



**HAL**  
open science

# Influence des propriétés physico-chimiques de surface de céramiques à base d'hydroxyapatite (HA) sur le comportement de cellules endothéliales

Julie Usseglio-Grosso

## ► To cite this version:

Julie Usseglio-Grosso. Influence des propriétés physico-chimiques de surface de céramiques à base d'hydroxyapatite (HA) sur le comportement de cellules endothéliales. Sciences agricoles. Université de Limoges, 2024. Français. NNT : 2024LIMO0047 . tel-04729862

**HAL Id: tel-04729862**

**<https://theses.hal.science/tel-04729862v1>**

Submitted on 10 Oct 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 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)**  
**Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER) - UMR CNRS 7315**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Recherche Clinique, Innovation Technologique et Thérapeutique

Présentée et soutenue par  
**Julie USSEGLIO-GROSSO**

Le 12 Juillet 2024

**Influence des propriétés physico-chimiques de surface de  
céramiques à base d'hydroxyapatite (HA) sur le comportement de  
cellules endothéliales**

Thèse dirigée par Amandine MAGNAUDEIX et Éric CHAMPION

JURY :

Présidente

Mme Christèle COMBES, Professeur, CIRIMAT UMR CNRS 5085, Toulouse INP

Rapporteurs

Mme Isabelle BARTHELEMY, PU-PH, NEURODOL UMR INSERM 1107, Université de Clermont Auvergne

M. Jean-Michel BOULER, Professeur, CEISAM UMR CNRS 6230, Université de Nantes

Examineurs

M. Joël BRIE, Professeur Associé, IRCER UMR CNRS 7315, Université de Limoges

M. Eric CHAMPION, Professeur, IRCER UMR CNRS 7315, Université de Limoges

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

A toi, qui as fait ce que je suis devenue aujourd'hui...

*« Ils ne savaient pas que c'était impossible, alors ils l'ont fait. »*

Mark Twain

## Remerciements

---

Je souhaite témoigner ma profonde gratitude à mes Maîtres et membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Merci aux Professeurs Isabelle BARTHELEMY, Jean-Michel BOULER et Christèle COMBES d'avoir accepté de lire, commenter et juger ce manuscrit. Nos discussions lors de ma soutenance ont été riches et bienveillantes. Elles ont dégagé de nouvelles belles perspectives.

Merci à mes directeurs de thèse. Merci à tous les deux pour votre investissement et votre soutien. Cela n'a pas été toujours facile, mais je suis fière aujourd'hui de pouvoir présenter nos résultats.

A Amandine MAGNAUDEIX. Voilà maintenant 10 ans que nous nous sommes rencontrées sur un coin de paillasse au deuxième étage de la faculté de médecine, et puis finalement, on ne s'est jamais trop quittées depuis. Merci pour ta bienveillance, toujours à l'écoute, pour ta disponibilité, pour tous tes conseils avisés. Tu m'as appris tout ce que je sais de la biologie cellulaire aujourd'hui. Je suis heureuse d'avoir pu contribuer à l'avancée de tes travaux. 2024 une année qui nous unit toutes les deux ! Je te souhaite toute la réussite que tu mérites !

A Eric CHAMPION. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe, et d'avoir accepté et compris les contraintes de mon travail à l'hôpital. Merci pour votre patience et vos relectures pointilleuses qui ont permis d'améliorer grandement ce manuscrit.

A tous ceux qui m'ont apporté, de près ou de loin, leur aide, leurs conseils et leur temps pour mener à bien ce travail.

Je souhaite remercier l'institut de recherche sur les céramiques (IRCER) de l'Université de Limoges (UMR CNRS 7315) et particulièrement son directeur, Philippe THOMAS, ainsi que les responsables successifs de l'axe 4 Sylvie FOUCAUD et Alexandre MAITRE pour leur accueil au sein du laboratoire.

Merci à Emeline RENAUDIE pour toute l'aide que tu m'as apportée dans la réalisation de ce travail depuis la fabrication de la poudre et des pastilles jusqu'à l'évaluation biologique. Tes connaissances, ta patience et ta bonne humeur permanente ont été essentielles.

Merci à Alice ABELANET pour ton aide et tes conseils. C'est toujours un grand plaisir de travailler avec toi. Si tu veux du gras, n'hésites pas !

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « Biocéramiques » : Isabelle JULIEN, Karine GIRY, Betty LAVERDET, Patricia PASCAUD-MATHIEU.

Merci à mes collègues doctorants : Paul, Antoine, Souad, Emma, Arthur.

Je tiens à remercier Claire CARRION, Yann LAUNAY et Marc FABERT pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité pour l'acquisition des images.

Merci à l'équipe de CAPTuR, et au Professeur Fabrice LALLOUE, de m'avoir accueillie dans l'équipe pour me faire découvrir la recherche fondamentale lors de mon Master 2 et d'avoir initié ces travaux.

Un grand merci à l'Agence Nationale de la Recherche qui a soutenu financièrement ce projet.

A mes copains de promo, Abdel, Henri, Laurence, Aymeline, Clément, Claire, ... tous dans le même bateau depuis 2009... voir même avant ! Merci pour votre présence et votre soutien.

A toute l'équipe de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Limoges (consultation, service et bloc opératoire) pour votre investissement quotidien à nos côtés, avec toujours autant de bienveillance envers nos patients, d'envie, de motivation et de bonne humeur !

A Esther et Adeline, les CMeuFs ! Merci d'avoir répondu présentes et de vous être lancées dans l'univers (si éloigné de nos blocs) du labo. Bravo pour votre curiosité et votre ténacité et pour tout le travail effectué qui nous a permis de présenter ces résultats aujourd'hui.

A Anissa, toujours un grand plaisir ! A toutes nos collaborations passées et futures !

A Jérôme, qui sait me motiver pour pas lâcher.

A Joel. Un jour de 2010, on s'est fait confiance ; aujourd'hui l'histoire continue, elle est belle !

A mes vieilles copines, Julie, Hélène, Hélène et Flo, qui sont encore là depuis tout ce temps. Je suis toujours ravie de partager tous ces moments avec vous et maintenant avec nos enfants.

A ma famille.

A mes parents, qui m'ont toujours conseillé de « ne pas me fermer de porte ». Voilà où on en arrive ! Merci pour votre soutien sans faille (encore aujourd'hui) et votre amour. Merci d'être là pour nous tous. Vous êtes nos piliers.

A Nico mon frangin, Katia, Lila, Louis, Elina ; vous faites partis de mon équilibre, je suis tellement heureuse de notre complicité.

A ma mamie coco, à mes grands-parents, je pense très fort à vous.

A Thierry, mon parrain-tonton.

A Jérémie et Justine, mes cousins préférés. Tous les records sont battus, j'veais passer direct de l'étudiante à la vermeil !

A Marie-Pierre, mes tendres pensées pour toi sont quotidiennes, je sais que tu continues de veiller sur nous.

A Hugo, qui a le courage de partager ma vie à 100 à l'heure ! Je sais au combien ces dernières années n'ont pas été faciles. Je t'aime.

A Malo et Basile, vous êtes tout pour moi. Je suis tellement fière de vous. Je vous aime.

## 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

---

Introduction générale.....	18
Chapitre I. Étude bibliographique .....	22
I.1. Ostéogenèse .....	22
I.1.1. Le tissu osseux.....	22
I.1.1.1. Composition et organisation du tissu osseux.....	22
I.1.1.1.1. La matrice extracellulaire osseuse.....	22
I.1.1.1.2. Les cellules osseuses.....	24
I.1.1.1.2.1. Les ostéoblastes .....	25
I.1.1.1.2.2. Les cellules bordantes .....	28
I.1.1.1.2.3. Les ostéocytes .....	28
I.1.1.1.2.4. Les ostéoclastes .....	29
I.1.1.2. Les différentes variétés de tissu osseux.....	30
I.1.1.3. Les os .....	33
I.1.1.3.1. Les os longs .....	33
I.1.1.3.2. Les os plats .....	34
I.1.1.4. Les propriétés et les fonctions du tissu osseux .....	35
I.1.2. Les grands principes de l'ostéogenèse.....	36
I.1.2.1. L'unité multicellulaire de base (UMB).....	37
I.1.2.2. Le cycle de remodelage osseux.....	38
I.1.2.3. Le contrôle du remodelage osseux .....	39
I.1.2.3.1. Le rôle des interactions cellulaires.....	40
I.1.2.3.2. Le rôle des facteurs systémiques.....	41
I.1.2.3.3. Le rôle des facteurs locaux.....	42
I.2. Vascularisation .....	44
I.2.1. Le système cardiovasculaire .....	44
I.2.1.1. Les vaisseaux sanguins .....	45
I.2.1.1.1. Les artères et les veines.....	45
I.2.1.1.2. Les capillaires.....	47
I.2.1.1.3. Le système vasculaire des os longs .....	50
I.2.1.2. La cellule endothéliale.....	51
I.2.1.2.1. La structure de la cellule endothéliale.....	51
I.2.1.2.2. Les molécules d'adhérence de la cellule endothéliale.....	54
I.2.1.2.2.1. VE-Cadhérine .....	54
I.2.1.2.2.2. PECAM.....	55
I.2.1.2.3. Les fonctions de la cellule endothéliale.....	58
I.2.2. Vasculogenèse, angiogenèse et artériogenèse .....	60
I.2.2.1. Vasculogenèse .....	60
I.2.2.2. Angiogenèse.....	61
I.2.2.3. Artériogenèse.....	64
I.2.3. Tubulogenèse.....	64
I.2.3.1. In vivo .....	64
I.2.3.2. In vitro .....	65
I.2.4. La signalisation inductrice et régulatrice de l'angiogenèse.....	66
I.2.4.1. Le VEGF et ses récepteurs .....	67
I.2.4.2. Les métalloprotéases matricielles .....	68

