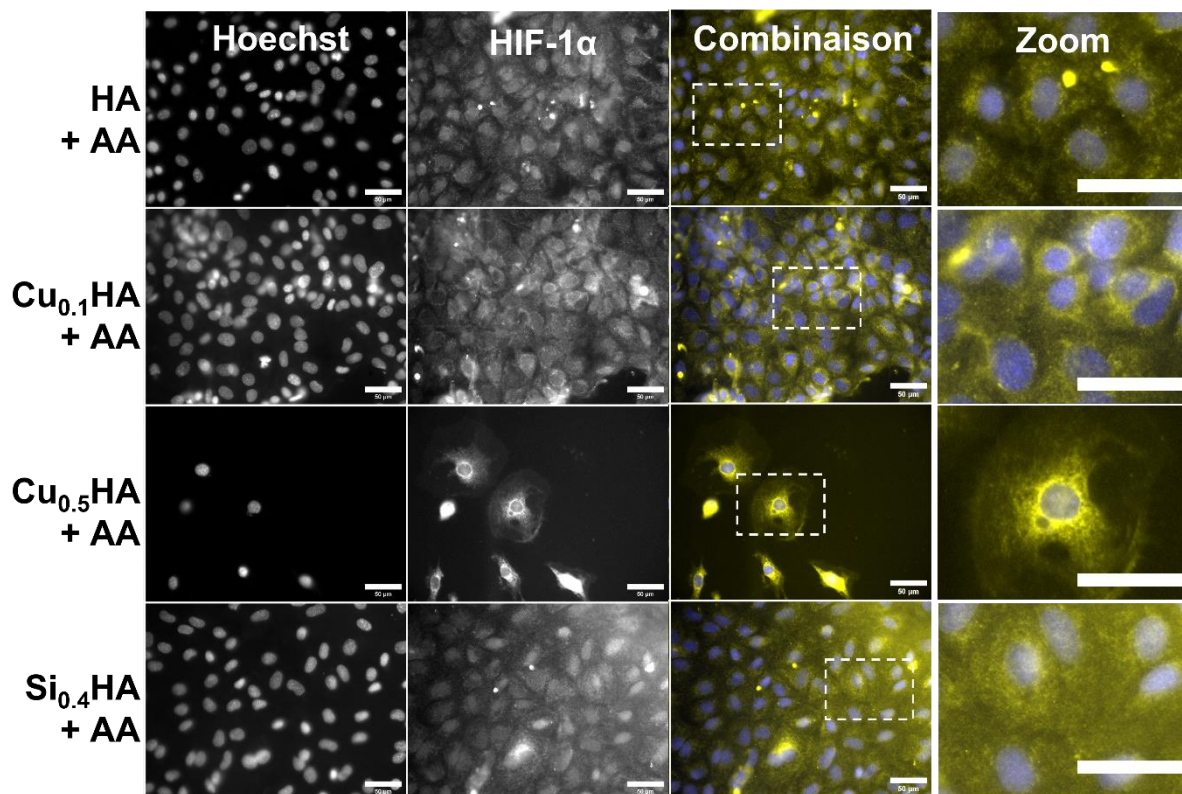


Figure 80 : Localisation de HIF-1 α dans des C166 après 4 jours de culture à la surface des matériaux après ajout d'acide ascorbique

Jaune : HIF-1 α . Bleu : noyaux. Barre d'échelle = 50 μ m

La localisation *in situ* de HIF-1 α au sein des C166 après 4 jours de culture à la surface du matériau HA en présence d'acide ascorbique (Figure 80), est à la fois cytoplasmique avec une présence diffuse, et nucléaire où il est présent en tout point. Des zones très délimitées

d'expression intense de HIF-1 α et ayant une localisation périnucléaire correspondent vraisemblablement à une expression au sein de l'appareil de Golgi. Les C166 sur le matériau Cu_{0.1}HA expriment HIF-1 α de manière similaire à celles sur l'HA, à l'exception des localisations périnucléaire pour la majorité des cellules et nucléaire pour certaines des cellules localisées dans des amas, où l'expression est visuellement plus forte. L'expression de HIF-1 α dans la zone périnucléaire se démarque de l'expression cytoplasmique, elle engendre la visualisation d'un halo autour des noyaux des C166 cultivées à la surface de Cu_{0.1}HA. Les quelques C166 sur le matériau Cu_{0.5}HA ont une expression cytoplasmique et nucléaire de HIF-1 α ainsi qu'une très forte expression périnucléaire de celui-ci. Les C166 sur le matériau Si_{0.4}HA ont un phénotype d'expression de HIF-1 α comparable à celles sur HA.

Le phénotype d'expression de HIF-1 α dans les C166 cultivées à la surface des matériaux HA et Si_{0.4}HA après ajout d'acide ascorbique, n'apparaît pas significativement modifié par rapport aux conditions sans acide ascorbique (Figure 79). Cela suggère que l'effet stimulateur de milieux conditionnés par Si_{0.4}HA sur la vitesse de fermeture d'une blessure dans une couche de C166 (sous-partie IV.1.7), peut provenir d'une stimulation de HIF-1 α qui serait transitoire (IV.1.7.2). Cela peut également suggérer que l'effet stimulateur du milieu conditionné par le matériau Si_{0.4}HA agit sur la voie de HIF-1 mais en aval de HIF-1 α . Cette hypothèse sera évoquée en détail dans la sous-partie suivante.

Dans les conditions Cu_xHA avec 50 μ M d'acide ascorbique, l'expression de HIF-1 α est visuellement davantage concentrée à proximité du noyau après exposition à de l'acide ascorbique. Ces observations suggèrent que HIF-1 α est davantage stabilisée dans ces conditions et est transloquée, ou en cours de translocation, dans le noyau. Ni l'acide ascorbique ni les ROS qu'il permet de générer ne sont encore présents au moment de l'observation présentée en Figure 80. Par conséquent, la stabilisation de HIF-1 α observée après 4 jours provient potentiellement de deux mécanismes qui peuvent agir de concert. Premièrement, l'action de l'acide ascorbique en présence de cuivre peut priver durablement la PHD de certains de ses cofacteurs comme Fe²⁺ ce qui ralentit son action. Deuxièmement, l'ajout d'acide ascorbique en présence de cuivre génère des ROS, cela sera présenté dans la sous-partie suivante. Le stress oxydant provoqué par ces ROS peut entraîner une dégradation durable de la machinerie cellulaire en raison de la nature des dégâts oxydatifs. Ce type de dommage entraîne une sénescence précoce des cellules. Lors de la sénescence, la production de ROS est accrue, en raison d'un contrôle moins efficace de la chaîne respiratoire mitochondriale, et d'une dérégulation de la signalisation normale des ROS (319). La production accrue de ROS peut alors stabiliser HIF-1 α comme il a été évoqué dans la partie traitant de l'hypoxie et de l'angiogenèse (I.2.4.6). Un stress oxydatif important, serait cohérent avec l'observation de l'expression accrue de HIF-1 α dans l'espace périnucléaire des C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA en présence de 50 μ M d'acide ascorbique. En effet, HIF-1 α requiert la présence de protéines spécialisées pour être transloqué dans le noyau : les importines. Il a été démontré qu'un stress oxydatif est capable de diminuer leur activité et d'entraîner l'accumulation de HIF-1 α dans l'espace périnucléaire des cellules (320).

IV.1.9. Mesures des espèces radicalaires intracellulaires

De nombreuses hypothèses des sous-parties précédentes requièrent de mesurer de la production de ROS par les C166 exposées aux milieux conditionnés. De plus, les ROS sont utilisés dans les voies de signalisation des cellules endothéliales en condition physiologique. Dans la Figure 81, les ROS générés dans les cellules C166 sont mesurés 4 h après l'ajout de milieu conditionnés.

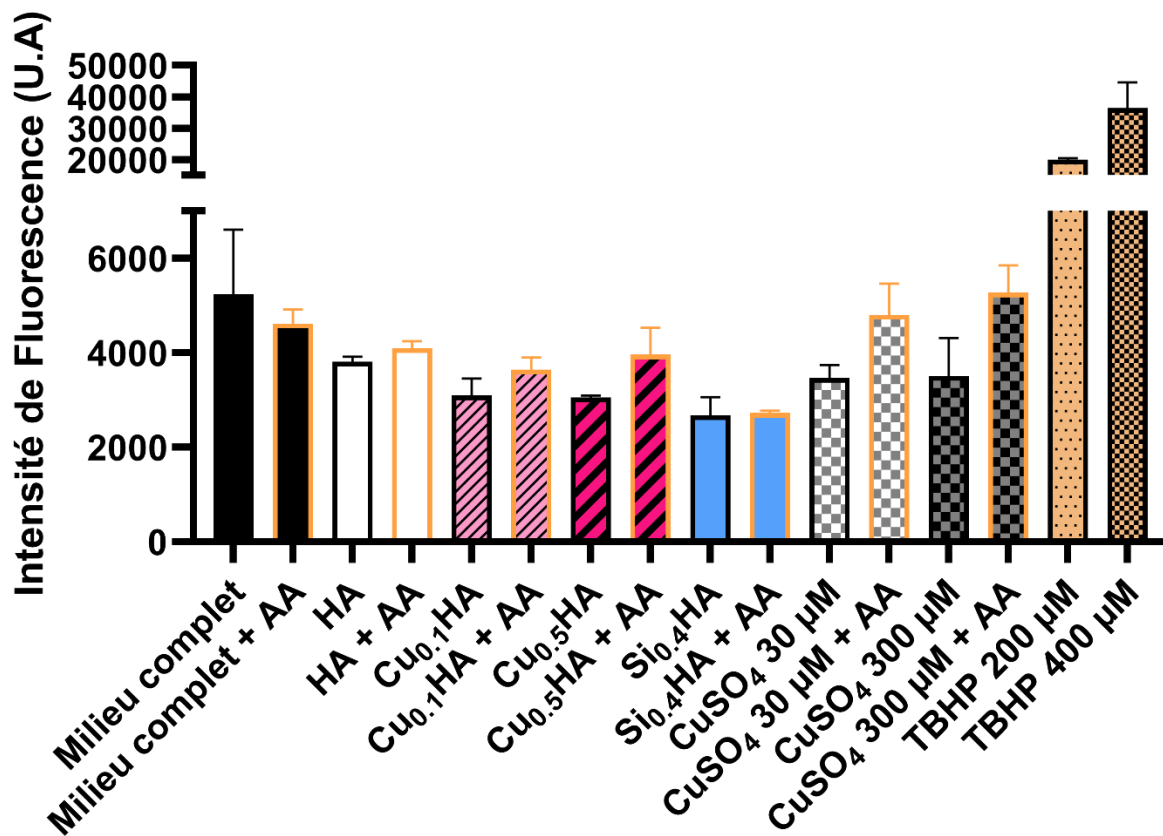


Figure 81 : Génération d'espèces radicalaires dans les C166 après 4 h d'exposition à des milieux conditionnés

AA = 50 μM d'acide ascorbique ; CuSO₄ = concentration du composé dans du cDMEM. TBHP = contrôle positif. Tests statistiques : Kruskal-Wallis suivi d'un test *post-hoc* de Dunn. Pour ces tests statistiques, les résultats du TBHP n'ont pas été utilisés afin de ne comparer que les conditions d'intérêt entre elles. Nombre d'échantillons indépendants = 3

La génération d'espèces radicalaires dans les C166 4 h, après leur exposition à du milieu conditionné par les matériaux (Figure 81) est comparable entre toutes les conditions en l'absence ou en présence d'acide ascorbique. Après 4 h d'exposition, la présence d'acide ascorbique augmente non significativement la génération de radicaux libres de 10% à 40% dans toutes les conditions à l'exception du milieu seul et du milieu conditionné par Si_{0.4}HA où une diminution et une stagnation du niveau de ROS sont observés. Le contrôle positif TBHP (hydroperoxyde de tert-butyle) montre qu'il existe une relation quasi-linéaire entre la quantité d'espèces radicalaires et l'intensité de fluorescence mesurée avec pour 200 μM de TBHP une valeur arbitraire de 19932 ± 593 et pour 400 μM de TBHP une valeur de 36433 ± 8257 soit ~1,83 fois l'intensité pour le double de la concentration avec toutefois un écart-type important. L'essentiel des modifications de l'intensité de fluorescence observées en présence d'acide ascorbique sont dès lors bien attribuables à une variation proportionnelle de la présence d'espèces radicalaires.

La mesure est répétée après 24 h d'exposition des C166 aux milieux conditionnés, les résultats sont présentés en Figure 82.

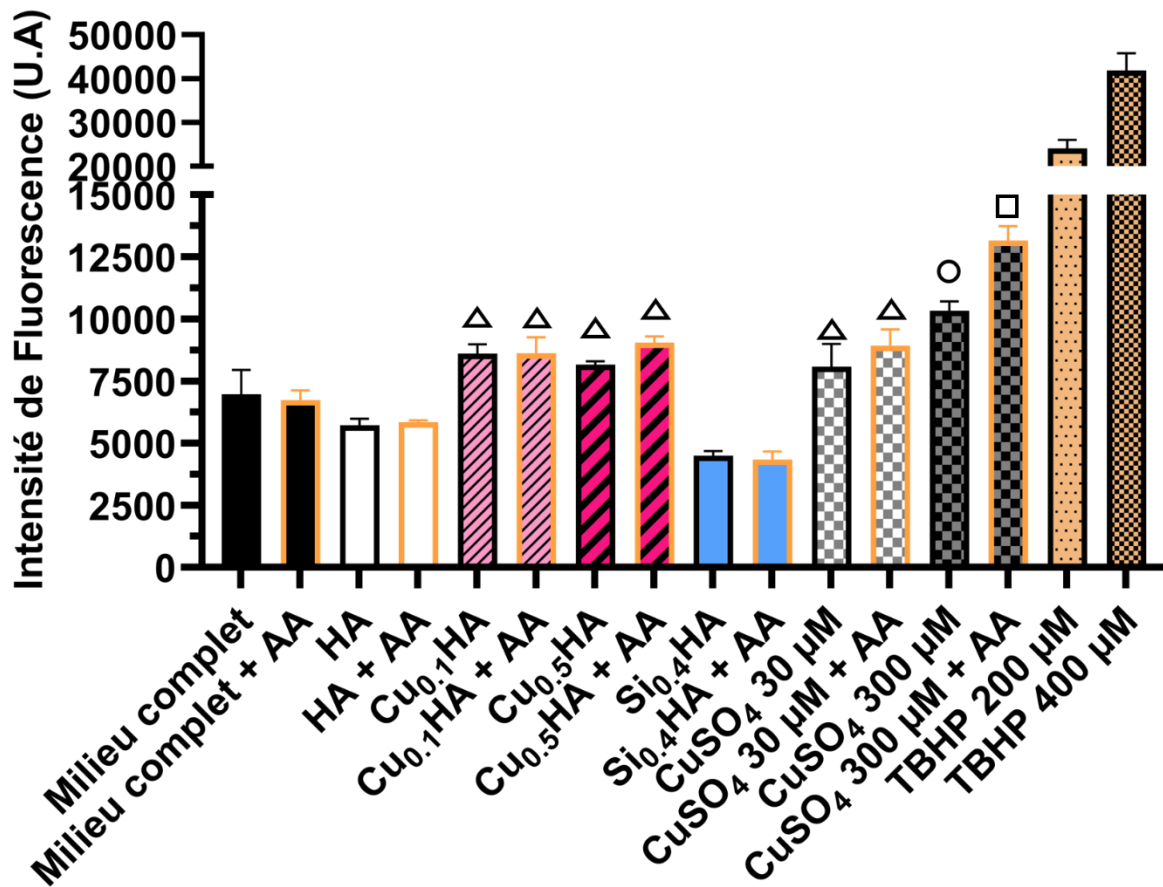


Figure 82 : Génération d'espèces radicalaires dans les C166 après 24 h d'exposition à des milieux conditionnés

AA = 50 μM d'acide ascorbique ; CuSO₄ = concentration du composé dans du cDMEM. TBHP = contrôle positif. Triangle : significativité (***) : p-value < 0,001) par rapport à HA (en l'absence d'acide ascorbique), ou par rapport à HA + AA (en présence d'acide ascorbique). Cercle : significativité (***) : p-value < 0,001) par rapport à toutes les conditions sauf Cu_{0.5}HA + AA, CuSO₄ 30 μM + AA et CuSO₄ 300 μM + AA. Carré : significativité (***) : p-value < 0,001) par rapport à toutes les conditions. Nombre d'échantillons indépendants = 3

La génération d'espèces radicalaires dans les C166 24 h après leur exposition à du milieu conditionné par le matériau HA (Figure 82) entraîne en valeur arbitraire une fluorescence de 5724 ± 265 sans acide ascorbique et de 5844 ± 84 en sa présence. Ces générations d'espèces radicalaires intracellulaires ne sont comparables qu'à celles retrouvées en présence de milieux conditionnés par Si_{0.4}HA avec ou sans acide ascorbique, et du milieu de culture avec ou sans acide ascorbique. D'après les analyses statistiques (ANOVA à 1 voie, suivie d'un test *post-hoc* de Tukey, les résultats du TBHP n'ont pas été utilisés afin de ne comparer que les conditions d'intérêt entre elles) toutes les autres conditions (Figure 82, triangles, cercle et carré) ont une génération de ROS intracellulaires significativement augmentée, par rapport à celle dans les C166 exposées aux milieux conditionnés par HA avec et sans acide ascorbique. Les valeurs de fluorescence et la différence par rapport à HA sont données par la suite selon le format : condition, valeur + écart-type/augmentation en pourcentage et sont suivies des valeurs et différences de la condition avec acide ascorbique par rapport à HA + AA : Cu_{0.1}HA,

8609 ± 371/50,4%, Cu_{0,1}HA + AA, 8618 ± 643/47,5% ; Cu_{0,5}HA, 8152 ± 149/42,4%, Cu_{0,5}HA + AA 9040 ± 265/54,7% ; CuSO₄ 30 µM, 8076 ± 928/41,1%, CuSO₄ 30 µM + AA, 8916 ± 662/52,6% ; CuSO₄ 300 µM, 10334 ± 379/80,5%, CuSO₄ 300 µM + AA, 13160 ± 579/125,2%.

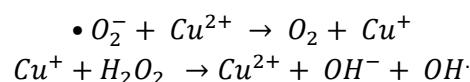
Le conditionnement par les matériaux Cu_xHA entraîne une génération comparable d'espèces radicalaires intracellulaires sans influence de l'acide ascorbique. Le conditionnement par CuSO₄ 30 µM entraîne des résultats comparables à ceux du conditionnement par Cu_{0,1}HA sans influence de l'acide ascorbique. Le conditionnement par CuSO₄ 300 µM (Figure 82, cercle) ne réplique pas fidèlement la génération d'espèces radicalaires intracellulaires de la condition Cu_{0,5}HA. CuSO₄ 300 µM en génère 26,8% plus que Cu_{0,5}HA et CuSO₄ 300 µM + AA (Figure 82, carré) en génère 45,6% plus que Cu_{0,5}HA + AA.

La présence d'acide ascorbique n'affecte pas la quantité d'espèces radicalaires intracellulaires générées après 24 h dans toutes les conditions à l'exception de CuSO₄ 300 µM. Dans cette condition (Figure 82, carré), la présence d'acide ascorbique entraîne une augmentation significative de la production d'espèces radicalaires de 27,3%.

La génération d'espèces radicalaires est augmentée entre 4 h et 24 h dans toutes les conditions à des degrés divers. Le contrôle positif avec les deux concentrations de TBHP entraîne, en valeur de fluorescence en unité arbitraire, pour 200 µM : 24126 ± 1936 et pour 400 µM : 41890 ± 3913 soit en moyenne 1,73 fois plus pour 400 µM où un facteur 2 est attendu. La relation observée après 4 h d'exposition était de 1,83 ce qui témoigne du maintien d'une relation de proportionnalité entre concentration de ROS et valeur de fluorescence après 24 h.

La molécule fluorescente utilisée dans le kit n'a pas une stabilité garantie après 24 h, la génération de ROS au-delà de ce temps n'est donc pas mesurée.

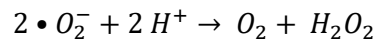
Le niveau de génération de ROS des C166 est comparable entre les milieux conditionnés par les Cu_xHA après 24 h d'exposition. Cependant, les concentrations de cuivre ne sont pas similaires entre ces conditions, elle est presque 10 fois plus importante pour le milieu conditionné par Cu_{0,5}HA (sous-partie III.2.6) que pour le milieu conditionné par Cu_{0,1}HA. Ces résultats indiquent que le facteur limitant pour la production de ROS sur une période de 24 h dans les conditions expérimentales précédentes est le métabolisme cellulaire. Cela est cohérent avec la réaction d'Haber-Weiss (212):



L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène produits par le métabolisme cellulaire dans les mitochondries, (321), sont les facteurs limitant de cette réaction. Une augmentation de la concentration en cuivre n'a pas un effet immédiat sur la génération de ROS tant qu'il y a assez de cuivre accessible à ces composés réactifs. La génération de ROS par les cellules a été accélérée par l'ajout d'acide ascorbique, qui peut intervenir dans la réaction d'Haber-Weiss à la place de l'ion superoxyde (212). L'acide ascorbique, du fait de sa réactivité en solution, disparaît rapidement du milieu. La génération accrue de ROS en raison de la présence d'acide ascorbique est donc transitoire et proportionnelle à sa concentration.

Après 24 h, les niveaux de génération de ROS intracellulaires dans les conditions contenant du cuivre, sont comparables avec et sans ajout d'acide ascorbique, à l'exception de la condition CuSO₄ 300 µM. Cela suggère que la présence d'acide ascorbique entraîne un ralentissement de la génération de ROS intracellulaires entre la mesure à 4 h et la mesure à 24 h. Une explication probable est que les C166 exposées à l'acide ascorbique s'adaptent plus

fortement au stress oxydatif, un mécanisme bien documenté, (312), où les cellules surexpriment des facteurs antioxydants et des enzymes spécialisées dans la dégradation des ROS suite à un stress oxydatif. Cette adaptation dépend de l'intensité du stress et de sa répétition, mais peut survenir dès un stress transitoire de faible intensité (de l'ordre du μM d' H_2O_2), et se maintenir pendant plusieurs jours (313). Parmi les protéines participant à l'adaptation, l'enzyme superoxyde dismutase 2 (SOD2), présente uniquement dans les mitochondries, est surexprimée en réponse à une concentration accrue de ROS (322). SOD2 catalyse la réaction :

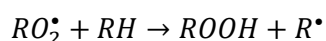
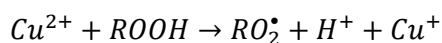


Cette réaction (extraite de (322)) bloque la réaction d'Haber-Weiss et limite le renouvellement redox du cuivre Cu^{2+} en Cu^+ plus réactif. Par conséquent, le niveau de ROS intracellulaire augmenterait plus rapidement dans les C166 non adaptées au stress oxydatif, que dans celles adaptées par le plus fort stress oxydant causé par l'ajout d'acide ascorbique.

L'augmentation de la génération de ROS intracellulaires dans les C166 de la condition CuSO_4 300 μM en présence d'acide ascorbique, est la plus forte de toutes les conditions testées, elle ne peut raisonnablement pas s'expliquer par un défaut d'adaptation au stress oxydatif. D'après les résultats dans la sous-partie traitant de la fermeture d'une blessure (IV.1.7), et ceux de la présente sous-partie, la seule différence entre la condition CuSO_4 300 μM et la condition $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ est l'état du sérum contenu dans le milieu de culture. Pour comprendre l'origine de cette génération augmentée de ROS intracellulaires, il est nécessaire de revenir sur le cas de la sous-partie IV.1.7. Dans cette sous-partie, le plus fort ralentissement du taux de fermeture d'une blessure, par des C166 exposées aux milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA , que ceux exposés à du CuSO_4 répliquant leurs concentrations de cuivre en solution, s'explique probablement par des protéines du sérum dégradées dans les conditions Cu_xHA . L'altération et la dégradation oxydative des protéines du sérum est un phénomène physiologique, exacerbé dans des contextes pathologiques comme l'obésité, l'athérosclérose ou le diabète (323), (324). Elle peut significativement altérer la fonction des protéines oxydées comme celle de l'albumine qui perd une partie de ses capacités de liaison en cas de dégâts oxydatifs soutenus. Cette perte de fonction peut accélérer la dégradation d'autres composés essentiels comme les facteurs de croissance (325), (326). Les protéines du sérum sont vraisemblablement plus oxydées par l'action du cuivre dans les conditions Cu_xHA , que dans les conditions CuSO_4 car le cuivre est ajouté après 4 jours dans ces dernières conditions, tandis que son relargage est progressif pendant 4 jours dans les conditions Cu_xHA . Ces données peuvent expliquer, pour la sous-partie IV.1.7, le plus fort stress des C166 exposées à du milieu conditionné par les matériaux Cu_xHA , par rapport à celles exposées au CuSO_4 , alors que les générations de ROS sont comparables ou moins importantes dans les conditions Cu_xHA .

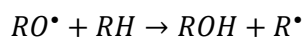
La génération plus importante de ROS intracellulaires dans la condition CuSO_4 300 μM en présence d'acide ascorbique, peut s'expliquer par la plus faible oxydation du sérum dans les conditions CuSO_4 par rapport aux conditions Cu_xHA . En effet, le cuivre peut réagir avec des hydroperoxydes, ROOH, naturellement présents dans le sérum, ce qui engendre la génération d'espèces radicalaires, susceptibles d'engendrer à leur tour des espèces radicalaires, dites secondaires, capables de diffuser au sein des cellules. D'après (323), la génération d'espèces radicalaires diffusibles est réalisée par une succession de réactions :



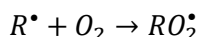


R* désigne un alkyle, ici une espèce radicalaire dérivée d'une chaîne d'acide gras insaturée RH. RO* désigne une espèce alcoyle qui est un alkyle radicalaire possédant un atome d'oxygène. RO₂* désigne un radical peroxyde.

La formation d'alkyles est également permise par la réaction :



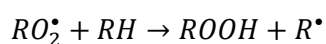
La formation d'autres radicaux peroxydes est permise par la réaction :



ROH désigne un aldéhyde, comme le malondialdéhyde issu de la peroxydation des lipides et fréquemment utilisé comme marqueur de l'oxydation des cellules (comme évoqué dans la conclusion de la Partie III).

D'après ces multiples réactions, en présence d'acide gras insaturé disponible et de cuivre, la production du radical hydroxyle est permise jusqu'à l'épuisement des cibles lipidiques du cuivre, transformées en aldéhydes.

Les hydroperoxydes ROOH du sérum sont à priori instables à 37°C : leur demi-vie dans un milieu aqueux contenant 10 mg/mL de BSA est d'environ 36 h à 20°C (327). Cependant, les réactions du cuivre et des acides gras insaturés sont capables de générer des hydroperoxydes à partir des dérivés de leur réaction selon la réaction présentée précédemment :



Dans ces réactions, la génération du radical hydroxyl peut expliquer la génération de ROS intracellulaire car c'est un composé soluble et très réactif qui est susceptible de traverser la membrane plasmique (212). Par conséquent, un milieu contenant du sérum a un potentiel oxydatif provenant de son contenu en lipides et en vésicules extracellulaires. D'après les concentrations d'acide gras insaturés contenues dans un milieu avec 10% de SVF, il y a un minimum de 100 µM de substrat pour les réactions précédentes, (328), ce qui représente la production de plus de deux fois plus de radicaux hydroxyles par rapport à l'ajout de 50 µM d'acide ascorbique. Les acides gras insaturés étant liés en partie à l'albumine, ces réactions peuvent ne pas être complètes dans les 24 h de l'étude.

Par conséquent, une fois le cuivre ajouté dans une concentration le rendant accessible sous une forme libre, les réactions qu'il catalyse dans le milieu contenant du sérum, entraînent à priori la génération de ROS jusqu'à épuisement du substrat. D'après ce mécanisme, les C166 exposées au milieu contenant 300 µM de CuSO₄ ont une génération de ROS intracellulaire augmentée en présence d'acide ascorbique malgré la probable adaptation des cellules au stress oxydatif. En effet, des composés lipidiques du sérum réagissent avec du cuivre librement accessible en solution, ce qui génèrent des radicaux hydroxyles capables de rentrer et réagir dans la cellule. Ce mécanisme peut également expliquer la plus forte génération de ROS intracellulaire dans les C166 exposées à 300 µM de CuSO₄ par rapport à celles de la condition Cu_{0,5}HA : le milieu de culture initialement moins oxydé de la condition CuSO₄ entraîne une génération accrue de ROS par rapport à l'autre condition. La plus faible concentration en cuivre de la condition CuSO₄ 30 µM, avec ou sans acide ascorbique, limite l'impact de ce mécanisme. En effet, dans cette condition, le cuivre est probablement en majorité pris en charge par ses chaperons protéiques et/ou internalisé par les cellules. Ceci

explique l'absence d'augmentation de la génération de ROS intracellulaire dans ces conditions par rapport à Cu_{0,1}HA (avec et sans acide ascorbique).

Ces mécanismes, et les mesures de la génération de ROS intracellulaires, peuvent expliquer le stress cellulaire et la cytotoxicité observés dans les C166 cultivées sur Cu_{0,5}HA. Les ROS générés entraînent un stress oxydatif prolongé, en raison de la plus grande concentration en cuivre en solution. Cette concentration entraîne une dégradation des protéines du sérum et des composés cellulaires, ce qui engendre l'apparition d'une cytotoxicité au jour 7 de culture (sous-partie III.2.4). Il est également probable que, lors d'un ensemencement à la surface des pastilles Cu_xHA, la génération de ROS par l'oxydation des lipides, affecte davantage les C166 la surface de Cu_{0,5}HA. La génération équivalente de ROS intracellulaires dans les C166 exposées au milieu conditionné par Cu_{0,1}HA, par rapport à celles exposées au milieu conditionné par Cu_{0,5}HA, s'explique par la limitation imposée par la mesure de 24 h, et par l'état d'oxydation avancé des milieux causés par les 4 jours de conditionnement. De plus, le cuivre pourrait se trouver dans un état où il est susceptible de causer des dommages cellulaires sans passer par les ROS. Cette toxicité est possible mais peu documentée. En effet, une étude montre que le cuivre peut être cytotoxique à l'état Cu⁺ en déplaçant le fer de protéines à centre fer/soufre essentielles à la survie de bactéries *Escherichia coli* (329). Une autre étude montre que le cuivre entraîne, sans génération de ROS, l'oligomérisation de l'amyline dans des cellules pancréatiques humaines ce qui y entraîne le dépôt de plaque d'amyloïde et leur mort (330). Une toxicité directe du cuivre affecterait plus les C166 cultivées à la surface du matériau Cu_{0,5}HA que celles à la surface de Cu_{0,1}HA, du fait d'une concentration supérieure de cuivre en solution.

La génération accrue de ROS dans les C166 exposées aux milieux conditionnés par les matériaux Cu_xHA peut expliquer leur sécrétion accrue de VEGF (sous-partie IV.1.1) et le processus angiogénique associé (caractérisé dans les sous-parties IV.1.2 à IV.1.6) par une activation de la voie HIF-1 grâce à l'inactivation de l'enzyme PHD, soit par dégradation directe, soit en la privant de ses cofacteurs (par oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺ notamment) (331), (219). Cependant, l'absence de différences dans l'expression de HIF-1 α , après 7 jours de culture sur les matériaux et dans sa localisation après 4 jours de culture, suggère que sa stabilisation ou sa surexpression n'est effective que dans les premiers jours de culture. D'après les observations de la sous-partie IV.1.8, les C166 surexpriment HIF-1 α sans hypoxie, il est donc possible que le cuivre stimule également l'angiogenèse par bourgeonnement de C166 indépendamment de la génération de ROS et de la stabilisation de HIF-1 α .

Une stimulation de l'angiogenèse passant par la voie HIF-1 sans interaction avec l'expression et/ou la stabilisation de HIF- α est envisageable. Une étude (332) sur des HUVECs exposées à des concentrations de 0,1 μ M à 10 μ M de CuCl₂, montre que si le cuivre stimule l'expression de VEGF, celle-ci n'est pas toujours accompagnée d'une stimulation de l'expression de HIF-1 α . Une autre étude (333) montre que l'activation de HIF-1 dépend de la présence de cuivre et de la protéine CCS (Copper chaperone for superoxyde dismutase 1). Les auteurs démontrent également que la synthèse et la stabilité de HIF-1 α ne dépendent pas de la présence de cuivre mais que ce dernier facilite la liaison de HIF-1 et HIF-1 α aux séquences de réponse de l'hypoxie. Cette liaison facilitée stimule la transcription des gènes pro-angiogéniques régulés. CCS est requise pour le transport physiologique de cuivre dans le noyau et elle est co-précipitée avec HIF-1 α . La présence de cuivre est également requise pour la formation du complexe de transcription de HIF-1, constituant l'ensemble de protéines et cofacteurs de HIF-1, permettant la transcription des gènes des séquences de réponse de l'hypoxie. Le cuivre permettrait la formation de ce complexe de transcription en inhibant le

facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1 : Factor inhibiting HIF-1). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas connu mais il pourrait s'agir d'un jeu d'affinité car l'activité de FIH-1 nécessite la présence de fer avec lequel le cuivre peut entrer en compétition.

Le milieu conditionné par le matériau Si_{0.4}HA n'entraîne pas de surproduction de ROS dans les cellules par rapport au milieu conditionné par HA. L'absence d'augmentation du niveau de ROS intracellulaires, dans les C166 exposées à du milieu conditionné par Si_{0.4}HA en présence d'acide ascorbique, suggère que le ralentissement du taux de fermeture d'une blessure dans cette condition (observée dans la sous-partie IV.1.7.2), provient d'une inhibition de HIF-1 α provoquée par la suractivation de la PHD. Ces résultats suggèrent que l'effet positif sur la vitesse de fermeture d'une blessure du milieu conditionné par Si_{0.4}HA sans acide ascorbique, provient d'un effet stabilisateur sur HIF-1 α , et ce malgré sa surexpression par les C166 observée dans la sous-partie IV.1.8. L'absence de stabilisation de HIF-1 α observée à 4 jours et mesurée à 7 jours dans les C166 cultivées à la surface de Si_{0.4}HA, peut s'expliquer par un effet transitoire en raison de la faible (<40 μ M) concentration de silicium en solution. Parallèlement à ces résultats, il est également possible que le silicium en solution agisse via un autre mécanisme non élucidé. Ce mécanisme pourrait être similaire à celui du cuivre évoqué dans le paragraphe précédent. A savoir, une inhibition de FIH-1 ou de PHD par le silicium soluble est possible car des études (334), (335) montrent que le silicium dans une solution aqueuse est capable de ralentir l'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺ par écrantage ionique à pH neutre. Cette interaction fonctionne pour des concentrations micromolaires de fer et de silicium (334). Cette concentration de silicium pourrait être présente en solution suite à la solubilisation du matériau Si_{0.4}HA (d'après la discussion de la sous-partie III.2.6). Le silicium en solution pourrait alors perturber l'activité de la PHD et/ou de FIH-1 en séquestrant le Fe²⁺ dont ces dernières ont besoin. La faible concentration du silicium en solution et l'absence de transporteur spécialisé pouvant le déplacer dans le noyau, peut expliquer la nature transitoire de l'effet. Une séquestration de Fe²⁺ serait cohérente avec la diminution, non significative, du niveau de production de ROS par les C166 exposées au milieu de Si_{0.4}HA, sans acide ascorbique, par rapport au milieu de HA. En effet, l'oxydation de Fe²⁺ est une réaction productrice de ROS dans l'eau, notamment en présence d'acide ascorbique (312).

IV.1.10. Conclusion de l'étude *in vitro* des propriétés angiogéniques des matériaux en condition de culture statique

Cette étude *in vitro* des propriétés angiogéniques des matériaux HA, Cu_{0.1}HA, Cu_{0.5}HA et Si_{0.4}HA a évalué les expressions *in situ* et/ou les sécrétions de protéines fondamentales dans l'angiogenèse (l'ensemble des sous-parties IV.1.1 à IV.1.6), les capacités fonctionnelles des C166 exposées aux milieux conditionnés par les matériaux (sous-partie IV.1.7) et les mécanismes à l'origine des effets observés ont été recherchés (sous-parties IV.1.8 et IV.1.9).

Cette étude met en évidence l'existence d'un processus d'angiogenèse par bourgeonnement initié par les C166 sur tous les matériaux. En 7 jours de culture, des cellules C166 exprimant fortement VEGFR2 réagissent à une sécrétion intrinsèque élevée de VEGF164 et forment des structures multicellulaires complexes. La raison de cette sécrétion importante de VEGF164 tient vraisemblablement à la nature du proto-oncogènes des C166.

Le matériau de référence HA ne semble pas affecter les cellules dans ce processus et celles-ci se développent à sa surface ou en présence de son milieu conditionné sans stimulation ou inhibition observées.

Les matériaux $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ stimulent l'angiogenèse par bourgeonnement des C166 à leur surface. Cette stimulation provient d'une sécrétion accrue de VEGF164 induite par la présence de cuivre en solution. La sécrétion accrue de VEGF164 entraîne la formation de structures multicellulaires complexes, de grande taille avec des cellules allongées. Le VEGF est mitogénique, il stimule la prolifération et accroît la taille des vaisseaux sanguins *in vivo* (48). Cette sécrétion accrue de VEGF164 explique alors la prolifération accrue des C166 cultivées à la surface des matériaux Cu_xHA observée après 3 jours de culture et présentée en sous-partie III.2.5. Les C166 au sein des amas organisés en fuseaux, ont une expression des marqueurs angiogéniques étudiés qui est caractéristique de cellules endothéliales en migration au sein d'un bourgeon angiogénique. Ce bourgeon entame des étapes de maturation après 7 jours de culture avec la répression de la transcription d'eNOS et la surexpression de celle de vWF. La répression d'eNOS est particulièrement évocatrice d'un phénomène de maturation induit par la poursuite du processus angiogénique et de l'épaississement du cortex cellulaire des C166 (311), indépendamment des conditions environnementales. En effet, la transcription d'eNOS est stimulée par la présence de H_2O_2 (68) et de cuivre (218). Or, dans les conditions Cu_xHA où elle est réprimée, la présence de cuivre entraîne une production accrue de ROS intracellulaires. Par ailleurs, cette génération accrue de ROS intracellulaires est susceptible d'expliquer le stress cellulaire et la cytotoxicité du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ observés en sous-partie III.2.4. Cette production de ROS pourrait être à l'origine d'une stabilisation brève de HIF-1 α qui entraînerait une stimulation de la voie HIF-1 et une sécrétion accrue de VEGF164. La présence de cuivre pourrait également engendrer, indépendamment de la génération de ROS, le processus d'angiogenèse par bourgeonnement. Cet effet stimulateur du cuivre proviendrait de son affinité envers des protéines associées à la voie HIF-1 (333). Cette affinité pourrait faciliter la transcription des gènes de réponse à l'hypoxie, dont VEGF, en stabilisant le complexe de transcription de HIF-1.

Le $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ est parfaitement biocompatible mais ne stimule pas le processus d'angiogenèse des cellules C166 cultivées à sa surface. Le développement cellulaire observé est le même que sur le matériau de référence HA. En revanche, ses produits de dissolution sont capables de stimuler la prolifération et/ou la migration des cellules C166. Cela suppose que le matériau possède la capacité de stimuler des processus cellulaires associés à l'angiogenèse car cet effet passe vraisemblablement par une stimulation transitoire de la voie HIF-1 grâce à du silicium en solution. Ces produits de dissolution de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ ne modifient pas la génération de ROS au sein des cellules et seraient capable de bloquer directement des cofacteurs de l'enzyme PHD qui gouverne la dégradation de HIF-1 α , ou les interactions du complexe de transcription comme l'inhibiteur de HIF-1, FIH-1. Cet effet proviendrait d'une capacité du silicium en solution à interagir avec Fe^{2+} (334) qui est utilisé comme cofacteur par la PHD et par FIH-1.

Afin d'élucider le rôle des éléments dopants sur la voie HIF-1 plusieurs expériences ou modifications des conditions expérimentales sont envisageables. Premièrement, pour analyser le rôle des produits dopants sur FIH-1 et son activité, l'utilisation d'un chélateur du fer puis d'un chélateur du produit dopant permettrait de s'assurer que l'effet de ce dernier passe par une inhibition de FIH-1. Deuxièmement, il serait utile d'analyser l'expression *in situ* de HIF-1 α dans les C166 à des temps de culture courts, ceci afin de mieux comprendre la nature des effets pro-angiogéniques des matériaux Cu_xHA et du milieu conditionné par le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Troisièmement, il serait également utile de conduire les expériences sur HIF-1 α présentées dans cette Partie IV, et les expériences complémentaires susmentionnées, sur des cellules endothéliales ayant un profil d'expression de HIF-1 α qui soit plus physiologique.

Pour cela le choix devrait se porter sur des cellules non cancéreuses, sans prolifération excessive et avec une expression de HIF-1 α réduite, ou absente, en normoxie.

La comparaison des effets des produits dopants à une condition hypoxique artificiellement créée, par l'ajout de chlorure de cobalt CoCl₂, pourrait être intéressante afin d'identifier leur mécanisme d'action. Cependant, si leurs actions sont liées à des affinités spécifiques pour les protéines associées à HIF-1, alors les voies de signalisation qu'ils activent peuvent être significativement différentes. Une étude met notamment en évidence que le cuivre active près de 300 gènes qui lui sont spécifiques dans la voie HIF-1 (336). Une étude comparant l'effet du CoCl₂ à celui du CuCl₂ sur des HUVECs montre également que les deux composés stimulent l'angiogenèse par des voies de signalisation différentes (332). Cependant, le dopage d'hydroxyapatite par du cobalt pourrait être un développement intéressant. Une étude (337), caractérisant les propriétés biologiques d'hydroxyapatites dopées au cobalt, montre que celui-ci permet la stabilisation de HIF-1 α et augmente la sécrétion de VEGF dans des ostéoblastes MG-63 (cellules provenant d'ostéosarcomes) après 7 jours de culture quand 0,37% m/m de dopant est présent, sans affecter leur viabilité.

La maturation des bourgeons angiogéniques sur tous les matériaux gagnerait à être étudiée par microscopie confocale pour suivre l'élongation des cellules et une éventuelle formation de lumière. Pour étudier la tubulogenèse, l'utilisation d'un substrat 3D comme le Matrigel™ pourrait être bénéfique afin de confirmer que les cellules endothéliales conservent leurs capacités de formation de vaisseaux *in vivo*.

Le niveau d'oxydation du milieu de culture est un paramètre essentiel à caractériser en présence de cuivre. Il serait utile d'analyser le niveau d'aldéhydes comme le malondialdéhyde, produit lors de la peroxydation des lipides (297), dans le milieu de culture.

Les caractérisations des propriétés biologiques des matériaux de la Partie III et de cette Partie IV, suggèrent qu'il peut être utile de développer et d'étudier de nouveaux matériaux dopés au cuivre ou au silicium. L'objectif serait d'optimiser la capacité de ces dopants à stimuler le potentiel de réparation osseuse d'implants d'hydroxyapatites. De plus, cette étude montre qu'un changement de modèle d'étude des biomatériaux est nécessaire. En effet, les matériaux Cu_xHA sont prometteurs pour vasculariser des implants osseux mais ils entraînent le relargage d'une quantité de cuivre susceptible d'être toxique pour le tissu osseux. Un matériau moins concentré en cuivre pourrait conserver son effet stimulateur en limitant la cytotoxicité pour les cellules endothéliales mais surtout pour les cellules osseuses qui y sont plus sensibles. En effet, la concentration de cuivre efficace pour stimuler HIF-1 dans des HUVECs débute dès 0,1 μ M (332), alors que des effets cytotoxiques sur les cellules du tissu osseux les plus sensibles, des cellules souches de moelle osseuse, ne sont rapportés qu'à partir de 0,7 μ M (217). Le matériau Si_{0.4}HA est intéressant pour la vascularisation d'implant osseux car il semble posséder des effets favorables grâce à des produits solubles. Ces matériaux peuvent donc posséder un effet dans l'environnement du site d'implantation et sans aucune toxicité. Sans changer de modèle expérimental, une plus grande concentration de silicium soluble serait susceptible d'avoir des effets plus favorables sur l'angiogenèse. Les contraintes de synthèse limitent la réalisation de Si_xHA au-delà de $x = 1$ (159) mais l'utilisation de Si_{0.4}HA microporeuse pourrait augmenter significativement la quantité de silicium disponible en facilitant la solubilisation de ce dernier par augmentation de la surface d'échange avec le milieu. Pour conclure, il serait intéressant d'étudier dans les mêmes conditions, des matériaux dopés répondant aux critères développés ci-dessus : d'une part, une concentration plus faible de cuivre et d'autre part, une concentration plus forte de silicium.

De plus, ces matériaux gagneraient à être étudiés dans des conditions différentes. Parmi celles-ci, l'utilisation de modèles plus représentatifs des conditions *in vivo* peut affecter les résultats par le biais de stimulation paracrines réciproques. L'existence de relation paracrines entre les cellules endothéliales et les cellules osseuses, favorables au développement du tissu osseux, ainsi que la stimulation avérée du silicium sur des voies de signalisation des ostéoblastes, requiert l'utilisation de cocultures pour mieux évaluer les propriétés biologiques *in vivo* de ces biomatériaux. Une étude (235) en situation de coculture entre des fibroblastes humains et des HUVECs démontre l'utilité de ce besoin d'étendre les conditions de test. Dans cette étude (235), le silicium est capable de stimuler indirectement la prolifération des HUVECs par le biais d'une augmentation des sécrétions paracrines de VEGF des fibroblastes dès une concentration de silicium de 0,7 ppm (~25 µM). Cette concentration est peut-être atteinte dans les milieux du matériau Si_{0.4}HA mais cet effet pertinent *in vivo* ne peut pas être mesuré dans ces travaux de thèse.

Ce besoin de cocultures et de modèles aux conditions plus représentatives de l'environnement *in vivo* est essentiel pour caractériser des biomatériaux céramiques. Pour cette raison, la Partie V est dédiée à la mise en place d'un modèle de culture *in vitro*, utilisant des monocultures et d'une coculture, dans un bioréacteur en flux par perfusion, pour évaluer les propriétés d'architectures céramiques macroporeuses plus représentatives des implants osseux.

Partie V. Mise en place d'un modèle *in vitro* d'évaluation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques dans un bioréacteur en flux par perfusion

V.1. Démarche expérimentale de la mise en place du modèle *in vitro*

L'objectif de cette mise en place est d'obtenir un modèle de culture *in vitro*, qui permette d'évaluer de manière pertinente les propriétés biologiques de biomatériaux céramiques, dont la finalité est de servir d'implant osseux. Pour mettre en place ce modèle d'étude *in vitro* des architectures d'hydroxyapatites denses macroporeuses sont utilisées. L'hydroxyapatite est utilisée car c'est une céramique phosphocalcique bien caractérisée. Des monocultures de cellules endothéliales C166, de pré-ostéoblastes MC3T3-E1 Sc14 et une coculture de 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 sont utilisées pour ensemercer les architectures. Ces systèmes sont cultivés pendant 1 à 3 semaines au sein d'un bioréacteur en flux par perfusion. La mise en forme des architectures est réalisée par micro-extrusion puis frittage sous air. Les pièces sont ensuite caractérisées chimiquement par DRX et FTIR pour contrôler la pureté de leur phase et leur composition chimique. Leur surface est contrôlée par observations MEB et leur densité est mesurée par pycnométrie.

Le développement cellulaire au sein des architectures est caractérisé par visualisation du matériel biologique à l'aide de coloration histologique de coupes d'architectures après leur inclusion en résine de PMMA. La sécrétion de VEGF164 est mesurée dans les milieux de culture et l'expression de marqueurs clefs de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse sont mesurées.