I.2.4.3. Le facteur de Von Willebrand .....	70
I.2.4.4. L'enzyme eNOS .....	71
I.3. Réparation tissulaire osseuse .....	73
I.3.1. Les mécanismes cellulaires mis en jeu .....	73
I.3.1.1. Lors d'une lésion osseuse de petite taille .....	73
I.3.1.2. Après implantation d'un biomatériau pour réparation d'une perte de substance osseuse de plus grande taille.....	75
I.3.2. Les facteurs influents la réparation tissulaire osseuse .....	75
I.3.3. Intérêt de la vascularisation .....	76
I.4. Substituts osseux en céramiques phosphocalciques .....	78
I.4.1. Les propriétés des CPC .....	78
I.4.2. L'ostéointégration des CPC .....	79
I.4.2.1. Principes généraux .....	80
I.4.2.2. Interface cellules osseuses - biomatériau.....	81
I.4.2.3. L'effet des CPC sur les cellules osseuses.....	82
I.4.3. La vascularisation des CPC.....	85
I.4.3.1. Le rôle essentiel de la vascularisation dans l'ostéointégration des CPC.....	85
I.4.3.2. Interface cellules endothéliales – biomatériau .....	86
I.4.3.3. L'effet des CPC sur les cellules endothéliales .....	87
I.5. Stratégies d'optimisation des CPC de troisième génération .....	90
I.5.1. Problématiques et enjeux .....	90
I.5.2. Des implants « sur mesure » .....	92
I.5.3. Une architecture poreuse contrôlée .....	95
I.5.3.1. Les méthodes de fabrication additive .....	95
I.5.3.2. Macroporosité – Macrostructure (taux de porosité, taille des pores, voies d'interconnexion, géométrie).....	97
I.5.3.3. Microporosité - Microstructure .....	103
I.5.4. Modifications de la composition chimique : dopage ionique.....	107
I.5.4.1. HA dopée au silicium (SiHA) .....	108
I.5.4.1.1. Le rôle biologique du silicium.....	108
I.5.4.1.2. L'effet du silicium sur les cellules .....	109
I.5.4.1.3. Le silicium dans les céramiques .....	110
I.5.4.2. Les autres dopages.....	113
I.6. Conclusion .....	113
Chapitre II. Compréhension du comportement des cellules endothéliales aux variations physico-chimiques des CPC.....	115
II.1. Hypothèses et Objectifs de travail .....	115
II.2. Article.....	116
Chapitre III. Co-cultures cellules endothéliales – cellules ostéogéniques .....	146
III.1. Nécessité d'une co-culture cellules endothéliales - cellules ostéogéniques pour soutenir la croissance vasculaire .....	146
III.2. Hypothèses et objectifs de travail.....	148
III.3. Matériel et méthodes.....	152
III.3.1. Céramiques phosphocalciques.....	152
III.3.2. Cellules .....	152
III.3.2.1. Modèles cellulaires.....	152
III.3.2.2. Routine d'entretien des cellules.....	152

III.3.3. Etude <i>in vitro</i> d'un modèle de co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques .....	153
III.3.3.1. Les conditions .....	153
III.3.3.2. Étude de la prolifération cellulaire par incorporation d'EdU .....	154
III.3.3.3. Etude de l'activité cellulaire par scratch-test (WHA : Wound Healing Assay) .....	155
III.3.3.4. Étude de la tubulogenèse et de l'expression des marqueurs angiogéniques et ostéogéniques .....	155
III.3.3.5. Mesure de la minéralisation par le rouge alizarine.....	157
III.3.3.6. Activité de la phosphatase alcaline .....	157
III.3.3.7. Dosage du VEGF-A par ELISA .....	158
III.3.3.8. Analyse de l'expression génique des marqueurs endothéliaux et ostéogéniques par RTqPCR .....	158
III.3.4. Analyses statistiques .....	160
III.4. Résultats.....	161
III.4.1. Prolifération cellulaire .....	161
III.4.2. Activité cellulaire (WHA) .....	161
III.4.3. Tubulogenèse et détection <i>in situ</i> de marqueurs de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse .....	163
III.4.4. Mesure de la minéralisation par le rouge alizarine .....	166
III.4.5. Activité de la phosphatase alcaline .....	167
III.4.6. Dosage du VEGF par ELISA .....	168
III.4.7. Analyse de l'expression génique des marqueurs angiogéniques et osseux par RTq PCR.....	169
III.5. Discussion .....	172
Chapitre IV. Discussion générale .....	175
IV.1. Discussion sur le choix des cellules.....	175
IV.2. Discussion sur le choix des matériaux .....	177
IV.3. Discussion sur les tests <i>in vitro</i> .....	180
IV.3.1. Tests de biocompatibilité .....	180
IV.3.2. Expression des marqueurs angiogéniques.....	181
IV.3.3. Tubulogenèse <i>in vitro</i> .....	181
IV.3.4. Étude de la dissolution des céramiques .....	184
IV.3.4.1. Dosages ioniques .....	184
IV.3.4.2. Effet des produits de dissolution sur la migration cellulaire .....	185
IV.4. Discussion sur les co-cultures .....	187
Conclusion générale et perspectives .....	188
Références bibliographiques .....	193
Production scientifique .....	220
Serment d'intégrité scientifique.....	222

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Les différentes cellules osseuses et leur répartition dans le tissu osseux, d'après Nataf (37) .....	24
Figure 2 : Ostéoblastogenèse : de la MSC à l'ostéoblaste mature, d'après Ponzetti (38) .....	25
Figure 3 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste, d'après Barré (41) .....	27
Figure 4 : Organisation structurelle anatomique de la diaphyse d'un os long type humérus (a) : tissu osseux lamellaire compact (b) et spongieux (c) d'après Mescher (51) .....	32
Figure 5 : Schéma de l'anatomie d'un os long, d'après Biga (54) .....	34
Figure 6 : Schéma de l'anatomie d'un os plat, d'après Biga (54) .....	35
Figure 7 : Représentation schématique d'une UBM et du compartiment de remodelage osseux, d'après Gasser (63).....	37
Figure 8 : Les cinq phases d'un cycle de remodelage osseux, d'après Florencio-Silva (26) .	39
Figure 9 : Facteurs systémiques et locaux de régulation du remodelage osseux, d'après Siddiqui (67) .....	40
Figure 10 : Schéma représentant l'organisation du système cardiovasculaire, d'après Marieb (83).....	45
Figure 11 : Organisation générale d'un vaisseau sanguin, d'après Bessagnet (87) .....	47
Figure 12 : Les trois types d'organisations structurelles des capillaires sanguins, d'après Louis (92) .....	49
Figure 13 : Le système vasculaire des os longs, d'après Filipowska (95) .....	50
Figure 14 : Représentation schématique des jonctions serrées et jonctions adhérentes, d'après Runkle (102) .....	52
Figure 15 : Schéma de la régulation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, d'après Sluiter (107).....	57
Figure 16 : Schéma illustrant la formation du système cardiovasculaire par vasculogenèse puis angiogenèse, d'après Curtis (110) .....	61
Figure 17 : Angiogenèse par intussusception – coupe longitudinale, d'après Gentil Dit Maurin (122).....	62
Figure 18 : Angiogenèse par bourgeonnement – coupe longitudinale, d'après Gentil Dit Maurin (122).....	63
Figure 19 : Angiogenèse en boucle (en noir les myofibroblastes), d'après Leite De Oliveira (130).....	64
Figure 20 : Tubulogenèse lors de la vasculogenèse (en haut) et lors de l'angiogenèse (en bas), d'après Xu (136) .....	65
Figure 21 : Les différentes étapes de l'ostéointégration d'un biomatériau phosphocalcique, d'après Ducheyne (182) .....	80