V.2. Caractéristiques physico-chimiques des architectures d'hydroxyapatite

V.2.1. Mise en forme d'architecture macroporeuse en hydroxyapatite par micro-extrusion

Les architectures d'hydroxyapatite sont mises en forme par micro-extrusion par robocasting. La pâte élaborée selon les informations de la sous-partie II.1.5.2 est chargée dans une extrudeuse conçue et développée au laboratoire. Le réservoir est muni d'une buse de sortie de 400 μm de diamètre et l'extrusion est réalisée en atmosphère saturée en humidité sur un film de poly acétate. En raison du diamètre de la buse, les architectures de HA sont dénommées HA₄₀₀. Pour permettre l'adhérence de la première couche extrudée, la hauteur initiale de la buse par rapport au film est réglée manuellement à 150 μm à l'aide d'un clinquant. Le piston de 6 mm de diamètre presse la pâte au sein du réservoir à une vitesse constante de 4 mm/s. Cette vitesse d'extrusion peut être ajustée en fonction du comportement de la pâte. Par exemple, elle est réduite à environ 2 mm/s pour les premières couches afin de faciliter l'adhérence de la pâte au film et la stabilité de la pièce, puis elle est accélérée jusqu'à atteindre 4 mm/s. En dehors du contrôle de la vitesse, le procédé d'extrusion est automatisé et les mouvements latéraux et verticaux sont ajustés automatiquement par le programme d'extrusion selon le programme pré-enregistré. La vitesse de déplacement de la buse est par exemple de 800 mm/min lorsque la vitesse d'extrusion est réglée à 4 mm/s.

La Figure 83 présente une architecture HA₄₀₀ à la fin du processus d'extrusion.

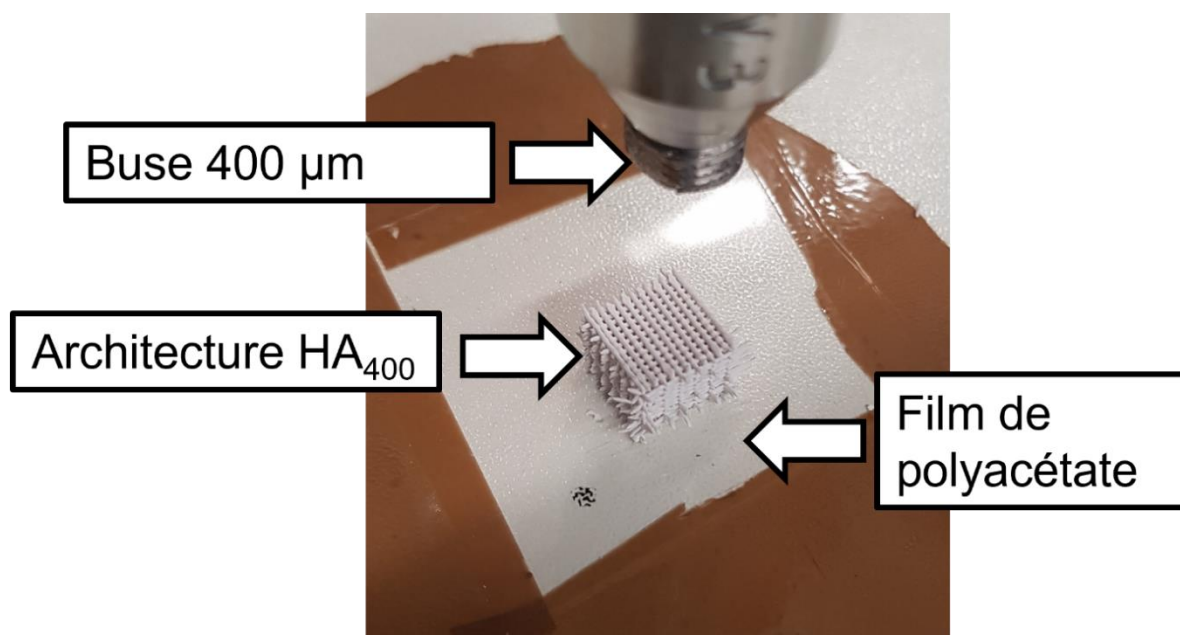


Figure 83 : Architecture HA₄₀₀ après extrusion

Les filaments protrudant des côtés de l'architecture fraîchement extrudée (Figure 83) correspondent aux fins de course de la buse. Ces extensions existent car l'extrusion doit être étendue pour éviter de déformer la pièce pendant la rupture du filament de la buse réalisé par un mouvement rapide du système d'extrusion.

V.2.2. Séchage et frittage

Les pièces extrudées sont placées dans une enceinte climatique (Weisstechnik) pour suivre le cycle de séchage suivant :

- 25°C humidité relative à 75% pendant 15 h – 40°C humidité relative à 32% pendant 5 h – 25°C humidité relative à 32% pendant 75 min.

Ce cycle permet de sécher uniformément la pièce et évite la déformation de sa couche extérieure. C'est une étape essentielle à la régularité des surfaces des pièces entre les différents lots. Une fois la pièce sèche, les filaments protrudant en dehors de l'architecture (Figure 83), indésirables car de taille variable et hors gabarit de la chambre de perfusion, sont délicatement retirés à l'aide d'une pince métallique.

Les architectures séchées et nettoyées sont frittées sous air dans le four MOS-B 180/4. Un déliantage est réalisé pour brûler la phase organique (Darvan C-N, PEI) avant le frittage de la céramique selon le cycle thermique complet suivant :

- 1°C/min – 500°C – 10°C/min – 1200°C 1 h – 10°C/min.

Le déliantage jusqu'à 500°C est progressif pour éviter d'entraîner des déformations importantes de la pièce en retirant brusquement la phase organique qui occupe environ 50% de son volume avant le séchage en enceinte climatique.

Les architectures frittées sont immergées en éthanol (83804.360, VWR) et nettoyées dans un bain à ultrason réglé à la puissance maximale pendant 10 min puis séchées pendant 24h à 100°C dans une étuve. Les poussières déposées à la surface de la pièce sont retirées par projection d'air comprimé. Les pièces destinées à la culture cellulaire sont ensuite emballées

dans de l'aluminium (face brillante vers l'intérieur), puis stérilisées en chaleur sèche à 200°C durant 4 h et placées dans l'enceinte stérile d'un poste de sécurité microbiologique. Ces pièces sont ensuiteensemencées et placées dans le bioréacteur en flux par perfusion selon les informations de la sous-partie II.2.6.2.2.

V.2.3. Apparence et dimension des pièces de HA₄₀₀

Des architectures HA₄₀₀ frittées sont présentées dans la photographie légendée de la Figure 84.

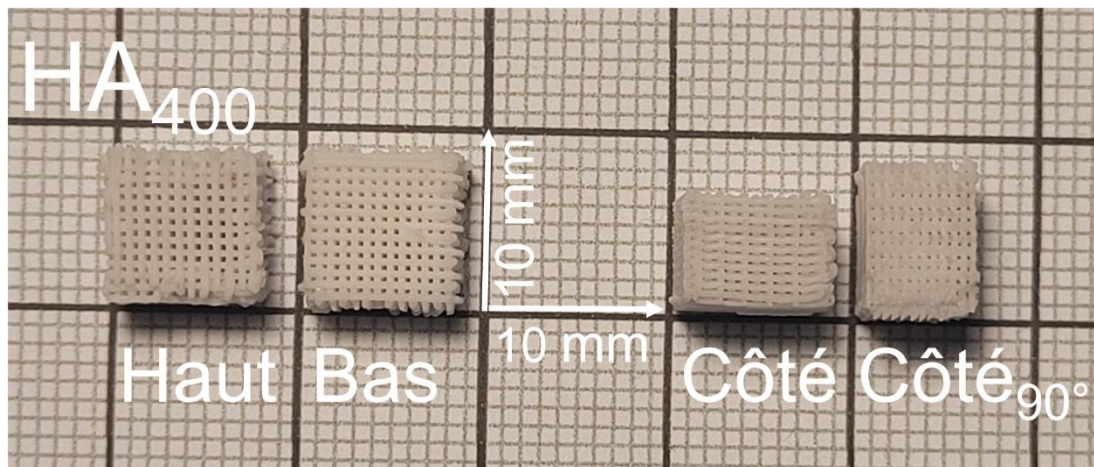


Figure 84 : Photographie d'architectures HA₄₀₀ frittées à 1200°C pendant 1 h avec des rampes à 10°C/min après un déliantage à 500°C avec une rampe de 1°C/min

Les architectures de HA₄₀₀ frittées mesurent environ 8,5 mm de côté et 6,2 mm de hauteur. Elles sont composées de 24 couches avec une orientation de 90° des filaments d'une couche par rapport à la suivante et chaque couche est composée de 12 filaments parallèles. Les architectures de HA₄₀₀ frittées (Figure 84) sont blanches, l'éclairage de la Figure 84 donne l'impression d'une coloration jaune. L'absence de certains filaments en surface des architectures est due à leur désolidarisation survenant généralement pendant la manipulation à l'issue du séchage. L'architecture « bas » est caractéristique de ce qui est observé sur la première couche extrudée avec un léger aplatissement de ses filaments. Cet aplatissement est une conséquence de la nécessité de se positionner à proximité du film d'acétate (150 µm) pour y faire adhérer cette première couche de filaments extrudés.

V.2.4. Caractéristiques chimiques de HA₄₀₀

V.2.4.1. Caractérisation chimique par DRX

Pour contrôler l'impact de la mise en forme et du frittage sur la cristallinité de l'hydroxyapatite, une caractérisation par DRX est réalisée. Un diffractogramme représentatif de HA₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h et réduite en poudre est présenté en Figure 85.

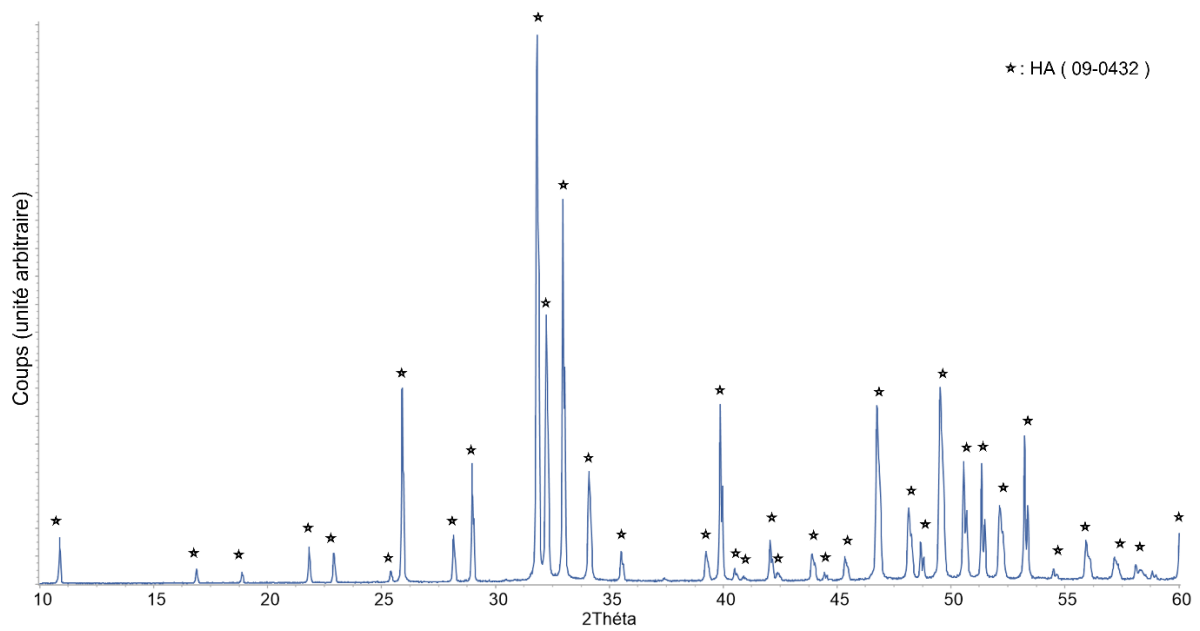


Figure 85 : Diffractogramme typique de HA₄₀₀ frittée sous air à 1200°C pendant 1 h

Etoile : Angle correspondant à l'hydroxyapatite

L'analyse des phases cristallines de HA₄₀₀ (Figure 85) indique que tous pics de diffractions correspondent à de l'hydroxyapatite. L'hydroxyapatite reste bien monphasée à l'issue du frittage des pièces.

V.2.4.2. Caractérisation chimique par FTIR

Pour contrôler l'absence de contamination chimique lors de la mise en forme, du séchage et du frittage de la pièce une caractérisation chimique par FTIR est réalisée sur de l'HA₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h et réduite en poudre. Un spectre FTIR typique de HA₄₀₀ frittée est présenté en Figure 86.

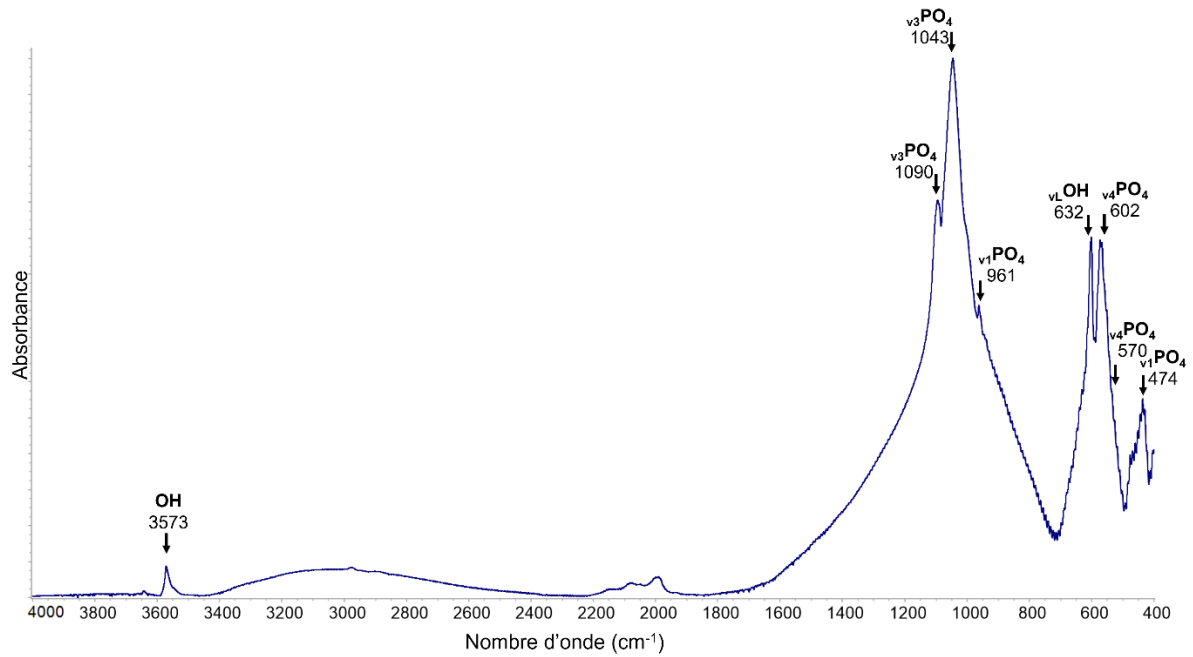


Figure 86 : Spectre FTIR de HA₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h

Les bandes vibrationnelles de l'hydroxyapatite sont indexées d'après les données du Tableau 2.

Le spectre FTIR de HA₄₀₀ frittée (Figure 86) montre que toutes les bandes vibrationnelles correspondant à l'hydroxyapatite pure (Tableau 2) sont observées. Le spectre est comparable à ceux observés à l'issue du frittage de HA sous forme de pastilles (Figure 30). Les différents procédés de mise en forme n'altèrent pas la composition chimique de la poudre utilisée.

V.2.5. Caractéristiques physiques de HA₄₀₀

La surface des architectures HA₄₀₀ frittées est observée par microscopie électronique, des observations caractéristiques sont présentées en Figure 84.

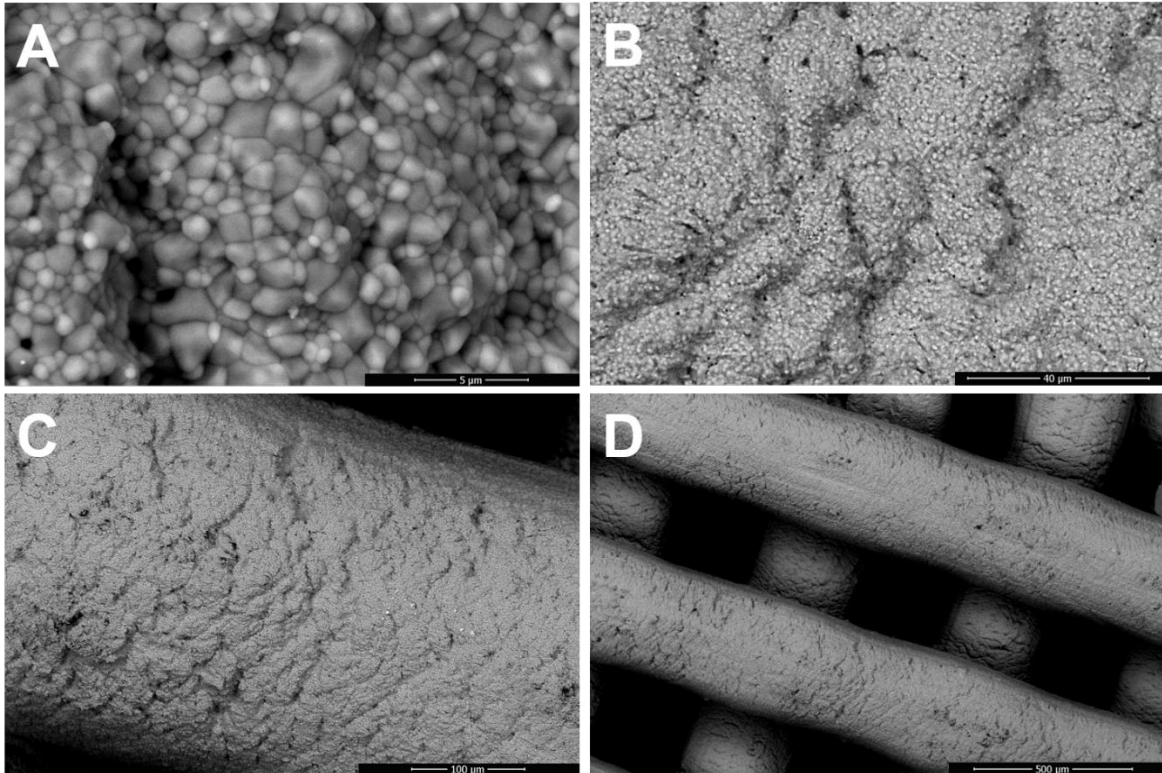


Figure 87 : Observation MEB de la surface de HA₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h

Barres d'échelles : A = 5 μm ; B = 40 μm ; C = 100 μm ; D = 500 μm. Images obtenues avec une tension de 10 kV (FEI-Quanta FEG 450)

La surface de HA₄₀₀ frittée (Figure 87) est composée de grains d'environ $0,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de diamètre. De nombreux sillons sont visibles à la surface des filaments donnant une apparence rugueuse à la pièce. Il y a peu de porosité visible à la surface de celle-ci. Sur ses extrémités les filaments d'hydroxyapatites mesurent $380 \pm 30 \mu\text{m}$ et sont espacés d'environ $270 \pm 30 \mu\text{m}$. En raison de l'affaissement de la pièce jusqu'à son séchage total, les filaments sont majoritairement aplatis. Les dimensions des macropores à l'intérieur de l'architecture sont plus faibles que vers l'extérieur. Au sein de la pièce leur hauteur est de $145 \pm 15 \mu\text{m}$ et leur largeur de $205 \pm 25 \mu\text{m}$ avec des dimensions plus faibles à la base de la pièce (là où l'extrusion débute) et plus grandes en haut de la pièce. Les filaments internes mesurent $425 \pm 25 \mu\text{m}$ de largeur et $270 \pm 30 \mu\text{m}$ de hauteur. Ces différences sont visibles en aval de cette partie en Figure 88 sur des coupes latérales des architectures. Les données sont résumées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Dimensions internes de HA₄₀₀

La taille des grains est obtenue d'après la dimension moyenne de plus de 250 grains sur 3 architectures HA₄₀₀. Les dimensions des filaments et des macropores sont obtenues en moyennant les mesures de 7 architectures sur des images MEB ou de microscopie photonique à raison d'au moins 4 champs soit les dimensions d'un minimum de 4 filaments et 8 macropores par architecture. Données en moyenne ± écart-type.

| Taille des grains (µm) | Largeur des filaments externes (µm) | Taille des macropores externes (µm) | Largeur des filaments internes (µm) | Hauteur des filaments internes (µm) | Hauteur des macropores internes (µm) | Largeur des macropores internes (µm) |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0,9 ± 0,5 | 380 ± 30 | 270 ± 30 | 425 ± 25 | 270 ± 30 | 145 ± 15 | 205 ± 25 |

La taille des grains est presque 2 fois supérieure à celle des pastilles de HA comme renseigné dans la partie III.1.4 : 0,9 ± 0,5 µm pour HA₄₀₀ contre 0,5 ± 0,2 pour les pastilles de HA. Cela s'explique par le frittage avec un temps de pallier plus long de 30 min. Malgré la croissance granulaire limitée de HA à 1200°C (274), celle-ci n'est pas absente.

Le taux de densification de HA₄₀₀ frittée à 1200°C pendant 1 h a été mesurée par pycnométrie sous hélium de pièces entières et de poudres frittées selon l'équation :

$$\text{taux de densification} = \frac{\text{densité relative apparente}}{\text{densité des poudres frittées}}$$

Les données sont rapportées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Densification de HA₄₀₀

Données obtenues sur 3 architectures HA₄₀₀

| Densité HA ₄₀₀ frittée (g/cm ³) | Densité poudre HA ₄₀₀ frittée (g/cm ³) | Taux de densification (%) |
|--|---|---------------------------|
| 3,1139 | 3,1361 | 99,3% |

Les architectures de HA₄₀₀ ont un taux de densification supérieur à 99% (Tableau 16). Au-delà du seuil de 95%, une céramique est considérée comme exempte de porosité ouverte (274). Les résultats sont cohérents avec des architectures de HA₄₀₀ denses après frittage comme les observations de la Figure 87 le montrent.

La topographie n'a pas été mesurée, les sillons visibles (Figure 87) sont dus à l'extrusion.

Ces caractérisations confirment que les architectures de HA₄₀₀ frittées sont des pièces denses macroporeuses composées d'hydroxyapatite monophasée pure dans la limite de caractérisation des systèmes d'analyses.

V.2.6. Evaluation biologiques préliminaires en 3D dynamique des architectures de HA₄₀₀

Les architectures de HA₄₀₀ sont des hydroxyapatites monophasées pures, ce qui signifie qu'elles influent peu sur l'activité des cellules endothéliales comme évoqué dans la partie I.6.1. Elles peuvent en revanche favoriser la différenciation de pré-ostéoblastes et la minéralisation résultante en raison de concentration de calcium élevé comme rapporté dans la sous-partie I.5.2.2.1.2. Le flux continu de milieu peut affecter significativement l'activité des cellules cultivées à la surface de l'architecture en générant un stress de cisaillement. Ce flux de milieu aqueux à 37°C est réglé à 1 mL/min et les pores les plus grands au travers duquel il doit s'écouler font moins de 2 cm de diamètre (chambre de perfusion). En approximant ces chambres à des cylindres parfait la nature du flux en leur sein peut être calculé grâce au nombre de Reynolds obtenu grâce à la formule :

$$Re = V \left(\frac{d}{\nu} \right)$$

V est ici la vitesse d'écoulement du flux, d le diamètre du conduit et ν la viscosité cinématique du milieu. Avec $V = 1 \text{ mL/min}$ soit $0,0167 \text{ cm}^3/\text{s}$, $d = 2 \text{ cm}$ soit $0,00018 \text{ cm}$ et $\nu = 0,6959 \text{ mm}^2/\text{s}$ (caractéristique de H₂O à 37°C) soit $0,006959 \text{ cm}^2/\text{s}$. Le nombre de Reynolds calculé est : $Re = 4,8$. Un nombre de Reynolds inférieure à 2000 indique que le flux est vraisemblablement laminaire.

La rencontre avec un obstacle et le passage à travers des pores plus petits peuvent créer des turbulences et modifier transitoirement la nature du flux et/ou induire des surpressions associées à une stagnation du milieu (338). En cas de flux laminaire la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes sera stimulée tout comme l'angiogenèse des cellules endothéliales. En cas de flux turbulent les pré-ostéoblastes devraient avoir leur activité ostéogénique augmentée tandis que les cellules endothéliales devraient peu proliférer (89), (339), (340).