Figure 22 : Schéma représentant l'adhésion cellulaire d'un ostéoblaste aux protéines de la MEC adsorbées en surface d'un biomatériau, d'après Pellenc (184).....	81
Figure 23 : De la modélisation à la fabrication par stéréolithographie d'un implant crânien « sur mesure » en HA, d'après Brie (240).....	94
Figure 24 : les deux principales techniques de fabrication additive : la micro-extrusion (à gauche) et la microstéréolithographie (à droite), d'après Champion (243) et Mota (244) .....	95
Figure 25 : Pâtes céramiques et pièces obtenues par microstéréolithographie (1,3,5) et micro-extrusion (2,4,6), d'après Champion (248).....	97
Figure 26 : Colonisation de pastilles de SiHA fabriquées par $\mu$ SLA. A : Colonisation des macropores par les MC3T3-E1 sc14 après 7 et 14 jours, d'après Rüdrieh (18) B :Invasion vasculaire après explantation de la CAM, d'après Magnaudeix (257).....	100
Figure 27 : Structure cristalline de l'HA stœchiométrique, d'après El-Felss (290).....	107
Figure 28 : Monoculture et co-culture de C166 (C) et de MC3T3-E1 sc14 (M) dans un gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoechst 33342 (bleu) ; marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine (vert) ; marquage de l'ALP (rouge) ; microscopie à épifluorescence grossissement – barres d'échelle : 500 $\mu$ m.....	151
Figure 29 : Gauche : Densité cellulaire en cellules/cm <sup>2</sup> pour les 6 conditions à 24 heures. Test statistique : ANOVA suivi d'un post-hoc de Tukey, ns ( $p \geq 0,05$ ). Droite : Prolifération cellulaire en % pour les 6 conditions à 24 heures. Test statistique : Kruskal Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn, ns ( $p \geq 0,05$ ), * ( $p < 0,05$ ).....	161
Figure 30 : A gauche : WHA à H0, H9 et H24 pour les 5 conditions, observation au microscope optique. Barre d'échelle 50 $\mu$ m. A droite : Pourcentage de fermeture de la lésion à H0, H9 et H24 pour les 5 conditions .....	162
Figure 31 : Culture dans les six conditions sans fibrine à H24 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; détection de l'EdU (vert) ; marquage de la MMP9 (rouge); microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 50 $\mu$ m.....	163
Figure 32 : Culture dans les quatre conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine (vert). C et F : reconstruction en 3D de piles d'images obtenues à partir de co-cultures ; Macroscopie confocale, Barre d'échelle : 1000 $\mu$ m –. EC : endothelial cells, C166 ; BC : bone cells, MC3T3-E1 sc14.....	164
Figure 33 : Culture dans les six conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; marquage de PECAM (vert) ; marquage du collagène de type I (rouge) ; microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 100 $\mu$ m .....	165
Figure 34 : Culture dans les six conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; marquage de PECAM (vert); marquage du collagène de type I (rouge) ; microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 50 $\mu$ m .....	166
Figure 35 : Intensité du marquage au rouge alizarine à J7 dans les quatre conditions .....	167
Figure 36 : Mesure de l'activité de l'alcaline phosphatase à J7 dans les six conditions. ....	168
Figure 37 : Sécrétion de VEGF à J7 dans les cinq conditions.....	169

Figure 38 : Expression relative des gènes ENOS (A), vWF1 (B), RUNX2 (C) et collagène I (D) à J7 dans les cinq conditions. Tests staitiques : ns : non significatif ; * $p \leq 0,05$ ; ** $p \leq 0,01$ ; *** $p \leq 0,001$ .....	170
Figure 39 : Expression relative des gènes collagène I, RUNX2 et ALP à 24 heures.....	171
Figure 40 : Aspect des C166 au microscope à confluence (IRCER).....	175
Figure 41 : Deux configurations du modèle de tubulogenèse <i>in vitro</i> .....	183
Figure 42 : Tubules observés en épifluorescence : observation de cellules à morphologie de tip-cell (flèches blanches) .....	184

## Table des tableaux

---

Tableau 1 (page suivante) : Étude bibliographique de l'influence de la géométrie et de la taille des macropores de CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé) et vasculaire (gris clair) .....	101
Tableau 2 : Étude bibliographique de l'influence de la microporosité de CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé) et vasculaire (gris clair) .....	106
Tableau 3 : Étude bibliographique de l'influence du dopage au silicium des CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé), vasculaire (gris clair), osseuse et vasculaire (noir) .....	112
Tableau 4 : Synthèse des différents ratios de co-cultures <i>in vitro</i> cellules endothéliales (CE) / cellules osseuses (CO) étudiés dans la littérature .....	149
Tableau 5 : Temps de culture et densité cellulaire à l'ensemencement (en cellules/cm <sup>2</sup> ) en fonction du test réalisé.....	153
Tableau 6 : Anticorps primaires (espèces et dilution), en rouge les anticorps avec une cible endothéliale, en bleu les anticorps avec une cible ostéogénique. Sondes fluorescentes et leur dilution.....	156
Tableau 7 : Gènes d'intérêt recherchés lors de la RTqPCR en co-culture et leurs amorces commerciales .....	159
Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés.....	179

## Liste des abréviations

---

**Ac** : Anticorps

**ALP** (Alkaline Phosphatase) : Phosphatase alcaline

**ASC** (Adipose Stromal/Stem Cell) : Cellule stromale/souche dérivée du tissu adipeux

**ATP** (Adenosine TriPhosphate) : Adénosine triphosphate

**BCP** (Biphasic Calcium Phosphate) : Phosphate de calcium biphasique

**BMP** (Bone Morphogenetic Protein) : Protéine morphogénétique osseuse

**BMU** (Basal Multicellular Unit) : Unité multicellulaire de base (**UMB**)

**BSA** (Bovine Serum Albumin) : Albumine sérique bovine

**BSP** (Bone Sialoprotein) : Sialoprotéine osseuse

**CAM** (Chick embryo chorioAllantoic Membrane) : Membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet

**CAO/FAO** : Conception et fabrication assistées par ordinateur

**CaSR** (Calcium-Sensing Receptor) : Récepteur au calcium

**CD** : Cluster de différenciation

**CE** : Cellule endothéliale

**CFU-M** (Colony Forming Unit – Macrophage)

**CO** : Cellule osseuse

**COL** (Collagen) : Collagène

**CPC** : Céramique phosphocalcique

**CPP** (Calcium Polyphosphate) : Polyphosphate de calcium

**DLX5** (Distal-Less Homeobox 5)

**DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

**DMP1** (dentin matrix acidic phosphoprotein 1) : Phosphoprotéine acide de la matrice dentinaire  
1

**EGF** (Epidermal Growth Factor) : Facteur de croissance épidermique

**EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor) : Récepteur au facteur de croissance épidermique

**ELISA** (Enzyme-Linked immunoSorbent Assay)

**eNOS** (Endothelial Nitric Oxide Synthase) : Synthétase endothéliale de monoxyde d'azote

**EPC** (Endothelial Progenitor Cell) : Cellule progénitrice endothéliale

**FGF** (Fibroblast Growth Factor) : Facteur de croissance des fibroblastes

**FGFR** (Fibroblast Growth Factor Receptor) : Récepteur au facteur de croissance des fibroblastes

**GH** (Growth Hormone) : Hormone de croissance

**HA** : Hydroxyapatite

**HIF-1 $\alpha$**  (Hypoxia inducible Factor-1 $\alpha$ ) : Facteur induit par l'hypoxie - 1 $\alpha$

**HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) : Cellule endothéliale humaine de la veine ombilicale

**Ig** : Immunoglobuline

**IGF** (Insulin-like Growth Factor) : Facteur de croissance similaire à l'insuline

**IGFBP** (Insulin-like Growth Factor – Binding Protein) : Protéine de liaison au facteur de croissance similaire à l'insuline

**IL** (Interleukin) : Interleukine

**JAM** (Junctional Adhesion Molecule) : Molécule d'adhésion jonctionnelle

**LTBP** (Latent TGF $\beta$  Binding Protein) : Protéine de liaison au TGF $\beta$  latent

**MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinase) : Protéine kinase activée par les mitogènes

**M-CSF** (Macrophage – Colony Stimulating Factor) : Facteur stimulateur des colonies de macrophages

**MEC** : Matrice extracellulaire

**MEM $\alpha$**  (Minimum Essential Medium  $\alpha$ )

**MGF** (Megakaryocyte Growth Factor) : Facteur de croissance des mégacaryocytes

**MMP** (Matrix Metalloprotease) : Métalloprotéase matricielle

**MSC** (Mesenchymal Stromal/Stem Cell) : Cellule stromale/souche mésenchymateuse (CSM)<sup>1</sup>

**HBMSC** (Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cell) : cellule stromale mésenchymateuse dérivée de la moelle osseuse

**NF- $\kappa$ B** (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

**NO** (Nitric Oxide) : Monoxyde d'azote

**OC ou OCN** (Osteocalcin) : Ostéocalcine

**OP ou OPN** (Osteopontin) : Ostéopontine

**OPG** (osteoprotegerin) : Ostéoprotégérine

**OSX** (Osterix, Transcription factor SP7) : Ostérix, Facteur de transcription SP7

**PBS** (Phosphate Buffered Saline)

**PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor) : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PECAM** (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) : Molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes

---

<sup>1</sup> Le terme MSC (ou CSM) sera utilisé dans ce manuscrit pour désigner souche ou stromale. En effet, les cellules souches isolées chez l'adulte ayant des propriétés différentes des cellules souches embryonnaires, la société internationale de thérapie cellulaire recommande d'utiliser le terme stromale pour désigner les cellules utilisées lors d'expérimentation *in vitro* de manière à souligner l'hétérogénéité des sources et des cellules.