V.2.7. Etude de la colonisation des architectures HA₄₀₀

V.2.7.1. Observation de coupes de HA₄₀₀

Des pièces HA₄₀₀ensemencées de cellules C166 ou de coculture 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 et placées dans un bioréacteur en flux par perfusion pendant 1, 2 ou 3 semaines ont été incluses dans une résine de PMMA, découpées, polies et colorés à l'aide d'une coloration histologique HE selon le protocole de la sous-partie II.2.8.2. Les observations de certaines des coupes de pièces incubées pendant 3 semaines sont présentées dans la Figure 88.

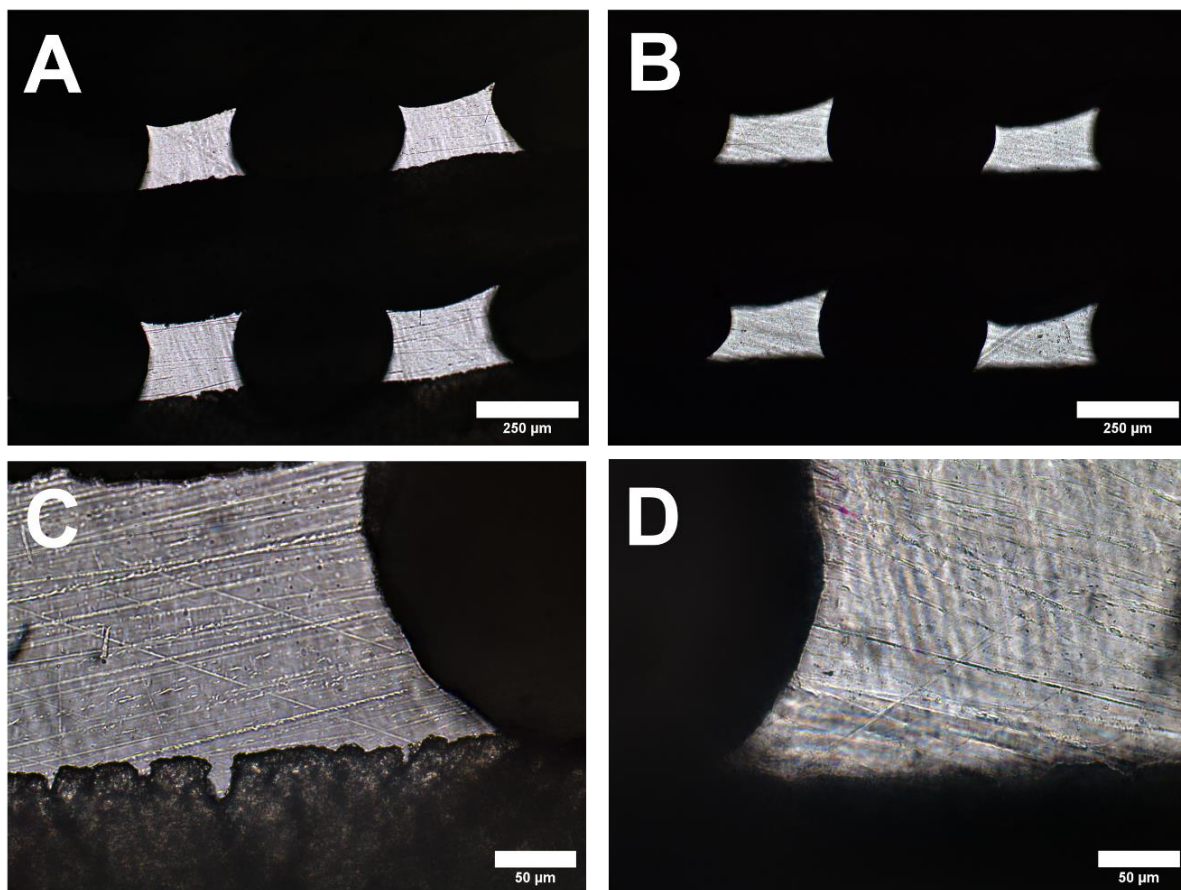


Figure 88 : Coupes de HA₄₀₀ après 21 jours de culture

Coloration HE. A et C : C166 seules. B et D : coculture de 2 C166 pour 1 MC3T3-E1 Sc14.

L'observation de la colonisation des pièces de HA₄₀₀ cultivées pendant 21 jours (Figure 88), ne permet pas de visualiser de matériel biologique. Par ailleurs, la taille variable des macropores et les déformations des filaments visibles entre la Figure 88 A et la Figure 88 B sont dues à l'affaissement de la pièce lors du séchage comme discuté précédemment en sous-partie V.2.3. Les rayures visibles sont dues au processus de polissage et les tâches sombres sont dues à des bulles d'air emprisonnées.

Le développement des cellules au sein d'un macropore est plus rapide à partir des angles internes (341), (342). Cependant, les coins des macropores architectures HA₄₀₀ (Figure 88 C et D) sont également vides de cellules. La coloration HE utilisée permet de marquer le cytoplasme en rouge et les noyaux en bleu et aucun marquage évocateur et sans ambiguïté n'a été observé sur les coupes. Toutes les pièces HA₄₀₀ ensemencées et traitées de cette manière présentent la même absence visuelle de matériel biologique.

Des études préliminaires à ces travaux ont pourtant confirmé que la colonisation des architectures HA₄₀₀ est efficace ainsi que le développement des cellules après une incubation de 3 semaines dans le bioréacteur en flux par perfusion. Des observations des noyaux des cellules sur des architectures HA₄₀₀ issues d'expérience réalisées avant ces travaux de thèse sont présentées en Figure 89.

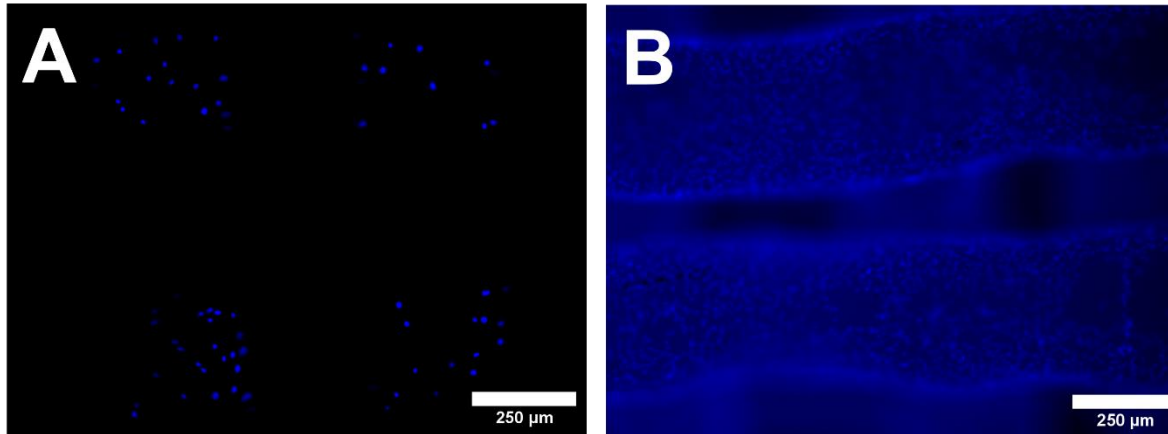


Figure 89 : Etudes préliminaires du développement cellulaire à la surface de HA₄₀₀

Bleu : noyaux. A et B : images extraite des travaux de A. Magnaudeix, non publiés. A : HA₄₀₀ensemencée avec 50 000 cellules d'une coculture de 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14, laissées adhérer pendant 4 h en conditions statiques puis cultivées pendant 48 h en bioréacteur ; B : HA₄₀₀ensemencée avec 50 000 MC3T3-E1, laissées adhérer 3 h en conditions statiques puis cultivées pendant 21 jours en bioréacteur. Barre d'échelle = 250 µm.

La surface des architectures de HA₄₀₀ lors des études préliminaires (Figure 89) est colonisée par des cellules dès 24 h de culture (Figure 89 A). De plus, les cellules prolifèrent et atteignent une densité de population importante après 21 jours de culture (Figure 89 B). Les conditions d'ensemencement et de culture dans ces études préliminaires sont similaires à celles des architectures présentées en Figure 88. De ce fait, la présence de cellules adhérentes sur les architectures présentées dans la Figure 88 est très probable.

L'absence de matériel biologique visualisé dans les coupes histologiques (Figure 88) peut s'expliquer par l'existence d'une trop fine couche de cellules pour être observée ou par la perte du matériel biologique lors de l'inclusion en résine et/ou de la préparation des coupes. Il n'a pas été possible de réaliser une dépolymérisation des coupes de HA₄₀₀ ensemencées et incluses en résine. Il n'a donc pas été possible de contrôler sur celles-ci la présence de matériel biologique par immunofluorescence.

Un ajustement et une optimisation des protocoles expérimentaux pour l'analyse des images issues de coupes sera nécessaire. La méthode d'inclusion en résine et de coupe devra être modifiée.

V.2.7.2. Sécrétion de VEGF164

La sécrétion de VEGF164 dans le milieu de culture du bioréacteur en flux par perfusion est mesurée par test ELISA pour les architectures de HA₄₀₀ ensemencées avec la monoculture de C166 et la coculture 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14, les résultats sont présentés en Figure 90.

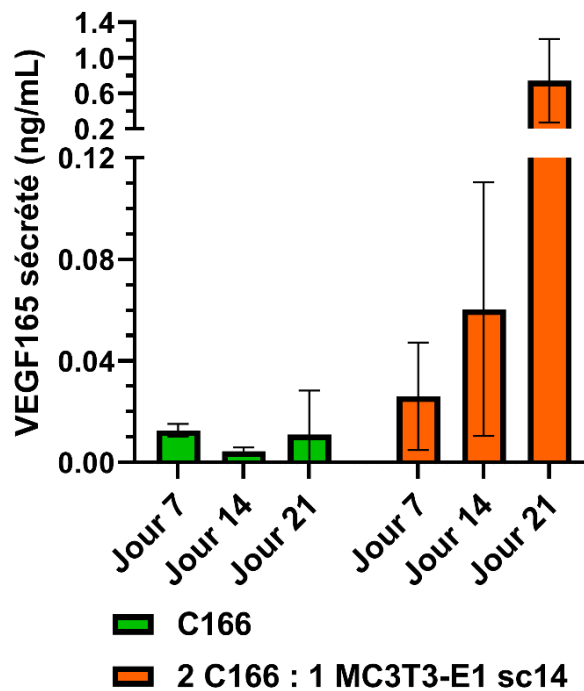


Figure 90 : Sécrétion de VEGF164 de cellules cultivées sur HA₄₀₀ en bioréacteur à flux
 Tests statistiques : Kruskal-Wallis suivi d'un test *post-hoc* de Dunn. Nombre d'échantillons indépendants = 3.

La sécrétion de VEGF164 par des cellules cultivées sur HA₄₀₀ (Figure 90) évolue faiblement avec le temps de culture en présence de C166 en monoculture. Pour rappel, conformément aux informations de la sous-partie II.2.6.2.2, le milieu de culture est renouvelé tous les 7 jours. La concentration retrouvée est de 14 ± 3 pg/mL après 7 jours, de 5 ± 1 pg/mL après 14 jours et de 11 ± 17 pg/mL après 21 jours. La sécrétion de VEGF164 par une coculture 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 semble augmenter avec le temps. Elle est de 28 ± 22 pg/mL après 7 jours, de 63 ± 53 pg/mL après 14 jours et de 742 ± 470 pg/mL après 21 jours. Aucune significativité statistique n'est retrouvée en raison des faibles variations ou des forts écart-types mesurés. Le VEGF164 est présent en trop faible quantité dans le milieu de culture pour être précisément quantifié, même après une concentration des échantillons selon le protocole renseigné dans la sous-partie II.2.7.9.

A l'exception de la sécrétion après 3 semaines par des cellules en coculture, les concentrations sont faibles par rapport à la sécrétion de VEGF164 mesurée en conditions 2D sur les matériaux comme présenté dans la sous-partie IV.1.1. Pour rappel, les sécrétions de VEGF164 des C166 mesurées après 7 jours de culture sont de $0,82 \pm 0,15$ ng/mL en présence de milieu complet sans matériau, de $1,05 \pm 0,6$ ng/mL en présence de HA, de $2,3 \pm 0,39$ ng/mL en présence de Cu_{0,1}HA, de $1,93 \pm 0,2$ ng/mL en présence de Cu_{0,5}HA et de $1,08 \pm 0,13$ ng/mL en présence de Si_{0,4}HA (Figure 59). Les volumes dans lesquels ces concentrations sont mesurées ne sont cependant pas comparables, les mesures de l'étude en modèle statique sont réalisées dans 1 mL, celles de l'étude en modèle dynamique le sont dans 25 mL. Le VEGF164 a une demi-vie très courte de quelques heures dans un milieu aqueux contenant 0,2 M de PBS *in vitro* (301). Par ailleurs, comme détaillé en sous-partie IV.1.1, l'action

protectrice des protéines du sérum, comme l'albumine (302), pourrait dans le meilleur des cas étendre cette demi-vie jusqu'à une vingtaine d'heure (303). Par conséquent, les mesures réalisées ne proviennent donc pas d'une accumulation dans le milieu entre les différents temps de mesure mais d'une sécrétion basale augmentée. La comparaison en valeur absolue est donc pertinente mais il faudra également la normaliser par rapport au nombre de cellules pour pouvoir comparer les expériences. La quantité en valeur absolue de VEGF164 retrouvée dans les milieux est pour les C166 seules de 350 ± 75 pg/ml après 7 jours, 125 ± 25 pg/mL après 14 jours et 275 ± 425 pg/mL après 21 jours. Pour les cocultures de 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 elle est de 700 ± 550 pg/mL après 7 jours, 1575 ± 1325 pg/ml après 14 jours et de $18\ 550 \pm 11\ 750$ pg/mL après 21 jours.

La quantité de cellules à la surface des pastilles et des architectures HA₄₀₀ n'est pas non plus comparable. Les matériaux $\phi 10$ ont une surface d'environ $0,442$ cm² et les $\phi 13$ une surface d'environ $0,724$ cm². La surface spécifique des architectures n'a pas pu être mesurée mais peut être estimée pour comparer les ordres de grandeurs. Cette surface est estimée d'après l'équation :

$$\text{surface HA400} = \text{surface filament} \times \text{nombre de filaments}$$

Deux hypothèses simplificatrices sont considérées, à savoir que tous les filaments sont parfaitement cylindriques et que leur intersection représente un point unique infiniment petit. Les filaments sont approximés à des cylindres de 380 μ m de diamètre et de $8,5$ mm de long. La surface de ces cylindres est calculée d'après l'équation :

$$\text{surface d'un cylindre} = 2\pi \times r^2 + \pi \times r \times h$$

La surface est d'environ $0,104$ cm² par filament. Une architecture comporte 288 filaments soit une surface d'environ $29,5$ cm². Le calcul est grossier et ne prend pas en compte les affaissements, les croisements des filaments mais également la rugosité. Ce calcul permet de constater que la surface utile d'une architecture HA₄₀₀ est d'un à deux ordres de grandeurs supérieure aux matériaux 2D. Cela signifie qu'à densité cellulaire égale de la surface des matériaux, la sécrétion de VEGF164 est très faible, près de 10 fois moins que les conditions statiques (sous-partie IV.1.1) en monoculture de C166, et qu'elle est faible en cas de coculture jusqu'à 14 jours de culture. Elle devient à 21 jours de culture comparable aux sécrétions des C166 observées en condition statique.

Ces résultats montrent que des cellules se développent dans les architectures de HA₄₀₀ dans les conditions expérimentales étudiées. Les monocultures de C166 ont une sécrétion réduite de VEGF qui peut provenir d'une densité cellulaire faible. La quasi-stagnation de la sécrétion de VEGF entre 1 et 3 semaines de culture suggère que la population de cellules évolue peu. Ces résultats peuvent suggérer que le flux de milieu est localement turbulent ce qui bloquerait les cellules endothéliales dans un phénotype propice à l'inflammation (89). Les cocultures 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 ont une sécrétion de VEGF croissante jusqu'à sécréter des quantités comparables aux modèles statiques de la partie IV. Cela témoigne d'une densité cellulaire en augmentation et probablement d'une différenciation accrue des pré-ostéoblastes en ostéoblastes. Cela peut provenir du flux qui peut stimuler l'activité des pré-ostéoblastes (339).

Il serait utile de réaliser une analyse *in silico* de la nature du flux traversant les architectures pour mieux comprendre le comportement des cellules cultivées en leur sein. Ce type d'analyse peut aussi être utilisée pour optimiser la structure des architectures, et maximiser la probabilité qu'un flux laminaire les traversent dans des conditions expérimentales déterminées.

Il serait intéressant de mesurer la sécrétion de VEGF par des MC3T3-E1 Sc14 seules. De plus, les cellules-endothéliales sécrètent BMP-2 et possèdent certains de ses récepteurs (343). Cette voie de signalisation autocrine entraîne des effets dépendant de la provenance des cellules endothéliales. Par exemple, la liaison de BMP2 sur des HUVEC stimule leur capacité de migration de prolifération, sur des HUAEC ces effets sont également accompagnés d'une diminution du taux d'apoptose (343). BMP-2 promeut la différenciation de CSM en pré-ostéoblaste, et l'ajout de BMP-2 au sein de biomatériaux imprégnés stimulent l'ostéogenèse autour du site d'implantation (344). Analyser le niveau de sécrétion de BMP-2, par test ELISA, par les cellules endothéliales en coculture avec des pré-ostéoblastes/ostéoblastes, et le comparer à des monocultures est une des voies à explorer pour connaître le niveau d'interaction paracrines entre les cellules d'une coculture. Comme évoqué dans la sous-partie traitant de l'angiogenèse au sein du tissu osseux (I.4.7) des protéines sécrétées par les cellules endothéliales, comme IGF-1 et l'Endothéline 1, ont un effet positif sur la croissance du tissu osseux (145). Analyser leur sécrétion par test ELISA permettrait également de mieux caractériser les interactions entre les cellules d'une coculture. Il serait également intéressant d'étudier la formation de jonction communicantes, avec la protéine connexine 43, entre les pré-ostéoblastes et les cellules endothéliales. Celles-ci modulent, *in vitro*, la différenciation des pré-ostéoblastes en cocultures avec des HUVEC (345). Leur fonction exacte et leur présence *in vivo* reste à déterminer (298).

V.2.8. Conclusion de la mise en place d'un modèle *in vitro* d'évaluation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques dans un bioréacteur en flux par perfusion

Dans cette partie, des architectures d'hydroxyapatite en 3D ont été réalisées par micro-extrusion puisensemencées et incubées dans un bioréacteur en flux par perfusion. Les travaux sur cette étude montrent que ce modèle de caractérisation *in vitro* est prometteur.

Cependant, les méthodes d'analyse doivent encore être affinées et/ou développées pour pouvoir en tirer pleinement partie. Parmi celles-ci, l'amélioration des techniques de visualisation du matériel biologique au sein de coupes histologiques devra être une priorité. De même, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse de l'expression des protéines et des ARN caractéristiques des processus biologiques recherchés. Il est à noter que des piècesensemencées et cultivées avec des monocultures de C166, de MC3T3-E1 Sc14 et de coculture 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14, sont conservées à -80°C pour ces analyses. Cependant, en raison de contrainte de temps, ces échantillons n'ont pas pu être analysés pendant ces travaux de thèse.

L'analyse des sécrétions de VEGF164 montre que les cellules endothéliales C166 en monoculture se développent mal à la surface de HA₄₀₀ tandis que des cocultures 2 C166 : 1 MC3T3-E1 Sc14 semblent s'y développer normalement. La grande présence de VEGF dans le milieu des cocultures après 21 jours de culture suggère que la différenciation des pré-ostéoblastes est très favorisée et qu'un processus d'angiogenèse par bourgeonnement pourrait y exister.

Une fois la mise en place et la validation de la méthodologie de caractérisation de ce modèle, l'étude des matériaux dopés, notamment en cuivre et en silicium, mis en forme en tant qu'architecture 3D permettra d'apporter des informations inatteignables dans les modèles 2D.

Conclusion

Les travaux de cette thèse avaient deux objectifs principaux. Premièrement, il s'agissait d'évaluer *in vitro* les propriétés angiogéniques et angioconductrices d'hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium. Deuxièmement, il fallait développer un modèle *in vitro* de caractérisation des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques qui soit plus représentatif de l'environnement *in vivo*. La nécessité de ce développement provient des limites de représentativité des modèles de culture statique couramment utilisés pour caractériser les biomatériaux. Un nouveau modèle d'étude est nécessaire pour optimiser le développement de biomatériaux et limiter le recours aux modèles animaux en réalisant des caractérisations pertinentes au *in vivo* en amont.

Quatre compositions d'hydroxyapatites ont été synthétisées et mises en forme sur la base des travaux réalisées précédemment au laboratoire IRCER de Limoges. Ces compositions, monophasées et exemptes de contamination chimique, sont : l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, l'hydroxyapatite dopée au silicium ($\text{Si}_{0.4}\text{HA}$) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$ et deux hydroxyapatites dopées au cuivre de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}^{\text{II}}_z\text{Cu}^{\text{I}}_y\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ ($y \gg z$) où $x=y+z$ et $x = 0,1$ mole ($\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$) ou $x = 0,5$ mole ($\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$).

Deux types de pièces céramiques ont été élaborés : des pastilles denses (taux de densification > 95%), mises en forme par pressage uniaxial et une architecture macroporeuse, mise en forme par micro-extrusion 3D. Les caractérisations physico-chimiques des pastilles des quatre compositions (DRX, FTIR, MEB, Poussée d'Archimède, pycnométrie, profilométrie) ont montré que seule leur composition chimique est susceptible d'entraîner une variation de leurs effets biologiques. L'HA, en tant que composition biocompatible et bien caractérisée, a été utilisée pour mettre en forme les architectures 3D macroporeuses.

Pour évaluer les propriétés angiogéniques et angioconductrices des quatre matériaux, des cellules endothéliales murines de la lignée C166 ont été cultivées directement à la surface des pastilles d'HA dopées, ou en présence d'extraits de milieu de culture conditionné (i.e. dans lequel les céramiques ont été immergées seules). Les expériences biologiques ont été conduites simultanément et les résultats comparés à ceux obtenus pour l'HA. Cette composition est couramment utilisée comme matériau céramique pour la substitution osseuse et a servi de référence interne en raison de sa biocompatibilité et de son absence de stimulation de l'angiogenèse. La biocompatibilité des matériaux et leurs propriétés angiogéniques ont été évaluées sur des durées pouvant aller jusqu'à 7 jours selon les caractérisations.

Les matériaux $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ sont biocompatibles jusqu'à la durée maximale de l'étude de 7 jours. Par rapport aux cellules cultivées sur le matériau HA, les cellules C166 y sont en quantité similaire. L'activité métabolique des populations de C166 sont comparables et leurs taux de mortalité ne sont pas significativement différents. Jusqu'à 4 jours de culture, les C166 cultivées à la surface du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ sont comparables à celles sur les autres matériaux par leur nombre, leur activité métabolique et leur taux de mortalité. Cependant, après 7 jours de culture, le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ entraîne une cytotoxicité qui réduit le nombre de cellules par rapport aux autres matériaux. Le fort taux de mortalité des C166 à la surface de ce matériau le désigne comme non biocompatible. Malgré cette mortalité importante, la quantité de cellules viables et ne présentant pas de signe de stress reste plus de 10 fois supérieure à l'ensemencement initial. En raison de cette capacité à maintenir une population de cellules

dans un état physiologique, la caractérisation biologique du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ a été poursuivie pour étudier l'effet de la dose de cuivre sur les marqueurs de l'angiogenèse exprimés par les C166.

Les matériaux Cu_xHA entraînent une stimulation de la prolifération des C166 à 3 jours de culture. Cet effet peut s'expliquer par la présence d'une concentration de cuivre en solution supérieure aux seuils où il possède un effet stimulateur de la prolifération sur les cellules endothéliales d'après les données de la littérature.