**PFA** : Paraformaldéhyde

**Pi** : Phosphate inorganique

**PI3K/Akt** (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B)

**PIGF** (Placenta Growth Factor) : Facteur de croissance placentaire

**PKC** : Protéine kinase C

**PTH** (Parathyroid Hormon) : Hormone parathyroïdienne - Parathormone

**PTH-R** (Parathyroid Hormon - Receptor) : Récepteur à l'hormone parathyroïdienne - Récepteur à la Parathormone

**PTHrP** (Parathyroid Hormon related-protein)

**RANK** (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B) : Activateur du récepteur au facteur nucléaire Kappa-B

**RANKL** (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) : Ligand de l'activateur du récepteur au facteur nucléaire Kappa-B

**ROS** (Reactive Oxygen Species) : Espèces réactives de l'oxygène

**RUNX-2** (Runt-related transcription factor 2) : ou CBFA1 (Core-binding factor subunit alpha-1) : sous-unité alpha 1 du facteur de liaison au noyau

**SCL** (Sclerostin) : Sclérostine

**Si** (Silicon) : Silicium

**SiHA** (Silicon-doped hydroxyapatite) : Hydroxyapatite silicatée – Hydroxyapatite substituée au silicium – Hydroxyapatite dopée au silicium

**SLA** (Stereolithography) : Stéréolithographie

**SP** (Specificity Protein)

**STL** (Standard Tessellation Language)

**SVF** : Serum de veau fœtal

**TCP** (Tricalcium phosphate) : Phosphate tricalcique

**TGF** (Transforming Growth Factor) : Facteur de croissance transformant

**TIMP** (Tissue inhibitor of matrix metalloprotease) : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases

**TLR** (Toll Like Receptor) : Récepteur de type Toll

**TNF** (Tumor Necrosis Factor) : Facteur de nécrose tumorale

**t-PA** (Tissue Plasminogen Activator) : Activateur tissulaire du plasminogène

**TRAP** (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) : Phosphatase acide résistante au tartrate

**VE-Cadhérine** (Vascular Endothelial Cadherin)

**VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**VE-PTP** (Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase) : Protéine tyrosine phosphatase de l'endothélium vasculaire

**VSMC** (Vascular Smooth Muscle Cell) : Cellule musculaire lisse vasculaire

**vWF** (Von Willebrand factor) : Facteur de von Willebrand

**WHA** (Wound Healing Assay) : Test de fermeture de lésion du tapis cellulaire

**μSLA** (micro stereolithography) : Micro-stéréolithographie

## Introduction générale

---

Le remodelage osseux est un processus naturel dynamique et continu qui consiste à dégrader le tissu osseux ancien ou altéré (résorption) et à créer (formation) une nouvelle matrice osseuse minéralisée. Tout au long de la vie, ce processus est en équilibre, entre résorption et formation de matrice osseuse, régulé par les cellules osseuses, permettant le renouvellement du tissu osseux. Le remodelage osseux permet à l'os de conserver ses propriétés mécaniques et de maintenir son homéostasie (équilibre) minérale (1). La réparation osseuse est un mécanisme spécifique reprenant les principes du remodelage osseux. En cas de fracture ou de défaut osseux de petite taille, ce processus de réparation suffit à régénérer le tissu osseux nécessaire pour combler le défaut (en faisant pencher la balance du côté de la formation).

Cependant, en cas de défaut osseux de plus grande taille (d'origine traumatique, vasculaire, infectieuse ou tumorale) ou au niveau de zones soumises à des fortes contraintes mécaniques, la réparation osseuse physiologique est insuffisante pour combler totalement la perte de substance osseuse et aboutir à la consolidation. Le processus d'autoréparation conduit alors à un mélange de tissu fibreux et de tissu osseux non minéralisé, les fonctions du tissu osseux ne sont ainsi plus assurées : c'est la pseudarthrose (absence de consolidation osseuse). Cela peut être favorisé par des facteurs locaux (stabilité mécanique de la réduction et de la contention chirurgicale insuffisante, infection locale,...) ou systémiques (immunodépression, diabète, tabagisme,...). La technique de référence pour la reconstruction des pertes de substance osseuse de grandes tailles reste la reconstruction par du tissu osseux autologue ou greffe osseuse. En effet, l'autogreffe osseuse offre l'avantage de reconstruire en utilisant du tissu osseux similaire au tissu lésé. L'os autologue possède un fort potentiel biologique grâce aux cellules ostéocompétentes et aux facteurs de croissance qu'il contient. L'autogreffe n'entraîne évidemment aucune réaction immunologique. Cependant, elle présente un certain nombre de limites : le prélèvement entraîne une morbidité supplémentaire au niveau du site donneur (douleur, saignement, infection, fracture), la quantité et la forme de l'os disponible sont limitées, la résorption osseuse du greffon peut être assez importante, par mort cellulaire secondaire liée à un défaut de vascularisation du greffon (inconvenient pallié depuis l'avènement de la microchirurgie et le développement des lambeaux libres osseux vascularisés) (2). Une partie de ces limites est atténuée par l'utilisation des xéno greffes (donneur animal) ou des allogreffes (donneur humain). Classiquement, les têtes fémorales de patients bénéficiant d'une arthroplastie de hanche sont prélevées par le chirurgien orthopédiste après sélection des donneurs et dépistage biologique de maladies transmissibles. Des banques à os assurent ensuite la transformation (nettoyage, viro-inactivation), la stérilisation, la sécurisation, la conservation et la mise à disposition des greffons. Les allogreffes permettent notamment d'éviter la morbidité du site donneur. Cependant, les traitements subis par celles-ci pour éliminer les cellules à fort potentiel de rejet immunitaire altèrent leurs propriétés mécaniques et ostéogéniques (3). Il ne persiste finalement que la trame minérale, dépourvue de propriété ostéogénique, entraînant une résorption souvent importante du greffon (par mauvaise vascularisation et colonisation par les cellules osseuses). De plus, des défauts de stérilisation peuvent exister, favorisant une infection locale et à terme la perte du greffon (4).

C'est dans ce contexte qu'ont émergé les substituts osseux. Les biomatériaux sont définis comme des matériaux, synthétiques ou vivants, utilisables à des fins médicales pour remplacer une partie ou une fonction d'un organe ou d'un tissu (5). La compréhension des mécanismes immunitaires a permis le développement dans les années 1960-1970 des

biomatériaux dits bio-inertes. Ces biomatériaux de première génération avaient comme seules caractéristiques de posséder des propriétés mécaniques proches (ou supérieures) à celles du tissu osseux et de ne pas entraîner de réactions toxiques chez le receveur (biocompatibilité). A partir des années 1980, sont apparus les premiers biomatériaux dits bio-actifs, capables de conduire la formation de nouveaux tissus à leur surface, présentant une résorbabilité variable et pour certains participant aux réactions biologiques dans les tissus receveurs. Ils sont appelés biomatériaux de deuxième génération. Il s'agit des bioverres, des alliages de titane et des céramiques à base de phosphate de calcium. Parmi ces céramiques phosphocalciques (CPC), l'hydroxyapatite (HA) synthétique de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  est largement et communément utilisée en ingénierie tissulaire osseuse. Les biomatériaux en HA, en dehors de leur parfaite biocompatibilité, ont également la capacité de conduire des réactions biologiques chez l'hôte (6,7). Avec leur composition chimique proche de celle de la phase minérale de l'os,  $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{1,0}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{CO}_3, \text{OH})_{0,3}$ , ils facilitent la formation de tissu osseux à leur surface lorsqu'ils sont en contact avec de l'os (ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur, au contact de ce matériau). Lorsqu'ils sont macroporeux, le tissu osseux peut pénétrer à l'intérieur des implants, favorisant ainsi leur ostéointégration. Cependant, cette propriété d'ostéoconduction est limitée, l'invasion osseuse des implants poreux n'allant que difficilement au-delà de 1 cm de l'apposition osseuse (3). Elle demeure donc insuffisante pour générer du tissu osseux au cœur des implants poreux de grande taille, dans les zones qui ne sont pas en contact direct avec l'os. En effet, les céramiques phosphocalciques ne sont pas ostéoinductrices (capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable), c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de supporter la formation du nouveau tissu osseux sans être en contact direct avec de l'os natif. En outre, la bioactivité des matériaux à base de HA reste limitée, ils sont notamment peu ou pas résorbables. Or leur résorbabilité est essentielle pour pouvoir permettre une colonisation complète du biomatériau et une disparition de celui-ci pour ne laisser à terme que du tissu néoformé.

Un dernier point essentiel est la vascularisation des implants. En effet, pour obtenir une régénération osseuse satisfaisante, il est indispensable d'avoir une vascularisation sous-jacente adéquate, laquelle est le point fondamental d'une régénération osseuse réussie. L'échec de la régénération osseuse est généralement lié à l'absence (ou la faiblesse) de cette vascularisation qui permet de lutter contre l'ischémie et facilite le transport des nutriments (8,9). Le manque de vascularisation, notamment au cœur de l'implant, entraîne une diminution de la colonisation de celui-ci par les tissus néoformés. La restauration d'un apport sanguin adéquat est essentielle au processus de cicatrisation osseuse, elle est considérée comme un pré-requis indispensable (10). Le manque de vascularisation (ischémie) semble être le facteur principal des échecs d'ostéointégration des biomatériaux. Les cellules endothéliales (CE) jouent un rôle primordial dans la réparation tissulaire, par le biais de la communication moléculaire avec les cellules hôtes du tissu lésé (11–13). Les cellules étant sensibles aux propriétés physico-chimiques de leur environnement, l'ajustement des propriétés chimiques et/ou microarchitecturales du biomatériau est essentiel pour améliorer la croissance des cellules endothéliales à la surface de la céramique (14,15).

De plus, pour créer et développer une vascularisation dans les implants, les cellules endothéliales ont besoin de cellules stromales de soutien, leur servant de support pour guider la croissance et l'invasion vasculaire. Les cellules endothéliales ne peuvent pas former à elles seules un réseau vasculaire suffisant pour permettre une vascularisation fiable et pérenne d'un

tissu néoformé (16). Dans le contexte de régénération osseuse, ces cellules de soutien peuvent être des ostéoblastes (cellules osseuses ostéogéniques impliquées dans la formation du tissu osseux). En ingénierie tissulaire osseuse (domaine interdisciplinaire de la biologie, de l'ingénierie et de la médecine qui vise à développer des solutions de remplacement pour combler les pertes de substance osseuse), la communication entre cellules endothéliales et cellules osseuses est ainsi essentielle à étudier et à comprendre pour optimiser la conception des biomatériaux.

L'enjeu actuel en ingénierie tissulaire osseuse est le développement d'une nouvelle génération de biomatériaux, facilitant l'ostéoconduction et l'angiogenèse, pour permettre une ostéoinduction en offrant la possibilité de formation de tissu osseux sur des larges pertes de substance sans contact direct avec l'os natif, favorisant ainsi l'ostéointégration des implants. Ils doivent donc posséder une topographie de surface et une composition chimique favorisant la survie et les fonctions des cellules environnantes. Ils doivent également être mécaniquement adaptés aux contraintes exercées sur la zone. Enfin, par leur architecture comportant des macropores (désignant des pores de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$ , généralement de l'ordre de 500  $\mu\text{m}$ ) interconnectés, ils doivent permettre d'accueillir le tissu osseux en formation ainsi que la vascularisation. Parmi les stratégies proposées pour améliorer ces propriétés recherchées (biocompatibilité, ostéoconduction, angiogenèse, ostéoinduction, résorbabilité), la modification de la composition chimique de l'HA (avec notamment la substitution partielle des ions phosphates par des ions silicates (17)) et les variations d'architecture des implants, particulièrement de la microporosité (désignant des pores de taille inférieure ou égale à 10  $\mu\text{m}$  (18,19) semblent intéressantes et pertinentes.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans la recherche de CPC ostéogéniques, et s'intéresse à l'amélioration de deux de leurs propriétés biologiques : leur ostéoinduction et leur vascularisation par modification de leur composition physico-chimique (dopage au silicium et microstructure). Cette thèse entre dans le projet « Plateforme de caractérisation des interfaces biomatériau-cellules dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse » (CharaBioC) ANR-19-CE08-0003-01, financé par l'agence nationale de la recherche (ANR), programme JCJC, en 2019, porté par A. Magnaudeix et mené dans l'équipe « Biocéramiques » à l'IRCER.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré aux rappels bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'étude expérimentale réalisée dans la thèse. Tout d'abord des rappels sont faits sur le tissu osseux, sa composition, ses propriétés, son remodelage et les grands principes de l'ostéogenèse. Ensuite, un bilan sur l'angiogenèse est exposé, rappelant sa physiopathologie, les acteurs impliqués et la nécessité d'une angiogenèse effective. Puis, les grands principes de la réparation tissulaire osseuse, et l'importance d'une vascularisation de qualité pour une réparation osseuse efficace sont décrits. Par la suite, les propriétés des substituts osseux en céramiques phosphocalciques utilisées dans ces travaux, et plus particulièrement leur capacité à favoriser la vascularisation et à s'intégrer au tissu osseux sont énoncées. Enfin, les stratégies d'optimisation des céramiques pour stimuler l'ostéogenèse, l'angiogenèse et ainsi leur ostéointégration, sont détaillées : en particulier le contrôle de l'architecture poreuse et les modifications de la composition chimique par dopage ionique. Ces éléments bibliographiques dégagent des hypothèses permettant de décrire les orientations et objectifs de l'étude expérimentale.

Le second chapitre, présenté sous forme d'article, a pour objet l'étude de l'angiogenèse dans les CPC. Il comporte notamment le développement d'une méthode efficace pour évaluer les capacités de vascularisation de la surface de céramiques à base d'hydroxyapatite par des

cellules endothéliales et leur capacité à former des tubules en fonction de leur composition et de leur microstructure. Ce travail a été publié dans *Journal of Functional Biomaterials* en Septembre 2023 : *Microporous hydroxyapatite-based ceramics alter the physiology of endothelial cells through physical and chemical cues.* (20).

Le travail exposé dans le troisième chapitre est le développement d'un modèle cellulaire et physiologique pertinent pour l'étude des propriétés biologiques des matériaux et la compréhension de l'interface vivant-matériaux. Il s'intéresse à l'analyse des réponses cellulaires d'une co-culture *in vitro* de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques pour permettre notamment de déterminer un ratio de cellules endothéliales/ cellules ostéogéniques le plus efficace pour permettre conjointement l'angiogenèse et l'ostéogenèse.

Le dernier chapitre synthétise les résultats obtenus dans ce travail de thèse sur la promotion de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse des CPC, et les discute en fonction des données de la littérature.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion générale, reprenant les principaux résultats, leur pertinence, leurs applications et la description de perspectives qui s'ouvrent à la suite de ce travail.

## Chapitre I. Étude bibliographique

---

Dans ce chapitre, des prérequis sont énoncés concernant le tissu osseux, sa composition, son rôle, la physiopathologie de son remodelage et les grands principes de l'ostéogenèse. Ensuite, des notions sur la néovascularisation (développement du réseau vasculaire dans un tissu) sont rappelées, listant les mécanismes communs et divergents de la vasculogenèse et de l'angiogenèse, permettant d'arriver à un réseau vasculaire mature. La tubulogenèse et ses modèles d'évaluation *in vitro* sont décrits. Le contrôle et la signalisation de l'angiogenèse sont abordés. Puis, les grands mécanismes de la réparation tissulaire osseuse, et surtout le rôle primordial de la vascularisation, sont détaillés. Par la suite, les propriétés des substituts osseux à base de céramiques phosphocalciques, leurs interactions avec le milieu biologique et particulièrement leur ostéointégration et leur vascularisation sont présentées. Enfin, les stratégies d'optimisation des céramiques phosphocalciques et notamment le contrôle de leur porosité à différentes échelles (macropore  $>10\mu\text{m}$ , micropore  $\leq 10\mu\text{m}$ ) ainsi que les modifications de leur composition chimique par dopage ionique sont développées.

### I.1. Ostéogenèse

Ce sous-chapitre rappelle tout d'abord la composition, l'organisation, les propriétés et les fonctions du tissu osseux. Ensuite, les grands principes de l'ostéogenèse, puis les différentes étapes et le contrôle du remodelage osseux sont abordés.

#### I.1.1. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, extrêmement dynamique. Il est constitué de cellules osseuses dispersées dans une matrice extracellulaire (MEC) abondante et minéralisée, qui lui confère sa rigidité et sa solidité. Le tissu osseux est parcouru par un très riche réseau vasculaire.

##### I.1.1.1. Composition et organisation du tissu osseux

Des cellules osseuses sont répandues dans une MEC.

###### I.1.1.1.1. La matrice extracellulaire osseuse

La MEC (21), également dénommée substance osseuse, est formée d'une partie organique (25%), d'une partie minérale (70%), et d'eau (5%). Le tissu osseux est le tissu le moins hydraté de l'organisme, après l'émail des dents (22). (% = % massique).