La cytotoxicité du matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ à 7 jours de culture est attribuable à sa plus grande teneur en cuivre, associée à la plus grande concentration de cuivre dans le milieu de culture. En effet, cette concentration est à un niveau où des effets cytotoxiques ont été observés sur des cellules endothéliales. Cette cytotoxicité proviendrait de la génération de ROS induite par le cuivre en solution, mais une toxicité directe du cuivre n'est pas exclue.

Les C166 cultivées sur les matériaux s'organisent en fuseaux multicellulaires dès 3 jours de culture à la surface des matériaux Cu_xHA et à partir de 4 jours de culture à la surface de HA et $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$. Dans ces fuseaux, les C166 adoptent un phénotype caractéristique de cellules endothéliales en migration avec une structure allongée, de nombreuses fibres de stress et peu de VE-Cadhérine aux jonctions membranaires. Ces cellules expriment fortement le récepteur VEGFR2, acteur principal de l'angiogenèse par bourgeonnement en réponse au VEGF. Sur les matériaux Cu_xHA , les C166 expriment fortement PECAM-1 et sécrètent davantage une forme de MMP-9. Ces phénotypes caractéristiques d'un processus angiogénique, plus rapide sur les matériaux Cu_xHA , sont attribuables à la sécrétion de VEGF164 par les C166 à la surface de ces matériaux. La survenue plus rapide de l'angiogenèse sur les hydroxyapatites dopées au cuivre est attribuable à une sécrétion significativement accrue de VEGF164 par les C166 à 7 jours cultivées sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ et dès 4 jours pour celles cultivées sur $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ uniquement.

Les C166 cultivées sur les matériaux Cu_xHA surexpriment après 7 jours de culture l'ARNm de vWF, régulateur et inhibiteur de l'angiogenèse, et répriment l'expression de l'ARNm d'eNOS, un initiateur de l'angiogenèse. Ces expressions dans des cellules où un processus angiogénique par bourgeonnement est actif, suggèrent que les fuseaux multicellulaires qu'elles forment sont assimilables à des bourgeons angiogéniques en cours de maturation.

L'origine de la stimulation pro-angiogénique des matériaux Cu_xHA a été recherchée, notamment le mécanisme pro-angiogénique du cuivre régulièrement suggéré dans la littérature. Ces études suggèrent qu'une surproduction de ROS due au cuivre stabiliserait l'expression de HIF-1 α . Les travaux de cette thèse montrent que ce mécanisme pourrait être à l'origine de la stimulation initiale des C166 sur les matériaux Cu_xHA car des milieux conditionnés par ces matériaux entraînent la surproduction de ROS intracellulaires. En revanche, les sécrétions accrues de VEGF164 à 4 et 7 jours, en l'absence d'expression augmentée de HIF-1 α , suggèrent qu'il existe en parallèle un autre mécanisme de stimulation de l'angiogenèse par le cuivre. Ce mécanisme pourrait également impliquer la voie HIF-1, sur laquelle le cuivre peut agir directement en bloquant son inhibiteur FIH-1 par interaction avec le Fe^{2+} qu'il utilise comme cofacteur.

Un milieu de culture conditionné par le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$, est capable de stimuler la vitesse de fermeture d'une blessure d'une couche de C166. Cette stimulation pourrait passer par une vitesse de migration accrue en raison de l'absence de stimulation de la prolifération des C166 par le matériau. L'origine de cet effet provient probablement d'une inhibition de l'enzyme PHD

dégradant HIF-1 α ou de l'inhibiteur de HIF-1, FIH-1. L'effet de Si_{0.4}HA provient vraisemblablement de silicium en solution, sous forme d'acide orthosilicique, à une concentration micromolaire. Cette concentration est susceptible de perturber la cinétique d'enzymes utilisant le fer comme cofacteur en interagissant avec ce dernier. Un milieu de culture conditionné par le matériau Si_{0.4}HA semble limiter la génération de ROS, même en présence d'acide ascorbique capable d'initier ces réactions. Cet effet proviendrait notamment de la capacité de Si(OH)₄ à séquestrer le Fe²⁺, catalyseur de réaction productrices de ROS.

Au final, les matériaux Si_{0.4}HA et Cu_{0.1}HA testés lors de ces travaux de thèse sont capables de soutenir un processus angiogénique et le matériau Cu_{0.1}HA est pro-angiogénique. Le matériau Cu_{0.5}HA est pro-angiogénique mais sa forte teneur en cuivre limite ses capacités à soutenir un processus angiogénique.

Les expériences réalisées lors de cette thèse montrent que les ajouts directs d'éléments chimiques dans les milieux de culture à des concentrations équivalentes à celles retrouvées dans les milieux de cultures conditionnés par les matériaux céramiques ne répliquent pas fidèlement le conditionnement. Ce problème de fidélité pourrait provenir de la réactivité du cuivre et de la méthode expérimentale sélectionnée. En raison de la solubilité des hydroxyapatites, il serait difficile de répliquer un conditionnement par le matériau. Par conséquent, la réalisation de contrôles par ce biais est à éviter au profit de conditionnement par les matériaux à évaluer.

La difficulté à apporter un avis définitif sur les propriétés d'un matériau, notamment sur la biocompatibilité du matériau Cu_{0.5}HA, souligne la nécessité de développer des modèles d'analyse des biomatériaux *in vitro* plus proches des conditions *in vivo*. Une voie d'amélioration importante est l'utilisation de cocultures pertinentes. Une autre voie essentielle est de répliquer l'effet du mouvement des fluides interstitiels. Ces deux voies d'amélioration aident à répliquer le microenvironnement du site d'implantation du biomatériau. Avec des conditions *in vitro* plus proches de celles *in vivo*, il deviendrait possible d'identifier rapidement les caractéristiques physico-chimiques favorables ou défavorables des biomatériaux. Cela réduirait les temps de caractérisations de leurs propriétés biologiques et diminuerait les risques d'échec, lors des tests *in vivo*, grâce à la plus grande pertinence des résultats.

Pour mettre en place le nouveau modèle de caractérisation *in vitro* des propriétés biologiques de céramiques phosphocalciques, les architectures macroporeuses d'HA ont été placées dans un bioréacteur en flux par perfusion. Les architectures ont étéensemencées avec des monocultures de C166, de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 Sc14, ou des cocultures des deux avec un ratio de deux C166 pour une MC3T3-E1 Sc14. Les cultures ont été maintenues pendant 1, 2 ou 3 semaines. Des inclusions en résines des architectures ont été réalisées afin d'observer le développement des cellules au sein de la pièce après coloration histologique. Des prélèvements du milieu de culture ont été réalisés pour mesurer la sécrétion de VEGF164.

Les cellules au sein des architectures n'ont pas été observées, soit en raison de problèmes techniques, soit en raison d'un développement cellulaire en monocouche trop fine pour être observée par le biais de l'inclusion en résine et de la coloration histologique. Les cellules sont cependant présentes et sécrètent du VEGF164. Les monocultures de C166 sécrètent un niveau basal constant jusqu'à 21 jours de culture ce qui témoigne du maintien d'une population dans un état physiologique comparable. Les cocultures sécrètent une quantité plus importante de VEGF164 au cours du temps jusqu'à atteindre après 21 jours un niveau de sécrétion comparable à celles observées par les C166 sur les pastilles. Cette comparaison tient en

compte des différences de volume des milieux mais suppose que la densité cellulaire est comparable ce qui ne peut pas être confirmée. Cela suggère néanmoins que la population de cellules de la coculture est en augmentation, et/ou que les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes, et/ou que les C166 sont stimulées par des interactions paracrines avec les MC3T3-E1 Sc14 et sécrètent davantage de VEGF164. Cette sécrétion augmentée suggère que les C166 en coculture pourraient produire une angiogenèse par bourgeonnement dans ces architectures.

Perspectives :

Le développement de matériaux adaptés à la réparation osseuse bénéficierait de l'élucidation complète des mécanismes pro-angiogéniques du cuivre et du silicium. Une première étape serait d'utiliser des chélateurs du fer et du cuivre pour investiguer le rôle de l'inhibition de FIH-1. Un autre axe serait de rechercher le rôle des voies de l'hypoxie dans l'angiogenèse par bourgeonnement produite par les C166, en utilisant du CoCl_2 , un composé capable de mimer chimiquement une hypoxie. Si le rôle intrinsèque de la chimie du cuivre pour son activité pro-angiogénique est confirmé, le développement d'un matériau à faible teneur en cuivre devrait être envisagé. Ce matériau posséderait une plus faible toxicité tout en conservant un effet stimulateur, qui apparaît dans la littérature dès des concentrations sub-micromolaires. Celui-ci pourrait mieux répondre aux besoins de vascularisation des biomatériaux céramiques pour la réparation osseuse, tout en réduisant le risque de toxicité pour les cellules environnantes comme les cellules stromales mésenchymateuses.

L'utilisation de matériaux présentant une structure microporeuse pourrait permettre une meilleure solubilisation des éléments dopants. En effet, cela permettrait, pour des matériaux pouvant difficilement contenir davantage d'élément dopant comme le silicium (cas de $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$), d'augmenter les concentrations de ces composés bioactifs en solution. La présence de différentes quantités de dopants en solution permettrait d'identifier d'éventuels effets dose-dépendant. Dans le cas du silicium, une concentration importante pourrait favoriser l'ostéogenèse tout en stimulant certains processus angiogéniques.

L'utilisation de plusieurs dopants dans le même matériau est une voie à explorer. La combinaison d'une faible concentration de cuivre et d'une forte concentration de silicium pourrait activer des voies de signalisation pro-angiogéniques et pro-ostéogéniques tout en limitant la génération de ROS.

Les matériaux testés seront à étudier en bioréacteur pour valider les propriétés observées dans les modèles statiques. Ces études gagneront en pertinence à utiliser des cocultures de cellules endothéliales, cellules osseuses et idéalement de cellules immunitaires. L'utilisation de cellules différenciées et non différenciées dans ces modèles apparaît essentielle pour comprendre l'interaction des matériaux avec l'environnement de son site d'implantation. Par ailleurs, la caractérisation de la nature du flux au sein des architectures macroporeuses en culture et de son évolution sera essentielles pour comprendre l'origine des effets biologiques observés dans ce système *in vitro* dynamique.

Références bibliographiques

1. J. J. Sela, I. A. Bab, *Principles of Bone Regeneration* (Springer US, Boston, MA, 2012; <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-2059-0>).
2. E. Santolini, R. West, P. V. Giannoudis, Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury*. **46**, S8–S19 (2015).
3. D. J. Hak, D. Fitzpatrick, J. A. Bishop, J. L. Marsh, S. Tilp, R. Schnettler, H. Simpson, V. Alt, Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. **45**, S3–S7 (2014).
4. H.-S. Sohn, J.-K. Oh, Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. **23**, 9 (2019).
5. T. T. Roberts, A. J. Rosenbaum, Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis*. **8**, 114–124 (2012).
6. D. Marchat, E. Champion, "Ceramic devices for bone regeneration: Mechanical and clinical issues and new perspectives" in *Advances in Ceramic Biomaterials* (Elsevier, 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100881-2.00008-7>), pp. 279–311.
7. W. Wang, K. W. K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. **2**, 224–247 (2017).
8. H. F. Pereira, I. F. Cengiz, F. S. Silva, R. L. Reis, J. M. Oliveira, Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. **31**, 27 (2020).
9. H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, G. Guillemain, Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. **18**, 959–963 (2000).
10. J. Zhou, H. Lin, T. Fang, X. Li, W. Dai, T. Uemura, J. Dong, The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*. **31**, 1171–1179 (2010).
11. A. Jacobs, G. Renaudin, C. Forestier, J.-M. Nedelec, S. Descamps, Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects. *Acta Biomater*. **117**, 21–39 (2020).
12. K. Dashnyam, A. El-Fiqi, J. O. Buitrago, R. A. Perez, J. C. Knowles, H.-W. Kim, A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *J Tissue Eng*. **8**, 204173141770733 (2017).
13. G. Hu, Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem*. **69**, 326–335 (1998).
14. X. Zhou, N. Zhang, S. Mankoci, N. Sahai, Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials. *J Biomed Mater Res A*. **105**, 2090–2102 (2017).
15. G. J. Tortora, S. R. Grabowski, *Principes d'anatomie et de physiologie* (Editions du Renouveau Pédagogique, 2001).
16. N. G. Dela Paz, P. A. D'Amore, Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res*. **335**, 5–16 (2009).
17. M. Potente, T. Mäkinen, Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **18**, 477–494 (2017).
18. W. C. Aird, Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res*. **100**, 158–173 (2007).
19. R. V. Stan, E. Tkachenko, I. R. Niesman, PV1 Is a Key Structural Component for the Formation of the Stomatal and Fenestral Diaphragms. *Mol Biol Cell*. **15**, 3615–3630 (2004).

20. J. Aggeler, Z. Werb, Initial events during phagocytosis by macrophages viewed from outside and inside the cell: membrane-particle interactions and clathrin. *Journal of Cell Biology*. **94**, 613–623 (1982).
21. M. Karow, R. Sánchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega, C. Heinrich, S. Gascón, M. A. Khan, D. C. Lie, A. Dellavalle, G. Cossu, R. Goldbrunner, M. Götz, B. Berninger, Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell*. **11**, 471–476 (2012).
22. J.-M. Courtney, B. Sutherland, Harnessing the stem cell properties of pericytes to repair the brain. *Neural Regen Res*. **15**, 1021 (2020).
23. J. E. Moore, C. D. Bertram, Lymphatic System Flows. *Annu Rev Fluid Mech*. **50**, 459–482 (2018).
24. G. Eelen, L. Treps, X. Li, P. Carmeliet, Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res* (2020), pp. 310–329.
25. K. Wolf, H. Hu, T. Isaji, A. Dardik, Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *J Vasc Surg*. **69**, 253–262 (2019).
26. S. Rousseau, F. Houle, J. Huot, Integrating the VEGF Signals Leading to Actin-Based Motility in Vascular Endothelial Cells. *Trends Cardiovasc Med*. **10**, 321–327 (2000).
27. N. Prasain, T. Stevens, The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res*. **77**, 53–63 (2009).
28. V. Nehls, D. Drenckhahn, Demonstration of actin filament stress fibers in microvascular endothelial cells in situ. *Microvasc Res*. **42**, 103–112 (1991).
29. A. A. Taha, M. Taha, J. Seebach, H.-J. Schnittler, ARP2/3-mediated junction-associated lamellipodia control VE-cadherin-based cell junction dynamics and maintain monolayer integrity. *Mol Biol Cell*. **25**, 245–256 (2014).
30. S. karthik, T. Djukic, J.-D. Kim, B. Zuber, A. Makanya, A. Odriozola, R. Hlushchuk, N. Filipovic, S. W. Jin, V. Djonov, Synergistic interaction of sprouting and intussusceptive angiogenesis during zebrafish caudal vein plexus development. *Sci Rep*. **8**, 9840 (2018).
31. N. P. Omorphos, C. Gao, S. S. Tan, M. S. Sangha, Understanding angiogenesis and the role of angiogenic growth factors in the vascularisation of engineered tissues. *Mol Biol Rep*. **48** (2021), pp. 941–950.
32. L. K. Phng, H. Gerhardt, Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Dev Cell*. **16**, 196–208 (2009).
33. M. J. Siemerink, I. Klaassen, I. M. C. Vogels, A. W. Griffioen, C. J. F. Van Noorden, R. O. Schlingemann, CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. **15**, 151–163 (2012).
34. V. Gebala, R. Collins, I. Geudens, L.-K. Phng, H. Gerhardt, Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nat Cell Biol*. **18**, 443–450 (2016).
35. C. Betz, A. Lenard, H.-G. Belting, M. Affolter, Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development*. **143**, 2249–2260 (2016).
36. R. M. Hirschberg, M. Sachtleben, J. Plendl, Electron microscopy of cultured angiogenic endothelial cells. *Microsc Res Tech*. **67**, 248–259 (2005).
37. R. Montesano, L. Orci, P. Vassalli, In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *Journal of Cell Biology*. **97**, 1648–1652 (1983).

38. D. S. Grant, K.-I. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin, H. K. Kleinman, Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*. **58**, 933–943 (1989).
39. J. Plendl, Differences of microvascular endothelium in the bovine corpus luterum of pregnancy and the corpus luteum of the estrous cycle. *Biol Cell*. **87**, 179–188 (1996).
40. P. Nowak-Sliwinska, K. Alitalo, E. Allen, A. Anisimov, A. C. Aplin, R. Auerbach, H. G. Augustin, D. O. Bates, J. R. van Beijnum, R. H. F. Bender, G. Bergers, A. Bikfalvi, J. Bischoff, B. C. Böck, P. C. Brooks, F. Bussolino, B. Cakir, P. Carmeliet, D. Castranova, A. M. Cimpean, O. Cleaver, G. Coukos, G. E. Davis, M. De Palma, A. Dimberg, R. P. M. Dings, V. Djonov, A. C. Dudley, N. P. Duffon, S.-M. Fendt, N. Ferrara, M. Fruttiger, D. Fukumura, B. Ghesquière, Y. Gong, R. J. Griffin, A. L. Harris, C. C. W. Hughes, N. W. Hultgren, M. L. Iruela-Arispe, M. Irving, R. K. Jain, R. Kalluri, J. Kalucka, R. S. Kerbel, J. Kitajewski, I. Klaassen, H. K. Kleinmann, P. Koolwijk, E. Kuczyński, B. R. Kwak, K. Marien, J. M. Melero-Martin, L. L. Munn, R. F. Nicosia, A. Noel, J. Nurro, A.-K. Olsson, T. V. Petrova, K. Pietras, R. Pili, J. W. Pollard, M. J. Post, P. H. A. Quax, G. A. Rabinovich, M. Raica, A. M. Randi, D. Ribatti, C. Ruegg, R. O. Schlingemann, S. Schulte-Merker, L. E. H. Smith, J. W. Song, S. A. Stacker, J. Stalin, A. N. Stratman, M. Van de Velde, V. W. M. van Hinsbergh, P. B. Vermeulen, J. Waltenberger, B. M. Weinstein, H. Xin, B. Yetkin-Arik, S. Yla-Herttuala, M. C. Yoder, A. W. Griffioen, Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. **21**, 425–532 (2018).
41. J. Cao, M. Ehling, S. März, J. Seebach, K. Tarbashevich, T. Sixta, M. E. Pitulescu, A. C. Werner, B. Flach, E. Montanez, E. Raz, R. H. Adams, H. Schnittler, Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. *Nat Commun*. **8** (2017), doi:10.1038/s41467-017-02373-8.
42. V. Djonov, O. Baum, P. H. Burri, Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*. **314**, 107–117 (2003).
43. M. Potente, H. Gerhardt, P. Carmeliet, Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*. **146**, 873–887 (2011).
44. G. NEUFELD, T. COHEN, S. GENGRINOVITCH, Z. POLTORAK, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. **13**, 9–22 (1999).
45. A. G. Arroyo, M. L. Iruela-Arispe, Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*. **86**, 226–235 (2010).
46. P. Nyberg, L. Xie, R. Kalluri, Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Res*. **65**, 3967–3979 (2005).
47. S. Stegen, G. Carmeliet, The skeletal vascular system – Breathing life into bone tissue. *Bone*. **115**, 50–58 (2018).
48. A. S. R. Maharaj, P. A. D'Amore, Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res*. **74**, 100–113 (2007).
49. L. Jakobsson, C. A. Franco, K. Bentley, R. T. Collins, B. Ponsioen, I. M. Aspalter, I. Rosewell, M. Busse, G. Thurston, A. Medvinsky, S. Schulte-Merker, H. Gerhardt, Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. **12**, 943–953 (2010).
50. S. Gill, W. Parks, Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. **40**, 1334–1347 (2008).
51. K. Bajbouj, R. K. Ramakrishnan, Q. Hamid, Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Its Implications in Asthma. *J Immunol Res*. **2021**, 1–12 (2021).

52. A. Page-McCaw, A. J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 221–233 (2007).
53. M. Nawaz, N. Shah, B. Zanetti, M. Maugeri, R. Silvestre, F. Fatima, L. Neder, H. Valadi, Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair. *Cells.* **7**, 167 (2018).
54. K. Lehti, E. Allen, H. Birkedal-Hansen, K. Holmbeck, Y. Miyake, T.-H. Chun, S. J. Weiss, An MT1-MMP-PDGF receptor- β axis regulates mural cell investment of the microvasculature. *Genes Dev.* **19**, 979–991 (2005).
55. M. P. Vincenti, C. E. Brinckerhoff, Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you? *J Cell Physiol.* **213**, 355–364 (2007).
56. M. Nguyen, J. Arkell, C. J. Jackson, Active and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-free Gelatinase B Accumulates within Human Microvascular Endothelial Vesicles. *Journal of Biological Chemistry.* **273**, 5400–5404 (1998).
57. E. Fagiani, G. Christofori, Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* **328**, 18–26 (2013).
58. M. R. Kelly-Goss, B. Ning, A. C. Bruce, D. N. Tavakol, D. Yi, S. Hu, P. A. Yates, S. M. Peirce, Dynamic, heterogeneous endothelial Tie2 expression and capillary blood flow during microvascular remodelling. *Sci Rep.* **7**, 1–12 (2017).
59. R. D. Starke, F. Ferraro, K. E. Paschalaki, N. H. Dryden, T. A. J. McKinnon, R. E. Sutton, E. M. Payne, D. O. Haskard, A. D. Hughes, D. F. Cutler, M. A. Laffan, A. M. Randi, Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood.* **117**, 1071–1080 (2011).
60. A. M. Randi, K. E. Smith, G. Castaman, von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood.* **132**, 132–140 (2018).
61. A. M. Randi, M. A. Laffan, Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* **15**, 13–20 (2017).
62. Y. Xiang, J. Hwa, Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease. *Curr Opin Hematol.* **23**, 288–293 (2016).
63. G. L. Semenza, Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell.* **148**, 399–408 (2012).
64. V. Manuelli, C. Pecorari, G. Filomeni, E. Zito, Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis. *FEBS Journal* (2021), , doi:10.1111/febs.16110.
65. S. L. Miles, A. P. Fischer, S. J. Joshi, R. M. Niles, Ascorbic acid and ascorbate-2-phosphate decrease HIF activity and malignant properties of human melanoma cells. *BMC Cancer.* **15**, 1–12 (2015).
66. N. Maulik, D. K. Das, Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* **33**, 1047–1060 (2002).
67. D. T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler, Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 150–166 (2005).
68. G. R. Drummond, H. Cai, M. E. Davis, S. Ramasamy, D. G. Harrison, Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Hydrogen Peroxide. *Circ Res.* **86**, 347–354 (2000).
69. S. Thibeault, Y. Rautureau, M. Oubaha, D. Faubert, B. C. Wilkes, C. Delisle, J.-P. Gratton, S-Nitrosylation of β -Catenin by eNOS-Derived NO Promotes VEGF-Induced Endothelial Cell Permeability. *Mol Cell.* **39**, 468–476 (2010).