La matrice organique (également appelée ostéoïde avant sa minéralisation), est constituée par :

- 90% de collagène, essentiellement de type I. Le collagène assure à l'os son élasticité et sa résistance mécanique. Cette protéine fibreuse permet la fixation des minéraux sur la matrice ostéoïde.
- De la substance fondamentale, comprenant :
  - o Des glycoprotéines non collagènes, spécifiques de l'os, comme par exemple :
    - L'ostéonectine : c'est la plus abondante, liée au collagène et aux sels minéraux (cristaux d'hydroxyapatite). Elle sert de lien entre la matrice organique et la matrice minérale. Elle intervient dans la minéralisation par son affinité pour le collagène et le calcium.

- L'ostéocalcine (OC ou OCN) : elle intervient dans la minéralisation osseuse en liant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (marqueur des ostéoblastes matures).
  - L'ostéopontine (OP ou OPN) : elle relie la matrice minérale aux cellules osseuses, elle régule négativement la progression de la minéralisation.
  - Des protéoglycanes : rares. Les glycosaminoglycanes de type chondroïtine sulfate et kératane sulfate confèrent au tissu osseux une résistance à la compression. Biglycan et décorine (appartenant à la famille des SLRP – Small leucine-rich proteoglycan) sont particulièrement décrits dans la matrice osseuse (23) et semblent jouer un rôle important pour l'homéostasie osseuse en modifiant l'activité des ostéoblastes (24).
- De l'eau et des électrolytes
  - Des facteurs de croissance (dont les principaux sont les BMP - Bone Morphogenetic Protein, notamment la BMP-2) et des cytokines : ils régulent de manière autocrine<sup>2</sup> et paracrine<sup>3</sup> l'activité cellulaire lors du cycle de remodelage osseux. Ils assurent la communication et la coopération constante entre les cellules et la matrice (leur rôle est détaillé au paragraphe I.1.2.3 Le contrôle du remodelage osseux).

Ce sont les ostéoblastes qui sont responsables de la synthèse de la MEC, puis de sa minéralisation (cf paragraphe I.1.1.1.2.1. Les ostéoblastes).

La matrice minérale est responsable de la rigidité et de la solidité du tissu osseux. Les minéraux viennent se fixer sur la trame protéique (collagène I) de l'ostéoïde. Les minéraux les plus importants du squelette adulte sont : le calcium, 1000-1200 g (le squelette contient 99% du calcium de l'organisme) ; le phosphore, 600 g (le squelette contient 90% du phosphore de l'organisme) ; le sodium, 18 g ; le potassium, 6 g ; le magnésium, 3 g, et d'autres sous forme de traces (fluor, zinc, strontium, citrate, carbonate, baryum, ...) (25,26).

La matrice minérale est donc composée majoritairement de sels de calcium et d'(hydrogéné)-phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite carbonatée de formule chimique approchant  $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{1,0}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{CO}_3,\text{OH})_{0,3}$  (27,28). Ces cristaux d'hydroxyapatite biologique viennent s'entremêler aux fibres de collagène de la matrice organique permettant sa minéralisation (29). Ils ont une forme hexagonale allongée (comme des aiguilles), mesurant 30-50 nm de long sur 1,5-4 nm d'épaisseur. La surface du cristal est fortement ionisée et liée à l'eau de la matrice avoisinante, dont les ions phosphate et calcium sont facilement mobilisables pour être remis en circulation (30). La composition chimique de la phase minérale de l'os varie légèrement d'un os à l'autre, et avec le vieillissement (31).

La matrice organique contrôle sa minéralisation (32). En effet, une fois la MEC organique arrivée à maturité, la sécrétion cellulaire (par les ostéoblastes) d'ALP (Alcaline Phosphatase) augmente, ce qui induit la formation de cristaux d'hydroxyapatite et ainsi la minéralisation de la MEC (33).

La minéralisation de la matrice ostéoïde nécessite l'intervention de vésicules matricielles (34). Ces vésicules, dérivant de la membrane plasmique des ostéoblastes, sont chargées en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ . Elles contiennent également des enzymes comme l'ALP et la pyrophosphatase.

---

<sup>2</sup> Sécrétion dont le produit agit sur la cellule sécrétrice elle-même (qui en possède le récepteur).

<sup>3</sup> Sécrétion dont le produit agit sur les cellules voisines, par diffusion ou contiguïté.

L'ALP augmente la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les vésicules. La pyrophosphatase et l'ALP peuvent également cliver les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  des molécules plus grosses. L'ostéocalcine, glycoprotéine présente dans l'ostéoïde, lie les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui augmente leur concentration locale.

La génération des premiers cristaux d'hydroxyapatite se produit à l'intérieur de la membrane de la vésicule matricielle à partir de sites de nucléation au cours de la phase 1 de la minéralisation biologique. Cette phase est contrôlée par les phosphatases (y compris l'ALP) et les molécules de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , comme l'ostéocalcine. Ce processus de formation et de croissance se déroule dans l'environnement contraint des vésicules, ce qui peut influencer la taille et la forme des cristaux formés. La minéralisation biologique commence par la fusion des vésicules avec la membrane cellulaire des ostéoblastes entraînant la rupture des membranes des vésicules de minéralisation et la libération des cristaux dans la matrice extracellulaire. Ainsi, ils contribuent à la minéralisation de l'os en fournissant des sites de nucléation pour la croissance des cristaux. Les phases 1 et 2 de la minéralisation sont sous contrôle cellulaire. La phase 1 est initiée par les ostéoblastes qui génèrent des vésicules de minéralisation calcifiables et les libèrent dans les sites de calcification prévus. La phase 2 est contrôlée par les ostéoblastes qui régulent les conditions ioniques extracellulaires et la composition de la matrice (35). Ainsi se forme une vague de minéralisation qui parcourt l'ostéoïde.

Si les concentrations d'ions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sont suffisantes, la minéralisation suit de peu la formation de la matrice ostéoïde par les ostéoblastes ; si elles sont plus faibles, la minéralisation est décalée dans le temps, ne rattrapant son retard que quand la production d'ostéoïde diminue.

#### I.1.1.1.2. Les cellules osseuses

Le tissu osseux adulte est formé et entretenu par les interactions de 4 types de cellules qui possèdent chacune des fonctions différentes : les ostéoblastes (formation de la matrice osseuse), les cellules bordantes (ostéoblastes en veille, à la surface du tissu osseux), les ostéocytes (ostéoblastes différenciés nichés au cœur du tissu osseux) et les ostéoclastes (dégradation de la matrice osseuse) (36) (**Figure 1**).

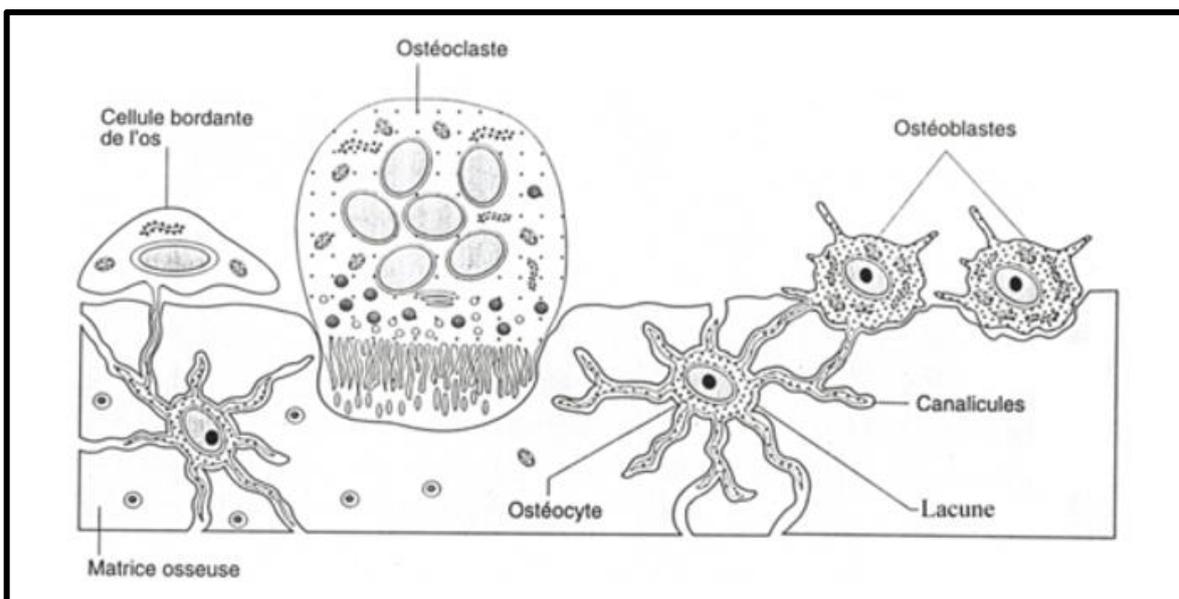


Figure 1 : Les différentes cellules osseuses et leur répartition dans le tissu osseux, d'après Nataf (37)

### I.1.1.1.2.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes matures « actifs » sont mononucléés, cuboïdes, et mesurent entre 20 et 50  $\mu\text{m}$ . Ils sont situés à la surface de l'os. Ils représentent 4 à 6% des cellules osseuses. Ils proviennent de la différenciation des MSC (Mesenchymal Stem Cells) en cellules ostéoprogénitrices (pré-ostéoblastes), puis en ostéoblastes immatures, puis en ostéoblastes matures. Cette différenciation est un phénomène essentiel pour le remodelage osseux et la réparation des foyers de fracture. Des gènes spécifiques sont activés pour diriger la différenciation vers la lignée ostéoblastique. L'ostéoblastogenèse, ou processus de maturation de l'ostéoblaste, doit être parfaitement régulée pour assurer un développement normal des os. La **Figure 2** résume ce processus.