70. J. Kroll, J. Waltenberger, VEGF-A Induces Expression of eNOS and iNOS in Endothelial Cells via VEGF Receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun.* **252**, 743–746 (1998).
71. K. De Bock, M. Georgiadou, S. Schoors, A. Kuchnio, B. W. Wong, A. R. Cantelmo, A. Quaegebeur, B. Ghesquière, S. Cauwenberghs, G. Eelen, L.-K. Phng, I. Betz, B. Tembuysen, K. Brepoels, J. Welti, I. Geudens, I. Segura, B. Cruys, F. Bifari, I. Decimo, R. Blanco, S. Wyns, J. Vangindertael, S. Rocha, R. T. Collins, S. Munck, D. Daelemans, H. Imamura, R. Devlieger, M. Rider, P. P. Van Veldhoven, F. Schuit, R. Bartrons, J. Hofkens, P. Fraisl, S. Telang, R. J. DeBerardinis, L. Schoonjans, S. Vinckier, J. Chesney, H. Gerhardt, M. Dewerchin, P. Carmeliet, Role of PFKFB3-Driven Glycolysis in Vessel Sprouting. *Cell.* **154**, 651–663 (2013).
72. L. N. Groschner, M. Waldeck-Weiermair, R. Malli, W. F. Graier, Endothelial mitochondria—less respiration, more integration. *Pflugers Arch.* **464**, 63–76 (2012).
73. K. De Bock, M. Georgiadou, P. Carmeliet, Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Cell Metab.* **18**, 634–647 (2013).
74. X. Li, X. Sun, P. Carmeliet, Hallmarks of Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* **30**, 414–433 (2019).
75. M. M. Falk, Adherens junctions remain dynamic. *BMC Biol.* **8**, 2–5 (2010).
76. S. Karaman, V.-M. Leppänen, K. Alitalo, Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development.* **145**, 1–8 (2018).
77. A. R. Cantelmo, L.-C. Conradi, A. Brajic, J. Goveia, J. Kalucka, A. Pircher, P. Chaturvedi, J. Hol, B. Thienpont, L.-A. Teuwen, S. Schoors, B. Boeckx, J. Vriens, A. Kuchnio, K. Veys, B. Cruys, L. Finotto, L. Treps, T. E. Stav-Noraas, F. Bifari, P. Stapor, I. Decimo, K. Kampen, K. De Bock, G. Haraldsen, L. Schoonjans, T. Rabelink, G. Eelen, B. Ghesquière, J. Rehman, D. Lambrechts, A. B. Malik, M. Dewerchin, P. Carmeliet, Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell.* **30**, 968–985 (2016).
78. G. Eelen, P. de Zeeuw, L. Treps, U. Harjes, B. W. Wong, P. Carmeliet, Endothelial cell metabolism. *Physiol Rev.* **98**, 3–58 (2018).
79. D. Navaratna, P. G. McGuire, G. Menicucci, A. Das, Proteolytic Degradation of VE-Cadherin Alters the Blood-Retinal Barrier in Diabetes. *Diabetes.* **56**, 2380–2387 (2007).
80. P. Lertkiatmongkol, D. Liao, H. Mei, Y. Hu, P. J. Newman, Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* **23**, 253–259 (2016).
81. J. R. Privratsky, P. J. Newman, PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.* **355**, 607–619 (2014).
82. J. Sun, C. Paddock, J. Shubert, H. B. Zhang, K. Amin, P. J. Newman, S. M. Albelda, Contributions of the extracellular and cytoplasmic domains of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in regulating cell-cell localization. *J Cell Sci.* **113**, 1459–1469 (2000).
83. N. V. Goncharov, A. D. Nadeev, R. O. Jenkins, P. V. Avdonin, Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev.* **2017** (2017), doi:10.1155/2017/9759735.
84. M. E. Leblanc, K. L. Saez-Torres, I. Cano, Z. Hu, M. Saint-Geniez, Y. Ng, P. A. D'Amore, Glycocalyx regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity. *The FASEB Journal.* **33**, 9362–9373 (2019).

85. Z. Hu, I. Cano, K. L. Saez-Torres, M. E. LeBlanc, M. Saint-Geniez, Y.-S. Ng, P. Argüeso, P. A. D'Amore, Elements of the Endomucin Extracellular Domain Essential for VEGF-Induced VEGFR2 Activity. *Cells*. **9**, 1413 (2020).
86. D. H. Kong, Y. K. Kim, M. R. Kim, J. H. Jang, S. Lee, Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci*. **19**, 13–17 (2018).
87. Y. Zhao, A. A. Adjei, Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist*. **20**, 660–673 (2015).
88. E. Du, X. Li, S. He, X. Li, S. He, The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis. *Mol Biol Rep*. **47**, 4681–4690 (2020).
89. P. A. Galie, D.-H. T. Nguyen, C. K. Choi, D. M. Cohen, P. A. Janmey, C. S. Chen, Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111**, 7968–7973 (2014).
90. O. F. Khan, M. V. Sefton, Perfusion and characterization of an endothelial cell-seeded modular tissue engineered construct formed in a microfluidic remodeling chamber. *Biomaterials*. **31**, 8254–8261 (2010).
91. M. Kretschmer, D. Rüdiger, S. Zahler, Mechanical aspects of angiogenesis. *Cancers (Basel)*. **13** (2021), , doi:10.3390/cancers13194987.
92. R. Zhou, Q. Guo, Y. Xiao, Q. Guo, Y. Huang, C. Li, X. Luo, Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Res*. **9**, 25 (2021).
93. N. H. Hart, R. U. Newton, J. Tan, T. Rantalainen, P. Chivers, A. Siafarikas, S. Nimphius, Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. **20**, 347–371 (2020).
94. R. Florencio-Silva, G. R. da S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, P. S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. **2015**, 1–17 (2015).
95. S. Von Euw, Y. Wang, G. Laurent, C. Drouet, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs, Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Sci Rep*. **9**, 8456 (2019).
96. M. Murshed, Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **8**, a031229 (2018).
97. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*. **20**, 1013–1021 (2009).
98. A. M. Castillo-Paz, S. M. Londoño-Restrepo, L. Tirado-Mejía, M. A. Mondragón, M. E. Rodríguez-García, Nano to micro size transition of hydroxyapatite in porcine bone during heat treatment with low heating rates. *Progress in Natural Science: Materials International*. **30**, 494–501 (2020).
99. J. S. Kenkre, J. H. D. Bassett, *The bone remodelling cycle* (2018), vol. 55.
100. A. Thorfve, *Bone and Cartilage Regeneration Wnt Signaling Pathway in Healing* (2014).
101. B. Clarke, Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. **3**, S131–S139 (2008).
102. J. R. Dwek, The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol*. **39**, 319–323 (2010).
103. J. G. Betts, K. A. Young, J. A. Wise, E. Johnson, B. Poe, D. H. Kruse, O. Korol, J. E. Johnson, M. Womble, J. P. DeSaix, *Anatomy and Physiology 2e* (OpenStax, Houston, Texas , 2022).

104. C. Bergh, D. Wennergren, M. Möller, H. Brisby, Fracture incidence in adults in relation to age and gender: A study of 27,169 fractures in the Swedish Fracture Register in a well-defined catchment area. *PLoS One*. **15**, e0244291 (2020).
105. M. Ponzetti, N. Rucci, Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. **22**, 6651 (2021).
106. G. R. Beck, B. Zerler, E. Moran, Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**, 8352–8357 (2000).
107. J. Sodek, B. Ganss, M. D. McKee, Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. **11**, 279–303 (2000).
108. M. A. Chellaiah, N. Soga, S. Swanson, S. McAllister, U. Alvarez, D. Wang, S. F. Dowdy, K. A. Hruska, Rho-A Is Critical for Osteoclast Podosome Organization, Motility, and Bone Resorption. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 11993–12002 (2000).
109. C. M. Giachelli, S. Steitz, Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology*. **19**, 615–622 (2000).
110. M. A. Icer, M. Gezmen-Karadag, The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*. **59**, 17–24 (2018).
111. T. Komori, What is the function of osteocalcin? *J Oral Biosci*. **62** (2020), pp. 223–227.
112. M. L. Zoch, T. L. Clemens, R. C. Riddle, New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. **82**, 42–49 (2016).
113. V. Everts, J. M. Delaissié, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, W. Beertsen, The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. **17**, 77–90 (2002).
114. X. Li, Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris, D. Wu, Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 19883–19887 (2005).
115. J. Kim, T. Adachi, Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. **7**, 1–11 (2019).
116. N. Takahashi, N. Udagawa, T. Suda, A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*. **256**, 449–455 (1999).
117. H. Hsu, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H. L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X. Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B. Bass, W. J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 3540–3545 (1999).
118. T. J. Chambers, Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol*. **192**, 4–13 (2000).
119. M. Schoppet, K. T. Preissner, L. C. Hofbauer, RANK ligand and osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **22**, 549–553 (2002).
120. A. Hikita, I. Yana, H. Wakeyama, M. Nakamura, Y. Kadono, Y. Oshima, K. Nakamura, M. Seiki, S. Tanaka, Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- κ B ligand. *Journal of Biological Chemistry*. **281**, 36846–36855 (2006).

121. L. Lum, B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlöndorff, P. Tempst, Y. Choi, C. P. Blobel, Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *Journal of Biological Chemistry*. **274**, 13613–13618 (1999).
122. T. Nakashima, Y. Kobayashi, S. Yamasaki, A. Kawakami, K. Eguchi, H. Sasaki, H. Sakai, Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. **275**, 768–775 (2000).
123. T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga, K. Kurata, M. Oh-Hora, J. Q. Feng, L. F. Bonewald, T. Kodama, A. Wutz, E. F. Wagner, J. M. Penninger, H. Takayanagi, Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. **17**, 1231–1234 (2011).
124. J. Xiong, M. Onal, R. L. Jilka, R. S. Weinstein, S. C. Manolagas, C. A. O'Brien, Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. **17**, 1235–1241 (2011).
125. J. Xiong, M. Piemontese, M. Onal, J. Campbell, J. J. Goellner, V. Dusevich, L. Bonewald, S. C. Manolagas, C. A. O'Brien, Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One*. **10**, e0138189 (2015).
126. T. Ono, T. Nakashima, Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol*. **149**, 325–341 (2018).
127. S. C. Manolagas, Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev*. **21**, 115–137 (2000).
128. J. A. Gasser, M. Kneissel, "Bone Physiology and Biology" in *Bone Toxicology*, S. Y. Smith, A. Varela, R. Samadfam, Eds. (Springer International Publishing, Cham, 2017; <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56192-9>), *Molecular and Integrative Toxicology*, pp. 27–94.
129. D. G. Winkler, M. K. Sutherland, J. C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J. E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B. R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M. E. Brunkow, J. A. Latham, Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO Journal*. **22**, 6267–6276 (2003).
130. N. Kohli, S. Ho, S. J. Brown, P. Sawadkar, V. Sharma, M. Snow, E. García-Gareta, Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone*. **110**, 38–46 (2018).
131. J. A. Siddiqui, N. C. Partridge, Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*. **31**, 233–245 (2016).
132. P. J. Tebben, R. J. Singh, R. Kumar, Vitamin D-Mediated Hypercalcemia: Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Endocr Rev*. **37**, 521–547 (2016).
133. J. G. Taylor, D. A. Bushinsky, Calcium and Phosphorus Homeostasis. *Blood Purif*. **27**, 387–394 (2009).
134. D. Li, J. Liu, B. Guo, C. Liang, L. Dang, C. Lu, X. He, H. Y. S. Cheung, L. Xu, C. Lu, B. He, B. Liu, A. B. Shaikh, F. Li, L. Wang, Z. Yang, D. W. T. Au, S. Peng, Z. Zhang, B. T. Zhang, X. Pan, A. Qian, P. Shang, L. Xiao, B. Jiang, C. K. C. Wong, J. Xu, Z. Bian, Z. Liang, D. A. Guo, H. Zhu, W. Tan, A. Lu, G. Zhang, Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat Commun*. **7** (2016), doi:10.1038/ncomms10872.

135. K. Matsuoka, K. Park, M. Ito, K. Ikeda, S. Takeshita, Osteoclast-Derived Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*. **29**, 1522–1530 (2014).
136. W. Zou, H. Kitaura, J. Reeve, F. Long, V. L. J. Tybulewicz, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, Syk, c-Src, the $\alpha\beta3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *Journal of Cell Biology*. **176**, 877–888 (2007).
137. T. Izawa, W. Zou, J. C. Chappel, J. W. Ashley, X. Feng, S. L. Teitelbaum, c-Src Links a RANK/ $\alpha3$ Integrin Complex to the Osteoclast Cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. **32**, 2943–2953 (2012).
138. R. Faccio, S. L. Teitelbaum, K. Fujikawa, J. Chappel, A. Zallone, V. L. Tybulewicz, F. P. Ross, W. Swat, Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med*. **11**, 284–290 (2005).
139. A. Qin, T. S. Cheng, N. J. Pavlos, Z. Lin, K. R. Dai, M. H. Zheng, V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **44**, 1422–1435 (2012).
140. U. Kornak, D. Kasper, M. R. Bösl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, T. J. Jentsch, Loss of the ClC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell*. **104**, 205–215 (2001).
141. C. Thouverey, G. Bechkoff, S. Pikula, R. Buchet, Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles. *Osteoarthritis Cartilage*. **17**, 64–72 (2009).
142. A. P. Kusumbe, S. K. Ramasamy, R. H. Adams, Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. **507**, 323–328 (2014).
143. K. Hu, B. R. Olsen, Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Developmental Dynamics*. **246**, 227–234 (2017).
144. S. K. Ramasamy, A. P. Kusumbe, L. Wang, R. H. Adams, Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. **507**, 376–380 (2014).
145. R. E. Unger, A. Sartoris, K. Peters, A. Motta, C. Migliaresi, M. Kunkel, U. Bulnheim, J. Rychly, C. James Kirkpatrick, Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials*. **28**, 3965–3976 (2007).
146. J. Xue, S. V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. DeNardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M. R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T. C. Freeman, T. Ulas, J. L. Schultze, Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*. **40**, 274–288 (2014).
147. C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, A. M. Hill, M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*. **164**, 6166–6173 (2000).
148. K. Y. Lee, M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering*. **2**, 1–5 (2019).
149. Z. Chen, T. Klein, R. Z. Murray, R. Crawford, J. Chang, C. Wu, Y. Xiao, Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Materials Today*. **19**, 304–321 (2016).
150. S. Al-Maawi, A. Orłowska, R. Sader, C. James Kirkpatrick, S. Ghanaati, In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin Immunol*. **29**, 49–61 (2017).

151. J. Street, M. Bao, L. DeGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. Van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. D. Carano, E. H. Filvaroff, Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 9656–9661 (2002).
152. C. Wan, S. R. Gilbert, Y. Wang, X. Cao, X. Shen, G. Ramaswamy, K. A. Jacobsen, Z. S. Alaql, A. W. Eberhardt, L. C. Gerstenfeld, T. A. Einhorn, L. Deng, T. L. Clemens, Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105** (2008), pp. 686–691.
153. K. Hu, B. R. Olsen, The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone.* **91**, 30–38 (2016).
154. R. C. A. Sainson, D. A. Johnston, H. C. Chu, M. T. Holderfield, M. N. Nakatsu, S. P. Crampton, J. Davis, E. Conn, C. C. W. Hughes, TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood.* **111**, 4997–5007 (2008).
155. C. Colnot, Z. Thompson, T. Miclau, Z. Werb, J. A. Helms, Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* **130**, 4123–4133 (2003).
156. S. Stegen, N. van Gestel, G. Carmeliet, Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* **70**, 19–27 (2015).
157. K. L. Collins, E. M. Gates, C. L. Gilchrist, B. D. Hoffman, "Bio-Instructive Cues in Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering and Regenerative Medicine" in *Bio-Instructive Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Elsevier, 2017; <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012803394400001X>), pp. 3–35.
158. T. Bazin, A. Magnaudeix, R. Mayet, P. Carles, I. Julien, A. Demourgues, M. Gaudon, E. Champion, Sintering and biocompatibility of copper-doped hydroxyapatite bioceramics. *Ceram Int.* **47**, 13644–13654 (2021).
159. M. Palard, E. Champion, S. Foucaud, Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2-x$. *J Solid State Chem.* **181**, 1950–1960 (2008).
160. S. Weiner, W. Traub, H. D. Wagner, Lamellar Bone: Structure–Function Relations. *J Struct Biol.* **126**, 241–255 (1999).
161. R. Oftadeh, M. Perez-Viloria, J. C. Villa-Camacho, A. Vaziri, A. Nazarian, Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. *J Biomech Eng.* **137**, 1–15 (2015).
162. P. A. Janmey, D. A. Fletcher, C. A. Reinhart-King, Stiffness Sensing by Cells. *Physiol Rev.* **100**, 695–724 (2020).
163. E. A. Vogler, Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials.* **33**, 1201–1237 (2012).
164. D. R. Schmidt, H. Waldeck, W. J. Kao, "Protein Adsorption to Biomaterials" in *Biological Interactions on Materials Surfaces* (Springer US, New York, NY, 2009; http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-98161-1_1), pp. 1–18.
165. S. Spriano, V. Sarath Chandra, A. Cochis, F. Uberti, L. Rimondini, E. Bertone, A. Vitale, C. Scolaro, M. Ferrari, F. Cirisano, G. Gautier di Confienigo, S. Ferraris, How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Materials Science and Engineering C.* **74**, 542–555 (2017).
166. D. Yang, X. Lü, Y. Hong, T. Xi, D. Zhang, The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials. *Biomaterials.* **34**, 5747–5758 (2013).

167. G. L. Francis, Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*. **62**, 1–16 (2010).
168. G. Yohannes, S. K. Wiedmer, M. Elomaa, M. Jussila, V. Aseyev, M.-L. Riekkola, Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Anal Chim Acta*. **675**, 191–198 (2010).
169. E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher, S. Suzuki, E. Ruoslahti, Vitronectin—A major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Cell Res*. **160**, 245–258 (1985).
170. A. Stockmann, S. Hess, P. Declerck, R. Timpl, K. T. Preissner, Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 22874–22882 (1993).
171. J. Flournoy, S. Ashkanani, Y. Chen, Mechanical regulation of signal transduction in angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. **10** (2022), pp. 1–17.
172. Z. Li, W. Wang, X. Xu, K. Kratz, J. Zou, L. Lysyakova, M. Heuchel, A. Kurtz, M. Gossen, N. Ma, A. Lendlein, Integrin $\beta 1$ activation by micro-scale curvature promotes pro-angiogenic secretion of human mesenchymal stem cells. *J Mater Chem B*. **5**, 7415–7425 (2017).
173. L. S. Costanzo, Regulation of Calcium and Phosphate homeostasis. *Adv Physiol Educ*. **275**, S206-216 (1998).
174. R. Thakker, Calcium-sensing receptor: Role in health and disease. *Indian J Endocrinol Metab*. **16**, 213 (2012).
175. R. Schreckenber, K.-D. Schlüter, Calcium sensing receptor expression and signalling in cardiovascular physiology and disease. *Vascul Pharmacol*. **107**, 35–42 (2018).
176. M. Michalak, J. M. Robert Parker, M. Opas, Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. **32**, 269–278 (2002).
177. G. E. N. Kass, S. Orrenius, Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect*. **107**, 25–35 (1999).
178. L. F. Jaffe, Fast calcium waves. *Cell Calcium*. **48**, 102–113 (2010).
179. E. Carafoli, J. Krebs, Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *Journal of Biological Chemistry*. **291**, 20849–20857 (2016).
180. M. T. Swulius, M. N. Waxham, Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **65**, 2637–2657 (2008).
181. J. Humeau, J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, L. Nuñez, C. Villalobos, G. Kroemer, L. Senovilla, Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium*. **70**, 3–15 (2018).
182. A. Filippini, A. D'Amore, A. D'Alessio, Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions. *Int J Mol Sci*. **20**, 4525 (2019).
183. S. Li, H. Ning, Y. Ye, W. Wei, R. Guo, Q. Song, L. Liu, Y. Liu, L. Na, Y. Niu, X. Chu, R. Feng, N. Moustaid-Moussa, Y. Li, C. Sun, Increasing extracellular Ca^{2+} sensitizes TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via a TRPC1/ERK1/2/NF κ B-dependent pathway in human vascular endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1864**, 1566–1577 (2017).
184. C. Stähli, M. James-Bhasin, A. Hoppe, A. R. Boccaccini, S. N. Nazhat, Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass® on 3D endothelial cell morphogenesis. *Acta Biomater*. **19**, 15–22 (2015).
185. T. Sugimoto, M. Kanatani, J. Kano, H. Kaji, T. Tsukamoto, T. Yamaguchi, M. Fukase, K. Chihara, Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of

- osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. **8**, 1445–1452 (1993).
186. R. Aquino-Martínez, D. G. Monroe, F. Ventura, Calcium mimics the chemotactic effect of conditioned media and is an effective inducer of bone regeneration. *PLoS One*. **14**, 1–19 (2019).
 187. T. Yamaguchi, The calcium-sensing receptor in bone. *J Bone Miner Metab*. **26**, 301–311 (2008).
 188. A. M. C. Barradas, H. A. M. Fernandes, N. Groen, Y. C. Chai, J. Schrooten, J. van de Peppel, J. P. T. M. van Leeuwen, C. A. van Blitterswijk, J. de Boer, A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. **33**, 3205–3215 (2012).
 189. G.-Y. Jung, Y.-J. Park, J.-S. Han, Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. **21**, 1649–1654 (2010).
 190. R. Detsch, H. Mayr, G. Ziegler, Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater*. **4**, 139–148 (2008).
 191. A. Miyauchi, K. A. Hruska, E. M. Greenfield, R. Duncan, J. Alvarez, R. Barattolo, S. Colucci, A. Zamboni-Zallone, S. L. Teitelbaum, A. Teti, Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *Journal of Cell Biology*. **111**, 2543–2552 (1990).
 192. H. C. Blair, L. J. Robinson, C. L.-H. Huang, L. Sun, P. A. Friedman, P. H. Schlesinger, M. Zaidi, Calcium and bone disease. *BioFactors*. **37**, 159–167 (2011).
 193. K. Kritmetapak, R. Kumar, Phosphate as a Signaling Molecule. *Calcif Tissue Int*. **108**, 16–31 (2021).
 194. G. S. Di Marco, M. Hausberg, U. Hillebrand, P. Rustemeyer, W. Wittkowski, D. Lang, H. Pavenstädt, Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **294**, F1381–F1387 (2008).
 195. G. S. Di Marco, M. König, C. Stock, A. Wiesinger, U. Hillebrand, S. Reiermann, S. Reuter, S. Amler, G. Köhler, F. Buck, M. Fobker, P. Kümpers, H. Oberleithner, M. Hausberg, D. Lang, H. Pavenstädt, M. Brand, High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int*. **83**, 213–222 (2013).
 196. A. Peng, T. Wu, C. Zeng, D. Rakheja, J. Zhu, T. Ye, J. Hutcheson, N. D. Vaziri, Z. Liu, C. Mohan, X. J. Zhou, Adverse Effects of Simulated Hyper- and Hypo-Phosphatemia on Endothelial Cell Function and Viability. *PLoS One*. **6**, e23268 (2011).
 197. K. K. Stevens, L. Denby, R. K. Patel, P. B. Mark, S. Kettlewell, G. L. Smith, M. J. Clancy, C. Delles, A. G. Jardine, Deleterious effects of phosphate on vascular and endothelial function via disruption to the nitric oxide pathway. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **32**, gfw252 (2016).
 198. T. Michigami, K. Ozono, Roles of Phosphate in Skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **10**, 1–8 (2019).
 199. M. Kanatani, T. Sugimoto, J. Kano, M. Kanzawa, K. Chihara, Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol*. **196**, 180–189 (2003).
 200. X. Wang, Y. Yu, L. Ji, Z. Geng, J. Wang, C. Liu, Calcium phosphate-based materials regulate osteoclast-mediated osseointegration. *Bioact Mater*. **6**, 4517–4530 (2021).
 201. J. H. Kaplan, E. B. Maryon, How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. *Biophys J*. **110**, 7–13 (2016).