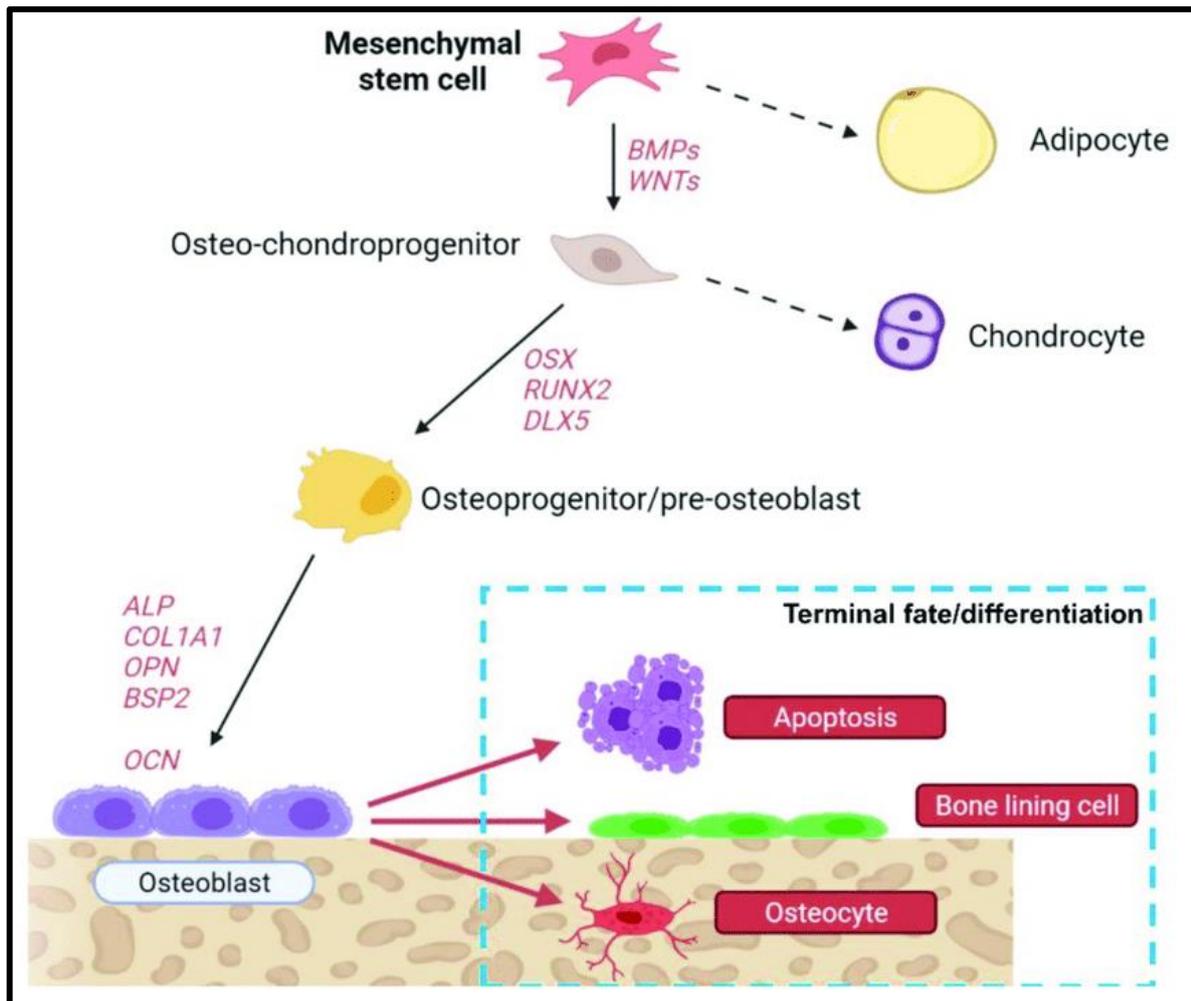


Figure 2 : Ostéoblastogenèse : de la MSC à l'ostéoblaste mature, d'après Ponzetti (38)

Les MSC ont la capacité de se différencier selon trois lignages principaux : adipogénique, chondrogénique, ostéogénique. La différenciation dans telle ou telle voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcriptions spécifiques. Tout d'abord, des gènes spécifiques sont activés (répondant à des signaux / stimuli extracellulaires) pour diriger la différenciation des MSC vers la lignée des progéniteurs ostéochondraux. Cette différenciation se fait notamment en réponse à l'activation de la voie des BMP ou de la voie des WNTs (Wingless-related and Integrase-1). Cette signalisation dirige la différenciation vers la voie des progéniteurs ostéochondraux et bloque celle vers la voie adipocytaire. Puis, l'expression de *RUNX2* (Runt-

related transcription factor 2) également dénommé *CBFA1* (Core-binding factor subunit alpha-1), induit la différenciation dans la lignée ostéoblastique. *RUNX2* est un gène, membre de la famille des facteurs de transcription *RUNX*, à domaine Runt, codant pour une protéine nucléaire essentielle à la différenciation ostéoblastique et à la morphogenèse du squelette. *RUNX2* est le facteur de transcription le plus important de l'ostéoblastogenèse (39). Une délétion de *RUNX2* entraîne non seulement un défaut d'initiation de la différenciation dans la voie pré-ostéoblastique, mais également un défaut de l'expression de gènes associés au bon fonctionnement des ostéoblastes matures et, donc, de la différenciation tardive des ostéoblastes (40). Ainsi *RUNX2* permet l'expression de gènes en aval impliqués dans d'importantes étapes de la formation puis de la minéralisation de la matrice extracellulaire des os tels que *Ostéocalcine* (*OC* ou *OCN*), *Ostéopontine* (*OP* ou *OPN*), *Phosphatase alcaline* (*ALP*), *Matrix Metalloprotease 13* (*MMP13*), *Collagène type 1 alpha 1* (*COL1A1*),....

L'expression d'autres gènes, comme *Ostérix* (*OSX* ou Transcription factor SP7) ou *DLX5* (Distal-less homeobox 5), permet également de diriger les MSC dans la voie ostéoblastique. A noter que ces gènes sont essentiellement présents au cours du développement embryonnaire.

L'expression de *Ostérix*, membre de la famille des facteurs de transcription SP (Specificity Protein), dans les pré-ostéoblastes, est sous le contrôle transcriptionnel de *RUNX2*. L'induction d'*OSX* permet la différenciation du stade pré-ostéoblaste en ostéoblaste fonctionnel, exprimant des gènes exerçant une fonction de minéralisation. *OSX* agirait en aval de *RUNX2*, principalement sur la différenciation terminale des ostéoblastes.

Ces voies de signalisation et facteurs de transcription, essentiels à l'initiation de la différenciation des ostéoblastes et à la synthèse et la minéralisation du tissu minéralisé sont, pour leur part, contrôlés par divers hormones et facteurs de croissance, permettant ainsi une réponse du tissu osseux à des changements systémiques ou locaux. Ils sont décrits plus loin dans le paragraphe I.1.2.3. Le contrôle du remodelage osseux.

Au cours de la différenciation ostéoblastique, on retrouve l'expression de différents gènes exprimés précocement, puis de gènes ostéoblastiques exprimés plus tardivement (à des stades plus avancés de la différenciation) et associés à la production de matrice (Récepteur de la parathormone *PTH-R*, *ALP*, *COL-1*, *OP* ou *OPN*) et enfin des marqueurs tardifs de différenciation au début de la minéralisation (*Sialoprotéine Osseuse BSP*, *OC* ou *OCN*). L'expression de ces marqueurs, essentiels pour le bon déroulement de la minéralisation, est schématisée dans la **Figure 3**.