202. R. B. Rucker, H. E. Parker, J. C. Rogler, Effect of Copper Deficiency on Chick Bone Collagen and Selected Bone Enzymes. *J Nutr.* **98**, 57–63 (1969).
203. X. Qu, Z. He, H. Qiao, Z. Zhai, Z. Mao, Z. Yu, K. Dai, Serum copper levels are associated with bone mineral density and total fracture. *J Orthop Translat.* **14**, 34–44 (2018).
204. M. C. Linder, Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics.* **8**, 887–905 (2016).
205. R. Dortwegt, E. V. Maughan, The chemistry of copper in water and related studies planned at the advanced photon source. *Proceedings of the IEEE Particle Accelerator Conference.* **2**, 1456–1458 (2001).
206. J. Liu, Z. Liu, W. Wang, Y. Tian, Real-time Tracking and Sensing of Cu⁺ and Cu²⁺ with a Single SERS Probe in the Live Brain: Toward Understanding Why Copper Ions Were Increased upon Ischemia. *Angewandte Chemie International Edition.* **60**, 21351–21359 (2021).
207. T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O'Halloran, Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science (1979).* **284**, 805–808 (1999).
208. L. A. Finney, T. V. O'Halloran, Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science (1979).* **300**, 931–936 (2003).
209. B. Zhou, J. Gitschier, hCTR1 : A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **94**, 7481–7486 (1997).
210. J. Chen, Y. Jiang, H. Shi, Y. Peng, X. Fan, C. Li, The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflugers Arch.* **472**, 1415–1429 (2020).
211. D. Dong, B. Wang, W. Yin, X. Ding, J. Yu, Y. J. Kang, Disturbance of Copper Homeostasis Is a Mechanism for Homocysteine-Induced Vascular Endothelial Cell Injury. *PLoS One.* **8**, 1–9 (2013).
212. L. Gaetke, Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* **189**, 147–163 (2003).
213. M. P. Cervantes-Cervantes, J. V. Calderón-Salinas, A. Albores, J. L. Muñoz-Sánchez, Copper Increases the Damage to DNA and Proteins Caused by Reactive Oxygen Species. *Biol Trace Elem Res.* **103**, 229–248 (2005).
214. G. Starkebaum, J. M. Harlan, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *Journal of Clinical Investigation.* **77**, 1370–1376 (1986).
215. B. R. McAuslan, W. Reilly, Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions. *Exp Cell Res.* **130**, 147–157 (1980).
216. P. M. Gullino, M. Ziche, G. Alessandri, Gangliosides, copper ions and angiogenic capacity of adult tissues. *CANCER AND METASTASIS REVIEW.* **9**, 239–251 (1990).
217. K. Li, C. Xia, Y. Qiao, X. Liu, Dose-response relationships between copper and its biocompatibility/antibacterial activities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* **55**, 127–135 (2019).
218. Z. Lin, Y. Cao, J. Zou, F. Zhu, Y. Gao, X. Zheng, H. Wang, T. Zhang, T. Wu, Improved osteogenesis and angiogenesis of a novel copper ions doped calcium phosphate cement. *Materials Science and Engineering: C.* **114**, 111032 (2020).
219. F. Martin, T. Linden, D. M. Katschinski, F. Oehme, I. Flamme, C. K. Mukhopadhyay, K. Eckhardt, J. Tröger, S. Barth, G. Camenisch, R. H. Wenger, Copper-dependent

- activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*. **105**, 4613–4619 (2005).
220. A. Chiarugi, G. M. Pitari, R. Costa, M. Ferrante, L. Villari, M. Amico-Roxas, T. Godfraind, A. Bianchi, S. Salomone, Effect of prolonged incubation with copper on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. **136**, 1185–1193 (2002).
 221. Q. Huang, Z. Ouyang, Y. Tan, H. Wu, Y. Liu, Activating macrophages for enhanced osteogenic and bactericidal performance by Cu ion release from micro/nano-topographical coating on a titanium substrate. *Acta Biomater*. **100**, 415–426 (2019).
 222. E. J. Ryan, A. J. Ryan, A. González-Vázquez, A. Philippart, F. E. Ciraldo, C. Hobbs, V. Nicolosi, A. R. Boccaccini, C. J. Kearney, F. J. O'Brien, Collagen scaffolds functionalised with copper-eluting bioactive glass reduce infection and enhance osteogenesis and angiogenesis both in vitro and in vivo. *Biomaterials*. **197**, 405–416 (2019).
 223. A. Bernhardt, M. Schamel, U. Gbureck, M. Gelinsky, Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} incorporated into calcium phosphate bone cements. *PLoS One*. **12**, e0182109 (2017).
 224. N. M. Lowe, W. D. Fraser, M. J. Jackson, Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proceedings of the Nutrition Society*. **61**, 181–185 (2002).
 225. W. Moehl, A. Schweiger, H. Motschi, Modes of phosphate binding to copper(II): investigations of the electron spin echo envelope modulation of complexes on surfaces and in solutions. *Inorg Chem*. **29**, 1536–1543 (1990).
 226. E. M. Carlisle, Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcif Tissue Int*. **33**, 27–34 (1981).
 227. E. M. Carlisle, Silicon as an essential trace element in animal nutrition. *Ciba Found Symp*. **121**, 123–39 (1986).
 228. F. H. Nielsen, Update on the possible nutritional importance of silicon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **28**, 379–382 (2014).
 229. D. J. Belton, O. Deschaume, C. C. Perry, An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. *FEBS Journal*. **279**, 1710–1720 (2012).
 230. Ž. Mladenović, A. Johansson, B. Willman, K. Shahabi, E. Björn, M. Ransjö, Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta Biomater*. **10**, 406–418 (2014).
 231. K. Dashnyam, G.-Z. Jin, J.-H. Kim, R. Perez, J.-H. Jang, H.-W. Kim, Promoting angiogenesis with mesoporous microcarriers through a synergistic action of delivered silicon ion and VEGF. *Biomaterials*. **116**, 145–157 (2017).
 232. L. Bai, R. Wu, Y. Wang, X. Wang, X. Zhang, X. Huang, L. Qin, R. Hang, L. Zhao, B. Tang, Osteogenic and angiogenic activities of silicon-incorporated TiO₂ nanotube arrays. *J Mater Chem B*. **4**, 5548–5559 (2016).
 233. S. Vahabzadeh, M. Roy, S. Bose, Effects of silicon on osteoclast cell mediated degradation, in vivo osteogenesis and vasculogenesis of brushite cement. *J Mater Chem B*. **3**, 8973–8982 (2015).
 234. K. Dashnyam, A. El-Fiqi, J. O. Buitrago, R. A. Perez, J. C. Knowles, H. W. Kim, A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *J Tissue Eng*. **8** (2017), doi:10.1177/2041731417707339.

235. H. Li, J. Chang, Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. *Acta Biomater.* **9**, 6981–6991 (2013).
236. K. A. Hing, P. A. Revell, N. Smith, T. Buckland, Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials.* **27**, 5014–5026 (2006).
237. E.-J. Kim, S.-Y. Bu, M.-K. Sung, M.-K. Choi, Effects of Silicon on Osteoblast Activity and Bone Mineralization of MC3T3-E1 Cells. *Biol Trace Elem Res.* **152**, 105–112 (2013).
238. D. M. Reffitt, N. Ogston, R. Jugdaohsingh, H. F. J. Cheung, B. A. J. Evans, R. P. H. Thompson, J. J. Powell, G. N. Hampson, Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone.* **32**, 127–135 (2003).
239. X. Zhou, F. M. Moussa, S. Mankoci, P. Ustriyana, N. Zhang, S. Abdelmagid, J. Molenda, W. L. Murphy, F. F. Safadi, N. Sahai, Orthosilicic acid, Si(OH)₄, stimulates osteoblast differentiation in vitro by upregulating miR-146a to antagonize NF-κB activation. *Acta Biomater.* **39**, 192–202 (2016).
240. R. J. Friederichs, R. A. Brooks, M. Ueda, S. M. Best, In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A.* **103**, 3312–3322 (2015).
241. A. M. Pietak, J. W. Reid, M. J. Stott, M. Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* **28**, 4023–4032 (2007).
242. H. C. Schröder, X. H. Wang, M. Wiens, B. Diehl-Seifert, K. Kropf, U. Schloßmacher, W. E. G. Müller, Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): Inhibition of osteoclast growth and differentiation. *J Cell Biochem.* **113**, 3197–3206 (2012).
243. M. Wiens, X. Wang, H. C. Schröder, U. Kolb, U. Schloßmacher, H. Ushijima, W. E. G. Müller, The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials.* **31**, 7716–7725 (2010).
244. S. Gomes, C. Vichery, S. Descamps, H. Martinez, A. Kaur, A. Jacobs, J.-M. Nedelec, G. Renaudin, Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity. *Acta Biomater.* **65**, 462–474 (2018).
245. A. Jacobs, G. Renaudin, N. Charbonnel, J.-M. Nedelec, C. Forestier, S. Descamps, Copper-Doped Biphasic Calcium Phosphate Powders: Dopant Release, Cytotoxicity and Antibacterial Properties. *Materials.* **14**, 2393 (2021).
246. Y. Li, J. Ho, C. P. Ooi, Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles. *Materials Science and Engineering C.* **30**, 1137–1144 (2010).
247. A. Elrayah, W. Zhi, S. Feng, S. Al-Ezzi, H. Lei, J. Weng, Preparation of Micro/Nano-Structure Copper-Substituted Hydroxyapatite Scaffolds with Improved Angiogenesis Capacity for Bone Regeneration. *Materials.* **11**, 1516 (2018).
248. P. Mou, H. Peng, L. Zhou, L. Li, H. Li, Q. Huang, A novel composite scaffold of Cu-doped nano calcium-deficient hydroxyapatite/multi-(amino acid) copolymer for bone tissue regeneration. *Int J Nanomedicine.* **Volume 14**, 3331–3343 (2019).
249. Y. O. Nikitina, N. V. Petrakova, A. A. Ashmarin, D. D. Titov, S. V. Shevtsov, T. N. Penkina, E. A. Kuvshinova, S. M. Barinov, V. S. Komlev, N. S. Sergeeva, Preparation and Properties of Copper-Substituted Hydroxyapatite Powders and Ceramics. *Inorganic Materials.* **55**, 1061–1067 (2019).

250. N. Patel, S. M. Best, W. Bonfield, I. R. Gibson, K. A. Hing, E. Damien, P. A. Revell, A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med.* **13**, 1199–206 (2002).
251. C. M. Botelho, R. A. Brooks, S. M. Best, M. A. Lopes, J. D. Santos, N. Rushton, W. Bonfield, Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A.* **79A**, 723–730 (2006).
252. A. Aminian, M. Solati-Hashjin, A. Samadikuchaksaraei, F. Bakhshi, F. Gorjipour, A. Farzadi, F. Moztarzadeh, M. Schmücker, Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources. *Ceram Int.* **37**, 1219–1229 (2011).
253. T. Sun, M. Wang, Y. Shao, L. Wang, Y. Zhu, The Effect and Osteoblast Signaling Response of Trace Silicon Doping Hydroxyapatite. *Biol Trace Elem Res.* **181**, 82–94 (2018).
254. X. Fu, P. Liu, D. Zhao, B. Yuan, Z. Xiao, Y. Zhou, X. Yang, X. Zhu, C. Tu, X. Zhang, Effects of Nanotopography Regulation and Silicon Doping on Angiogenic and Osteogenic Activities of Hydroxyapatite Coating on Titanium Implant. *Int J Nanomedicine.* **Volume 15**, 4171–4189 (2020).
255. T. BAZIN, SYNTHÈSE, CARACTÉRISATIONS STRUCTURALES PAR SPECTROSCOPIES ET MISE EN FORME D’HYDROXYAPATITES DOPÉES AU CUIVRE OU AU FER. *UNIVERSITÉ DE BORDEAUX* (2020) (available at <https://www.theses.fr/2020BORD0118>).
256. M. Palard, J. Combes, E. Champion, S. Foucaud, A. Rattner, D. Bernache-Assollant, Effect of silicon content on the sintering and biological behaviour of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ceramics. *Acta Biomater.* **5**, 1223–1232 (2009).
257. M. PALARD, “SYNTHÈSE ET FRITTAGE D’HYDROXYAPATITES PHOSPHOCALCIQUES SILICATEES” (2007), (available at <https://www.theses.fr/129509590>).
258. A. Magnaudeix, Calcium phosphate bioceramics: From cell behavior to chemical-physical properties. *Frontiers in Biomaterials Science.* **1** (2022), doi:10.3389/fbiom.2022.942104.
259. S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials.* **23**, 1065–1072 (2002).
260. ISO/TC 150/SC 1 Matériaux, ISO 13779-3:2018 Implants chirurgicaux — Hydroxyapatite — Partie 3: Analyse chimique et caractérisation du rapport de cristallinité et de la pureté de phase (2018).
261. D. Marchat, M. Zymelka, C. Coelho, L. Gremillard, L. Joly-pottuz, F. Babonneau, C. Esnouf, J. Chevalier, D. Bernache-assollant, Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. *Acta Biomater.* **9**, 6992–7004 (2013).
262. P. Greer, J. Haigh, G. Mbamalu, W. Khoo, A. Bernstein, T. Pawson², “The Fps/Fes Protein-Tyrosine Kinase Promotes Angiogenesis in Transgenic Mice” (1994).
263. L. S. Lu, S. J. Wang, R. Auerbach, In vitro and in vivo differentiation into B cells, T cells, and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded > 100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 14782–14787 (1996).

264. S. J. Wang, P. Greer, R. Auerbach, Isolation and propagation of yolk-sac-derived endothelial cells from a hypervascular transgenic mouse expressing a gain-of-function *fps/fes* proto-oncogene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **32**, 292–299 (1996).
265. P. Greer, J. Haigh, G. Mbamalu, W. Khoo, A. Bernstein, T. Pawson, The *Fps/Fes* protein-tyrosine kinase promotes angiogenesis in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* **14**, 6755–6763 (1994).
266. P. Greer, Closing in on the biological functions of *fps/fes* and *fer*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 278–289 (2002).
267. H. Kodama, Y. Amagai, H. Sudo, S. Kasai, S. Yamamoto, Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Japanese Journal of Oral Biology.* **23**, 899–901 (1981).
268. D. Wang, K. Christensen, K. Chawla, G. Xiao, P. H. Krebsbach, R. T. Franceschi, Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Vivo Differentiation / Mineralization Potential. *Journal of Bone and Mineral Research.* **14**, 893–903 (1999).
269. H. Itohiya, Y. Matsushima, S. Shirakawa, S. Kajiyama, A. Yashima, T. Nagano, K. Gomi, Organic resolution function and effects of platinum nanoparticles on bacteria and organic matter. *PLoS One.* **14**, e0222634 (2019).
270. M.-M. Germaini, R. Detsch, A. Grünwald, A. Magnaudeix, F. Lalloue, A. R. Boccaccini, E. Champion, Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. *Biomedical Materials.* **12**, 035008 (2017).
271. A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, D. R. Barreda, Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, 3–6 (2011).
272. S. M. J. Morse, G. Shaw, S. F. Larner, Concurrent mRNA and protein extraction from the same experimental sample using a commercially available column-based RNA preparation kit. *Biotechniques.* **40**, 54–58 (2006).
273. U. Schmidt, M. Weigert, C. Broaddus, G. Myers, "Cell Detection with Star-Convex Polygons" in *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* (Springer International Publishing, 2018; http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30), vol. 11071 LNCS, pp. 265–273.
274. E. Champion, Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* **9**, 5855–5875 (2013).
275. X. D. Zhu, H. S. Fan, Y. M. Xiao, D. X. Li, H. J. Zhang, T. Luxbacher, X. D. Zhang, Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* **5**, 1311–1318 (2009).
276. K. Lin, L. Xia, J. Gan, Z. Zhang, H. Chen, X. Jiang, J. Chang, Tailoring the Nanostructured Surfaces of Hydroxyapatite Bioceramics to Promote Protein Adsorption, Osteoblast Growth, and Osteogenic Differentiation. *ACS Appl Mater Interfaces.* **5**, 8008–8017 (2013).
277. M. Lasgorceix, A. M. Costa, E. Mavropoulos, M. Sader, M. Calasans, M. N. Tanaka, A. Rossi, C. Damia, R. Chotard-Ghodsnia, E. Champion, In vitro and in vivo evaluation of silicated hydroxyapatite and impact of insulin adsorption. *J Mater Sci Mater Med.* **25**, 2383–2393 (2014).
278. K.-A. Norton, A. S. Popel, Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Sci Rep.* **6**, 36992 (2016).

279. A. Hartsock, W. J. Nelson, Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1778**, 660–669 (2008).
280. C. A. Staton, M. W. R. Reed, N. J. Brown, A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*. **90**, 195–221 (2009).
281. S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, A. Samali, Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int J Cell Biol*. **2010**, 1–23 (2010).
282. F. Re, A. Zanetti, M. Sironi, N. Polentarutti, L. Lanfranccone, E. Dejana, F. Colotta, Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. **127**, 537–546 (1994).
283. A. Cai, C. Chatziantoniou, A. Calmont, Vascular Permeability: Regulation Pathways and Role in Kidney Diseases. *Nephron*. **145**, 297–310 (2021).
284. H. Schnittler, M. Taha, M. O. Schnittler, A. A. Taha, N. Lindemann, J. Seebach, Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell Tissue Res*. **355**, 529–543 (2014).
285. S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. **35**, 495–516 (2007).
286. M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. **22**, 12827 (2021).
287. S. Wang, H. Yu, J. K. Wickliffe, Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*. **25**, 2147–2151 (2011).
288. D. Ribatti, A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp Cell Res*. **359**, 17–19 (2017).
289. C. M. LeVea, J. E. Reeder, R. A. Mooney, EGF-dependent cell cycle progression is controlled by density-dependent regulation of Akt activation. *Exp Cell Res*. **297**, 272–284 (2004).
290. G. Bazzoni, E. Dejana, Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. **84**, 869–901 (2004).
291. N. Abbasian, A. Bevington, J. O. Burton, K. E. Herbert, A. H. Goodall, N. J. Brunskill, Inorganic Phosphate (Pi) Signaling in Endothelial Cells: A Molecular Basis for Generation of Endothelial Microvesicles in Uraemic Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. **21**, 6993 (2020).
292. F. Yu, H. Kamada, K. Niizuma, H. Endo, P. H. Chan, Induction of MMP-9 Expression and Endothelial Injury by Oxidative Stress after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. **25**, 184–195 (2008).
293. M. M. Zhu, Y. Ma, M. Tang, L. Pan, W. L. Liu, Hypoxia-induced upregulation of matrix metalloproteinase 9 increases basement membrane degradation by downregulating collagen type IV alpha 1 chain. *Physiol Res* (2022) (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36281728>).
294. M. G. Lampugnani, A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T. O. Daniel, E. Dejana, Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *Journal of Cell Biology*. **161**, 793–804 (2003).
295. A. R. Collins, Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1840**, 794–800 (2014).

296. I. Ceballos-Picot, V. Witko-Sarsat, M. Merad-Boudia, A. T. Nguyen, M. Thévenin, M. C. Jaudon, J. Zingraff, C. Verger, P. Jingers, B. Descamps-Latscha, Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* **21**, 845–853 (1996).
297. D. Del Rio, A. J. Stewart, N. Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* **15**, 316–328 (2005).
298. M. Grellier, L. Bordenave, J. Amédée, Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **27**, 562–571 (2009).
299. A. N. Stratman, A. E. Schwindt, K. M. Malotte, G. E. Davis, Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood.* **116**, 4720–4730 (2010).
300. S. A. Eming, T. Krieg, Molecular Mechanisms of VEGF-A Action during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* **11**, 79–86 (2006).
301. J. Kleinheinz, S. Jung, K. Wermker, C. Fischer, U. Joos, Release kinetics of VEGF165 from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model. *Head Face Med.* **6**, 17 (2010).
302. A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein. *Front Physiol.* **5** (2014), doi:10.3389/fphys.2014.00299.
303. R. E. Kontermann, Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol.* **22**, 868–876 (2011).
304. Y. Cao, H. Chen, L. Zhou, M. K. Chiaug, B. Anand-Apte, J. A. Weatherbee, Y. Wang, F. Fang, J. G. Flanagan, M. L. S. Tsang, Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor: Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry.* **271**, 3154–3162 (1996).
305. M. L. Guzmán-Hernández, G. Potter, K. Egervári, J. Z. Kiss, T. Balla, Secretion of VEGF-165 has unique characteristics, including shedding from the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* **25**, 1061–1072 (2014).
306. V. Manickam, A. Tiwari, J. J. Jung, R. Bhattacharya, A. Goel, D. Mukhopadhyay, A. Choudhury, Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 trafficking and angiogenesis by Golgi localized t-SNARE syntaxin 6. *Blood.* **117**, 1425–1435 (2011).
307. M. Hollborn, C. Stathopoulos, A. Steffen, P. Wiedemann, L. Kohen, A. Bringmann, Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48**, 4360–4367 (2007).
308. H. Wang, J. A. Keiser, “Vascular Endothelial Growth Factor Upregulates the Expression of Matrix Metalloproteinases in Vascular Smooth Muscle Cells Role of flt-1” (1998), (available at <http://ahajournals.org>).
309. S. Hiratsuka, K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J. M. Shipley, R. M. Senior, M. Shibuya, MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* **2**, 289–300 (2002).
310. D. Feng, J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, A. M. Dvorak, “Ultrastructural Localization of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1, CD31) in Vascular Endothelium” (2004), (available at <http://www.jhc.org>).

311. J. Fels, P. Jeggle, K. Kusche-Vihrog, H. Oberleithner, Cortical Actin Nanodynamics Determines Nitric Oxide Release in Vascular Endothelium. *PLoS One*. **7**, e41520 (2012).
312. J. Shen, P. T. Griffiths, S. J. Campbell, B. Uttinger, M. Kalberer, S. E. Paulson, Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants. *Sci Rep*. **11**, 7417 (2021).
313. A. M. Pickering, L. Vojtovich, J. Tower, K. J. A Davies, Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. *Free Radic Biol Med*. **55**, 109–18 (2013).
314. J. P. Dales, N. Beaufils, M. Silvy, C. Picard, V. Pauly, V. Pradel, C. Formisano-Tréziny, P. Bonnier, S. Giusiano, C. Charpin, J. Gabert, Hypoxia inducible factor 1 α gene (HIF-1 α) splice variants: Potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Med*. **8** (2010), doi:10.1186/1741-7015-8-44.
315. A. Bateman, M. J. Martin, S. Orchard, M. Magrane, S. Ahmad, E. Alpi, E. H. Bowler-Barnett, R. Britto, H. Bye-A-Jee, A. Cukura, P. Denny, T. Dogan, T. G. Ebenezer, J. Fan, P. Garmiri, L. J. da Costa Gonzales, E. Hatton-Ellis, A. Hussein, A. Ignatchenko, G. Insana, R. Ishtiaq, V. Joshi, D. Jyothi, S. Kandasamy, A. Lock, A. Luciani, M. Lugaric, J. Luo, Y. Lussi, A. MacDougall, F. Madeira, M. Mahmoudy, A. Mishra, K. Moulang, A. Nightingale, S. Pundir, G. Qi, S. Raj, P. Raposo, D. L. Rice, R. Saidi, R. Santos, E. Speretta, J. Stephenson, P. Totoo, E. Turner, N. Tyagi, P. Vasudev, K. Warner, X. Watkins, R. Zaru, H. Zellner, A. J. Bridge, L. Aimo, G. Argoud-Puy, A. H. Auchincloss, K. B. Axelsen, P. Bansal, D. Baratin, T. M. Batista Neto, M. C. Blatter, J. T. Bolleman, E. Boutet, L. Breuza, B. C. Gil, C. Casals-Casas, K. C. Echioukh, E. Coudert, B. Cuche, E. de Castro, A. Estreicher, M. L. Famiglietti, M. Feuermann, E. Gasteiger, P. Gaudet, S. Gehant, V. Gerritsen, A. Gos, N. Gruaz, C. Hulo, N. Hyka-Nouspikel, F. Jungo, A. Kerhornou, P. Le Mercier, D. Lieberherr, P. Masson, A. Morgat, V. Muthukrishnan, S. Paesano, I. Pedruzzi, S. Pilbout, L. Pourcel, S. Poux, M. Pozzato, M. Pruess, N. Redaschi, C. Rivoire, C. J. A. Sigrist, K. Sonesson, S. Sundaram, C. H. Wu, C. N. Arighi, L. Arminski, C. Chen, Y. Chen, H. Huang, K. Laiho, P. McGarvey, D. A. Natale, K. Ross, C. R. Vinayaka, Q. Wang, Y. Wang, J. Zhang, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. **51**, D523–D531 (2023).
316. A. Zimna, M. Kurpisz, Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res Int*. **2015** (2015), , doi:10.1155/2015/549412.
317. H. Zhong, A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza, J. W. Simons, Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. **59**, 5830–5 (1999).
318. A. J. Lakhter, T. Lahm, H. E. Broxmeyer, S. R. Naidu, Golgi Associated HIF1 α Serves as a Reserve in Melanoma Cells. *J Cell Biochem*. **117**, 853–859 (2016).
319. P. Davalli, T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola, D. D'Arca, ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. **2016**, 1–18 (2016).
320. R. Depping, A. Steinhoff, S. G. Schindler, B. Friedrich, R. Fagerlund, E. Metzen, E. Hartmann, M. Köhler, Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1783**, 394–404 (2008).

321. W. Dröge, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* **82**, 47–95 (2002).
322. L. Miao, D. K. St. Clair, Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med.* **47**, 344–356 (2009).
323. M. Valko, K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuča, K. Musílek, Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* **90**, 1–37 (2016).
324. M. F. Walter, R. F. Jacob, R. E. Bjork, B. Jeffers, J. Buch, Y. Mizuno, R. P. Mason, Circulating Lipid Hydroperoxides Predict Cardiovascular Events in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* **51**, 1196–1202 (2008).
325. K. Oettl, R. E. Stauber, Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol.* **151**, 580–590 (2007).
326. D. Barnes, G. Sato, Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.* **22**, 649–655 (1980).
327. S. Gebicki, J. M. Gebicki, Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochemical Journal.* **289**, 743–749 (1993).
328. P. L. Else, The highly unnatural fatty acid profile of cells in culture. *Prog Lipid Res.* **77**, 101017 (2020).
329. L. Macomber, J. A. Imlay, The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **106**, 8344–8349 (2009).
330. Y.-P. Yu, P. Lei, J. Hu, W.-H. Wu, Y.-F. Zhao, Y.-M. Li, Copper-induced cytotoxicity: reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation. *Chemical Communications.* **46**, 6909 (2010).
331. G.-H. Fong, K. Takeda, Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.* **15**, 635–641 (2008).
332. E. Bosch-Ru e, L. Díez-Tercero, R. Rodríguez-González, B. M. Bosch-Canals, R. A. Perez, Assessing the potential role of copper and cobalt in stimulating angiogenesis for tissue regeneration. *PLoS One.* **16**, e0259125 (2021).
333. W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou, Y. J. Kang, Copper Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity. *Mol Pharmacol.* **75**, 174–182 (2009).
334. A. S. Kinsela, A. M. Jones, M. W. Bligh, A. N. Pham, R. N. Collins, J. J. Harrison, K. L. Wilsher, T. E. Payne, T. D. Waite, Influence of Dissolved Silicate on Rates of Fe(II) Oxidation. *Environ Sci Technol.* **50**, 11663–11671 (2016).
335. S. Sjöberg, Silica in aqueous environments. *J Non Cryst Solids.* **196**, 51–57 (1996).
336. Z. Wu, W. Zhang, Y. J. Kang, Copper affects the binding of HIF-1 α to the critical motifs of its target genes. *Metallomics.* **11**, 429–438 (2019).
337. S. Kulanthaivel, B. Roy, T. Agarwal, S. Giri, K. Pramanik, K. Pal, S. S. Ray, T. K. Maiti, I. Banerjee, Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C.* **58**, 648–658 (2016).
338. M. Israelowitz, B. Weyand, S. Rizvi, P. Vogt, H. von Schroeder, Development of a Laminar Flow Bioreactor by Computational Fluid Dynamics. *J Healthc Eng.* **3**, 455–476 (2012).
339. R. M. H. Rumney, A. Sunters, G. C. Reilly, A. Gartland, Application of multiple forms of mechanical loading to human osteoblasts reveals increased ATP release in response to fluid flow in 3D cultures and differential regulation of immediate early genes. *J Biomech.* **45**, 549–554 (2012).

340. S. Kapur, D. J. Baylink, K. H. W. Lau, Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone*. **32**, 241–251 (2003).
341. M. Rumpler, A. Woesz, J. W. C. Dunlop, J. T. van Dongen, P. Fratzl, The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface*. **5**, 1173–1180 (2008).
342. U. Rüdrieh, M. Lasgorceix, E. Champion, P. Pascaud-Mathieu, C. Damia, T. Chartier, J. Brie, A. Magnaudeix, Pre-osteoblast cell colonization of porous silicon substituted hydroxyapatite bioceramics: Influence of microporosity and macropore design. *Materials Science and Engineering: C*. **97**, 510–528 (2019).
343. L. A. Dyer, X. Pi, C. Patterson, The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. **25**, 472–480 (2014).
344. D. Halloran, H. W. Durbano, A. Nohe, Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol*. **8**, 19 (2020).
345. F. Villars, B. Guillotin, T. Amédée, S. Dutoya, L. Bordenave, R. Bareille, J. Amédée, Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **282**, C775–C785 (2002).
346. Molecular Probes, Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Other Metal Ions. *The Molecular Probes @ Handbook* (2010).
347. F. Miles, J. Lynch, R. Sikes, Cell-based assays using calcein acetoxymethyl ester show variation in fluorescence with treatment conditions. *J Biol Methods*. **2**, e29 (2015).
348. S. Cuylen, C. Blaukopf, A. Z. Politi, T. Müller-Reichert, B. Neumann, I. Poser, J. Ellenberg, A. A. Hyman, D. W. Gerlich, Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. **535**, 308–312 (2016).
349. T. Scholzen, J. Gerdes, The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. **182**, 311–322 (2000).
350. I. Miller, M. Min, C. Yang, C. Tian, S. Gookin, D. Carter, S. L. Spencer, Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep*. **24**, 1105-1112.e5 (2018).

Annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1. Etudes biologiques non adaptées à la caractérisation des matériaux..... | 253 |
| Annexe 1.1. Mesure de la viabilité cellulaire par incorporation de la calcéine | 253 |
| Annexe 1.2. Evaluation du taux de fermeture de blessure sur pastille | 254 |
| Annexe 1.3. Mesure de la prolifération cellulaire par suivi du signal de Ki67 | 255 |

Annexe 1. Etudes biologiques non adaptées à la caractérisation des matériaux

Du fait des paramètres physiques et de l'environnement chimique des pastilles utilisées dans les caractérisations biologiques, certaines techniques courantes en biologie perdent en fiabilité et ne devraient pas être utilisées pour de futures caractérisations biologiques en conditions similaires.

Annexe 1.1. Mesure de la viabilité cellulaire par incorporation de la calcéine

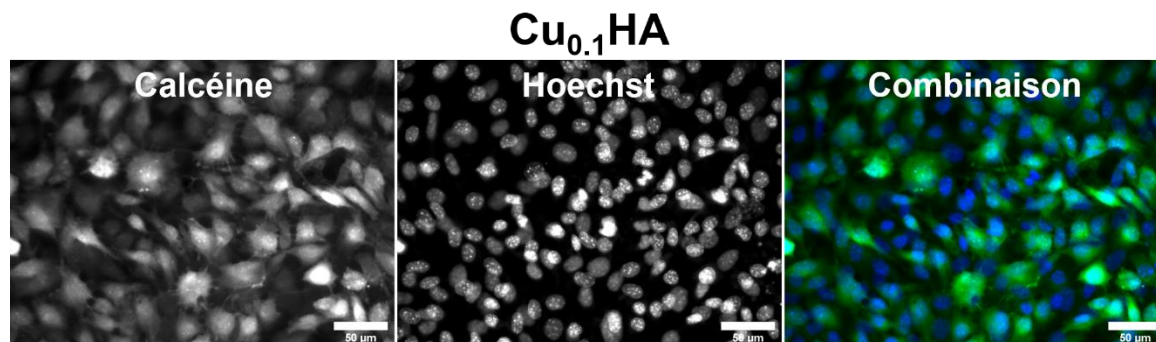


Figure 91 : Illustration du marquage calcéine de C166 cultivées à la surface de Cu_{0,1}HA après 4 jours de culture

Calcéine : molécule fluorescente en présence d'estérase, signe de la viabilité des cellules ; Hoechst 33342 : noyaux. Combinaison : superposition de la calcéine et du Hoechst 33342. Grossissement final 400X. Barre d'échelle = 50 µm

Lorsqu'une population de C166 atteint une densité cellulaire où les cellules se superposent (Figure 91), la calcéine est peu adaptée à l'estimation de la viabilité en raison du chevauchement entre les cellules. Pour rappel, les cellules mortes marquées à la calcéine n'émettent plus de fluorescence or cette absence d'émission est non discernable au milieu de l'émission des cellules viables. De plus, la calcéine est une molécule dont la fluorescence est partiellement inhibée par un phénomène de quenching exercé par de nombreux ions métalliques, et parmi ceux-ci le cuivre Cu²⁺ en est un fort inhibiteur (346). Des données sur la calcéine Red Orange n'ont pas été trouvées mais ce phénomène a été observé dans les expériences de cette thèse. Par conséquent, il a été nécessaire avant les observations de chélater ces ions Cu²⁺ à l'aide d'un traitement à l'EDTA. Cependant, malgré ces traitements, les observations réalisées sur Cu_xHA ont nécessité des temps d'exposition très supérieurs (5 à 10 fois plus longtemps selon les observations) à ceux utilisés pour visualiser la calcéine RO sur HA et Si_{0,4}HA pour obtenir un signal similaire. Ceci altère la qualité des observations et rend les comparaisons difficiles. De plus, même en condition physiologique toutes les cellules marquées à la Calcéine n'ont pas la même intensité de fluorescence. En présence d'ions métalliques certaines de ces cellules peu marquées ont une fluorescence comparable au bruit de fond sans qu'elles ne soient plus viables.

L'utilisation de la calcéine comme indicateur à forte densité cellulaire et en présence de certains ions à savoir Mn²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺ et Cu²⁺ (300) n'est pas recommandé. Son utilisation pour le suivi de population cellulaire doit être faite en prenant en compte d'autres limitations, notamment la diminution progressive de l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence n'est pas identique entre différentes lignées cellulaires ce qui peut rendre son utilisation complexe en cas de coculture (347).

Annexe 1.2. Evaluation du taux de fermeture de blessure sur pastille

Réaliser des blessures sur une couche de cellules directement à la surface des pastilles s'est révélé complexe. Ceci en raison de plusieurs caractéristiques spécifiques des matériaux étudiés et de l'équipement disponible pour réaliser ces expériences. La Figure 92 présente les images issues d'un test de fermeture de blessure sur pastille.

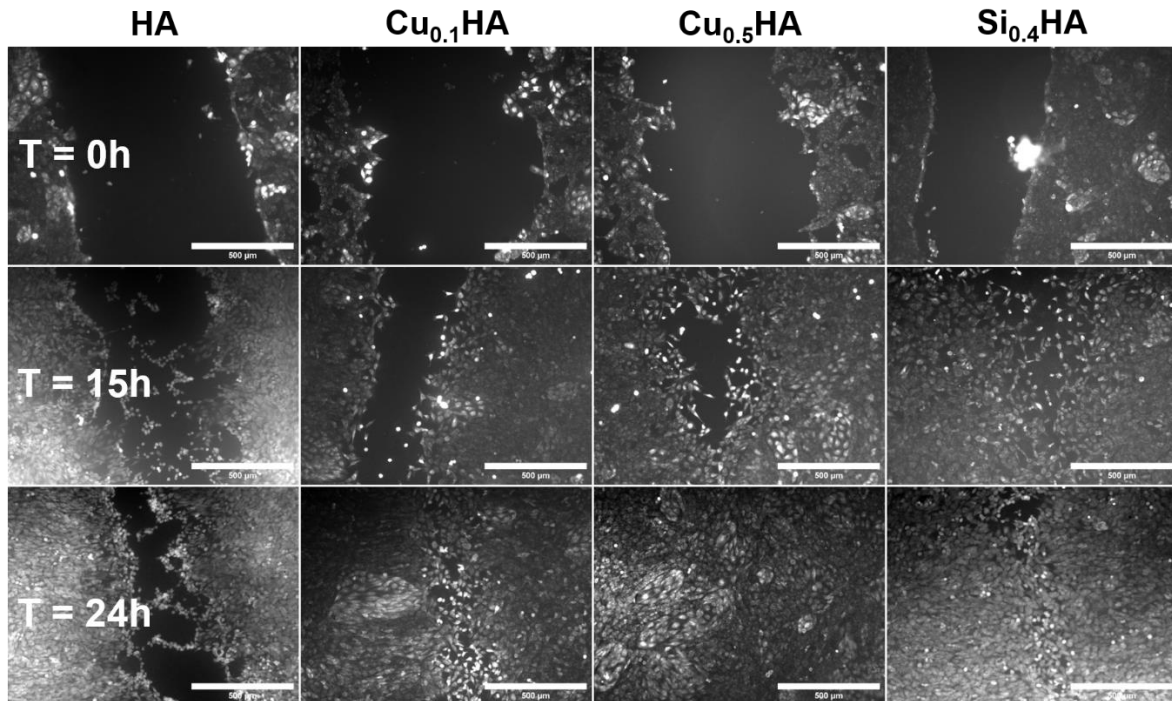


Figure 92 : Illustrations de test de fermeture de blessure sur pastilles

Cellules observées à l'aide d'un marquage à la calcéine RO. T : heure après la blessure.
Grossissement final 100X. Barre d'échelle = 500 µm.

La fermeture de blessures réalisées à la surface de pastilles (Figure 92) est présentée regroupée en un montage, pour faire le parallèle avec ceux de la partie IV.1.7 où le même test est fait en plaque et en présence de milieux conditionnés.

Deux points rendent l'utilisation de ces tests complexe. Premièrement, il reste parfois des amas cellulaires au centre de la blessure. Il y a également le décollement partiel du tissu cellulaire, qui se replie ensuite sur les bordures de la blessure et qui parfois dépose des amas dans la blessure. Ces deux phénomènes non illustrés sur la figure précédente entraînent des zones où les cellules ne peuvent pas proliférer et/ou migrer ou, au contraire, des zones de migration en plein cœur de la blessure ce qui fausse les analyses. Des rinçages supplémentaires peuvent éliminer partiellement ces phénomènes mais la couche de cellules tend à se décoller en d'autres endroits, notamment sur $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$, comme discuté dans la sous-partie III.2.2.1. Deuxièmement l'exposition des pastilles à l'environnement extérieur et leur manipulation extensive entraînent régulièrement des effets négatifs sur les cellules comme il est partiellement visible ici sur HA à 15 h et 24 h (cellules rondes en grappes au centre de la blessure). Ce dernier point est très problématique car il entraîne la perte de l'échantillon à analyser. D'après les expériences la source de ces effets négatifs est un refroidissement trop intense des cellules lors de la mesure.

Le seul moyen d'éviter ces problèmes est d'utiliser un système de suivi en temps réel et un système pour automatiser la réalisation de la blessure sur les matériaux. Cette solution n'est pas sans difficultés car l'observation de cellules à la surface du matériau demande un marqueur fluorescent n'agissant pas sur leurs capacités de prolifération et de migration et restant stable dans le temps.

C'est en partie pour ces raisons que les « wound healing assay » ont été réalisés à partir des milieux conditionnés par les matériaux, et au sein d'un système permettant le suivi en temps réel dans des conditions optimales pour les cellules.

Annexe 1.3. Mesure de la prolifération cellulaire par suivi du signal de Ki67

Ki67 est une protéine nucléaire, qui n'est pas une histone, et qui agit en périphérie des chromosomes comme tensioactif pour les maintenir écartés pendant la mitose et éviter la formation d'une pelote de chromatine après la dissociation de l'enveloppe nucléaire (348). Sa présence, vitale aux cellules proliférantes est communément considérée comme une preuve de prolifération (349). Des marquages de Ki67 par immunofluorescence ont été réalisés sur des C166 pour calculer leur taux de prolifération selon les différents matériaux. Des illustrations de ces marquages sont présentées dans la Figure 93.

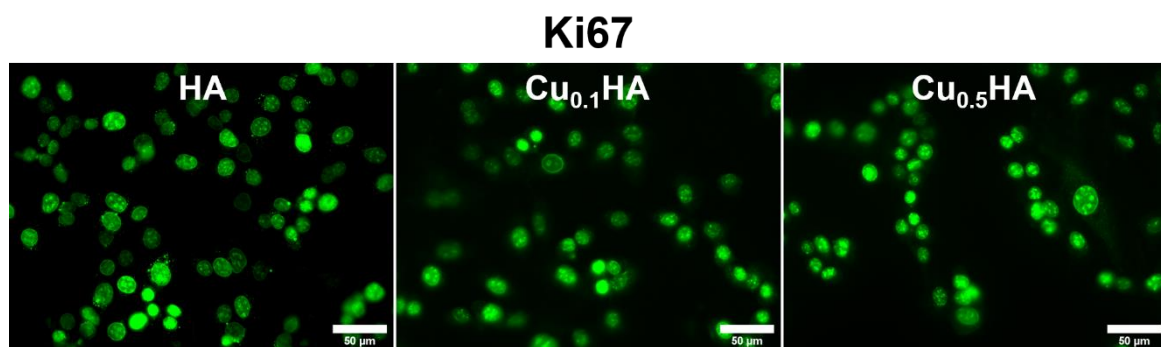


Figure 93 : marquage *in situ* typique de Ki67 dans des C166 après 3 jours de culture sur les matériaux

Vert : Ki67. Grossissement final 400X. Barre d'échelle = 50 μm .

L'expression *in situ* de Ki67 (Figure 93) dans les C166 à la surface des matériaux montre que toutes les cellules expriment Ki67. Cela était inattendu d'après son utilisation comme marqueur de prolifération où on attend une absence d'expression pour les cellules non proliférantes. Ki67 a en fait un niveau d'expression qui varie en fonction du cycle cellulaire, il n'est exprimé que pendant les phases S, M2 et M et est constamment dégradé en phase G0 et G1 (350). Par conséquent, plus une cellule prolifère régulièrement plus elle maintiendra un niveau minimal de Ki67 élevé. La méthode de choix pour mesurer le niveau de prolifération d'une population cellulaire proliférant rapidement comme les C166 est donc de mesurer le niveau total de fluorescence et de comparer les conditions entre elles. Cependant, les conditions expérimentales ne permettent pas de comparer précisément les intensités de fluorescence entre elles. Premièrement, les pastilles ne sont pas toutes planes et les C166 se superposent ce qui ne permet pas de mesurer précisément les intensités. Ensuite, il est possible que les matériaux réagissent différemment avec les longueurs d'onde émises (réflexion). Il est aussi possible qu'il y ait apparition de quenching avec les ions solubilisés dans le milieu. Ces différents problèmes rendent inadaptée l'utilisation de Ki67 comme indicateur de la

prolifération sur les matériaux. Cela a été confirmé en comparant ces analyses préliminaires au taux d'incorporation de l'EdU. C'est d'ailleurs suite à cette incapacité à utiliser Ki67 comme marqueur de prolifération que les mesures de prolifération ont été faites par visualisation de l'incorporation de l'EdU. Cette dernière technique est plus robuste dans ces conditions mais elle a nécessité de chélater les ions Cu^{2+} , afin de permettre une réaction « chimie click » contrôlée dans le temps, comme renseigné dans le matériel et méthode.

Titre : Hydroxyapatites dopées au cuivre ou au silicium : analyse du comportement de cellules endothéliales *in vitro*

Les lacunes osseuses de grande taille, survenant en raison d'un traumatisme ou d'une condition pathologique, nécessitent l'utilisation d'un implant, naturel ou synthétique pour obtenir une réparation satisfaisante de l'os. De l'os naturel n'est pas toujours disponible ou son prélèvement n'est pas toujours désirable. Les solutions synthétiques couramment utilisées incluent des céramiques phosphocalciques dont fait partie l'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cette céramique aisée à mettre en forme et biocompatible n'est cependant pas stimulatrice de l'angiogenèse. En raison du manque de vascularisation, les implants poreux en hydroxyapatite ne permettent pas une réparation osseuse satisfaisante pour les défauts de grande taille. De nombreuses études ont été effectuées sur l'incorporation d'éléments chimiques susceptibles d'induire un effet stimulateur de la néoformation tissulaire au sein de l'hydroxyapatite. Les travaux de cette thèse ont porté sur la caractérisation d'hydroxyapatites dopées, élaborées précédemment au laboratoire IRCER. Celles-ci sont de l'hydroxyapatite dopée au silicium ($\text{Si}_{0.4}\text{HA}$) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$, et deux hydroxyapatites dopées au cuivre de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}_{11z}\text{Cu}_y\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ ($y \gg z$) où $x=y+z$ et $x = 0,1$ ($\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$) ou $x = 0,5$ ($\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$). Ces hydroxyapatites dopées, ainsi que l'hydroxyapatite pure servant de référence, ont été mises en forme en tant que pastilles céramiques denses, et caractérisées physico-chimiquement pour pouvoir les comparer dans une série d'expériences biologiques visant à évaluer leurs propriétés angiogéniques et angioconductrices. Ces expériences utilisent les cellules endothéliales murines C166 cultivées jusqu'à 7 jours et démontrent la biocompatibilité des matériaux $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$. Le matériau $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ est cytotoxique à 7 jours en raison de sa plus forte teneur en cuivre. Les matériaux $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ et $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ possèdent un effet pro-angiogénique dépendant du cuivre. Le matériau $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ posséderait un faible effet pro-angiogénique par le biais de silicium en solution. Les modèles de culture statique couramment utilisés pour caractériser les biomatériaux ne répliquent toutefois pas avec justesse les conditions *in vivo* du site d'implantation. Cette limite peut compromettre la représentativité des caractérisations *in vitro*. Pour améliorer la pertinence des caractérisations biologiques *in vitro* préalables à des tests *in vivo*, une partie des travaux de cette thèse a été dédiée à la mise en place d'un modèle de culture *in vitro* en condition dynamique. Des architectures macroporeuses d'hydroxyapatite ont été mise en forme par micro-extrusion, caractérisées physico-chimiquement, etensemencées avec des monocultures de C166, de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 sous-clone 14 ou des cocultures au ratio de deux C166 pour une MC3T3-E1 sous-clone 14. Ces architectures ont été cultivées jusqu'à 3 semaines dans un système de bioréacteur en flux par perfusion. Les caractérisations biologiques issues d'essais préliminaires montrent la présence de cellules se développant activement au sein des architectures et mettent en évidence l'importance de cocultures.

Mots-clés : [Céramiques phosphocalciques ; Substitution ionique (Silicium, Cuivre) ; Culture cellulaire ; Cellules endothéliales ; Angiogenèse]



Title: Copper- or silicon-doped hydroxyapatites: in vitro analysis of endothelial cell behavior

Large bone defects that occur due to trauma or disease require the use of an implant, either natural or synthetic, for proper bone repair. Natural bone autograft is not always available or its harvest desirable. Synthetic implants that are commonly used include phosphocalcic ceramics such as hydroxyapatite of formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. However, this easily processed and biocompatible ceramic does not stimulate angiogenesis. Due to the lack of vascularization, hydroxyapatite implants do not allow satisfactory bone repair for large defects. Numerous studies have been performed on the incorporation of chemical elements to stimulate bone healing within hydroxyapatite scaffolds. This thesis' work was carried out on doped hydroxyapatites previously elaborated at the IRCER laboratory (Institute of Research for Ceramics) of Limoges. These are a silicon-doped hydroxyapatite ($\text{Si}_{0.4}\text{HA}$) of formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$, and two copper-doped hydroxyapatites of formulas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cu}_{11z}\text{Cu}_{1y}\text{O}_2\text{H}_{2-2z-y}$ ($y \gg z$) where $x=y+z$ and $x = 0.1$ ($\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$) or $x = 0.5$ ($\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$). During this thesis, these ceramics, and pure hydroxyapatite used as a reference, were shaped as pellets and physico-chemically characterized in order to compare them in a series of biological experiments aiming to evaluate their angiogenic and angiostatic properties. These experiments used murine C166 endothelial cells for up to 7 days of culture and demonstrate the biocompatibility of the $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ and $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ ceramic materials. The $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ material is cytotoxic at 7 days of culture due to its high copper content. The $\text{Cu}_{0.1}\text{HA}$ and $\text{Cu}_{0.5}\text{HA}$ materials have a copper-dependent pro-angiogenic effect. The $\text{Si}_{0.4}\text{HA}$ material may have a weak pro-angiogenic effect through silicon in solution. Static culture models are commonly used to characterize the biological behavior of biomaterials but do not accurately replicate the implantation site *in vivo* conditions. This shortcoming can compromise the representativeness of *in vitro* characterizations. To improve the relevance of *in vitro* biological characterizations prior to *in vivo* tests, a part of this thesis' work was dedicated to the implementation of an *in vitro* culture model in dynamic condition. Macroporous hydroxyapatite architectures were shaped by micro-extrusion and physicochemically characterized. They were seeded with monocultures of C166, murine MC3T3-E1 subclone 14 pre-osteoblasts, or cocultures with the ratio of two C166 to one MC3T3-E1 subclone 14. These architectures were grown for up to 3 weeks in a perfusion flow bioreactor system. Preliminary biological characterizations show the presence of actively growing cells within the architectures and point out the importance of co-cultures.

Keywords : [Phosphocalcic ceramics; Ionic substitution (Silicon, Copper); Cell culture; Endothelial cells; Angiogenesis]