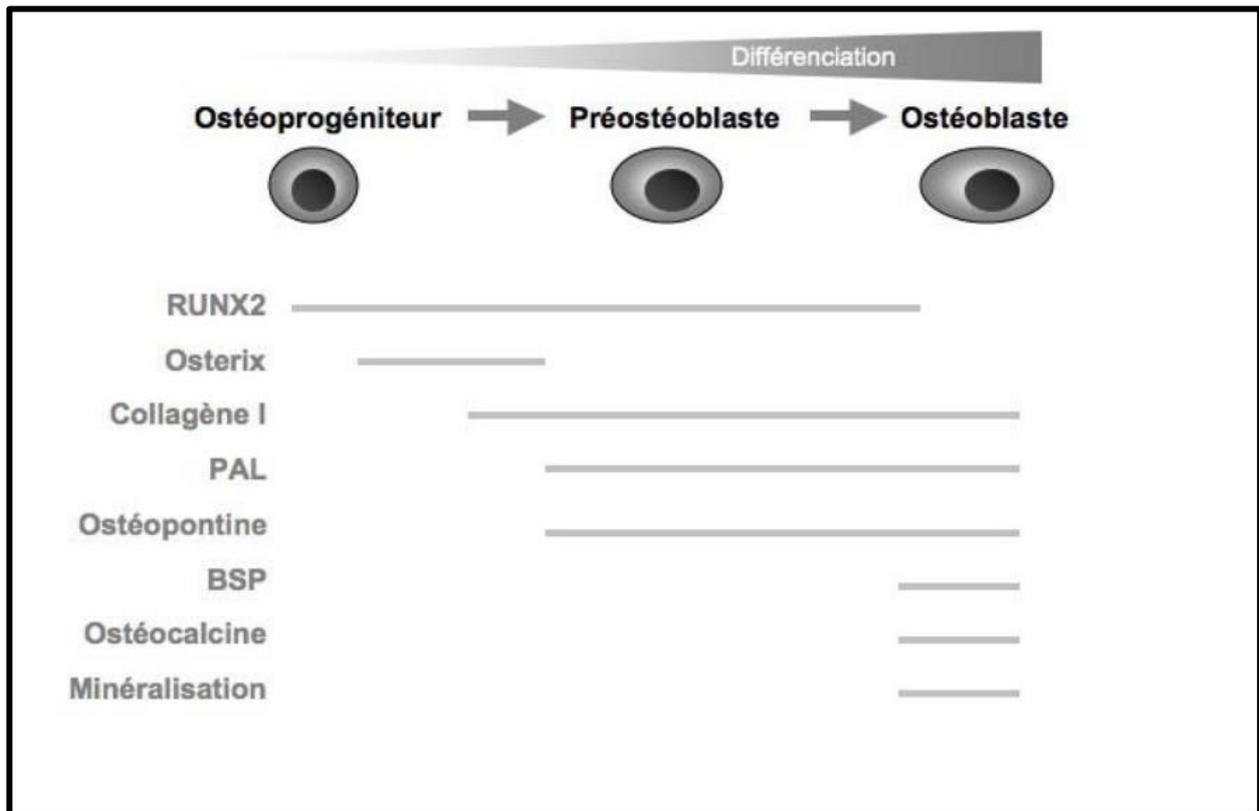


Figure 3 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste, d'après Barré (41)

Les ostéoblastes sont les seules cellules de l'organisme capables de synthétiser une MEC osseuse calcifiée. Ils interviennent dans la synthèse de la matrice organique et dans sa minéralisation. Cette capacité est reflétée par l'abondance en phosphatase alcaline membranaire et la richesse en organites impliqués dans la synthèse protéique, notamment le réticulum endoplasmique rugueux (organite orienté vers la production de protéine) et l'appareil de Golgi (organite de tri, de modification et de sécrétion de protéines). L'ostéoblaste et ses précurseurs ont également pour rôle la production de molécules solubles régulatrices (ostéoprotégérine OPG, Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand RANKL) et de cytokines (M-CSF Macrophage-Colony Stimulating Factor, TNF $\alpha$  Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Interleukine IL-1, IL-6, IL-11), relargués dans le milieu extra-cellulaire et agissant au niveau des cellules précurseurs des ostéoclastes (42). Cette régulation joue un rôle majeur dans le contrôle de la résorption ostéoclastique et de la masse osseuse.

La face de l'ostéoblaste appliquée à la surface osseuse comporte des prolongements cytoplasmiques qui s'enfoncent dans la matrice osseuse et atteignent les ostéocytes présents au cœur du tissu osseux sous-jacent. Les ostéoblastes sont unis par des jonctions communicantes (gap), et sont séparés de la matrice osseuse par une substance amorphe non encore calcifiée. Cette communication avec les ostéocytes et entre ostéoblastes est permise entre autres par la connexine 43 (protéine de jonction communicante). Ces jonctions sont essentielles à la régulation de la maturation des ostéoblastes et à la synchronisation du remodelage osseux (26). A la fin de sa phase de maturation, l'ostéoblaste peut s'enfouir complètement dans la matrice minéralisée et devient ainsi un ostéocyte emprisonné dans des lacunes au sein de la substance nouvellement synthétisée (ostéoplastes). L'activité ostéoformatrice des ostéoblastes s'achève donc par leur différenciation en ostéocytes. Tous

les ostéoblastes ne s'enfouissent pas pour devenir ostéocytes : certains meurent par apoptose, d'autres reviennent à leur phase de repos (cellules bordantes).

#### **I.1.1.1.2.2. Les cellules bordantes**

Les cellules bordantes, de forme elliptique, avec un noyau lui-même aplati, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi peu développés, correspondent à des ostéoblastes au repos (« ostéoblastes quiescents » ou « ostéoblastes en veille »). Elles conservent leurs jonctions communicantes (gap) entre elles grâce à la connexine 43, et sont reliées avec les ostéocytes enfouis dans l'os grâce à des prolongements cytoplasmiques. Le tout forme un réseau connecté (syncytium) de cellules osseuses en veille. Elles peuvent, lorsqu'elles sont sollicitées, redevenir des ostéoblastes actifs.

Les cellules bordantes ont une activité métabolique limitée, mais présente. D'abord, elles joueraient un rôle de régulation de l'activité des ostéoclastes, en protégeant la surface de l'os et en empêchant son accès contre une éventuelle agression incontrôlée des ostéoclastes. Ensuite, lors du remodelage osseux (voir paragraphe I.1.2.1. L'unité multicellulaire de base), elles participent à la formation de la canopée, qui isole la zone remodelée ; et elles dégradent les fibrilles de collagène laissées après la destruction de la matrice par les ostéoclastes, laissant ainsi l'accès libre aux ostéoblastes (43). Enfin, elles peuvent moduler la différenciation des ostéoclastes, en sécrétant (comme toutes les cellules du lignage ostéoblastique) OPG et RANKL, comme explicité dans le paragraphe I.1.1.1.2.4. Les ostéoclastes (26).

#### **I.1.1.1.2.3. Les ostéocytes**

Les ostéocytes correspondent au stade ultime de différenciation des ostéoblastes et sont enfouis dans la matrice osseuse. Ils représentent 90 à 95% des cellules osseuses. Ils sont contenus dans des logettes appelées ostéoplastes, entourées de matrice osseuse calcifiée. Ces lacunes (ostéoplastes) sont reliées entre elles par des prolongements cytoplasmiques (appelés canalicules inter-ostéoplastiques) reliés entre eux par des jonctions communicantes (gap). Ce sont des cellules quiescentes et sénescents (qui ne se divisent plus) avec une durée de vie cellulaire élevée (en moyenne 10 ans).

Les ostéocytes expriment des protéines caractéristiques, comme la sclérostine (SCL) ou la phosphoprotéine matricielle de la dentine 1 (DMP1). La sclérostine, codée par le gène *SOST*, joue un rôle central dans l'homéostasie du tissu osseux, en inhibant la voie WNT (voie décrite dans le paragraphe précédent I.1.1.1.2.1 Les ostéoblastes), ce qui limite l'ostéogenèse dans l'environnement de l'ostéocyte par blocage de la différenciation des MSC dans la voie ostéoblastique (44).

L'ostéoblaste mature, synthétise la matrice extracellulaire puis la calcifie. Petit à petit, par différents mécanismes pas encore totalement identifiées (hypoxie, signalisation par des intégrines à la surface des cellules), l'ostéoblaste se retrouve cloisonné dans la matrice qu'il est en train de synthétiser, ce qui semble être le signal essentiel à sa différenciation en ostéocyte : il diminue son activité sécrétrice, puis développe des prolongements cytoplasmiques pour se connecter aux ostéocytes déjà présents, et aux cellules bordantes grâce aux jonctions communicantes permises par la connexine 43. En outre, les lacunes, (ostéoplastes) qui logent les ostéocytes, leur permettent de recevoir les nutriments et l'oxygène nécessaires grâce aux capillaires à proximité et favorisent les mouvements de fluides interstitiels. Lorsque le tissu se dégrade ou est mal vascularisé, les ostéocytes meurent par apoptose, ce qui est un signal déclencheur de la résorption osseuse par les ostéoclastes.

Les ostéocytes sont capables de mobiliser le calcium et le phosphate sur la surface de l'ostéoplaste, ce qui représente une quantité importante de sels minéraux rapidement échangeables. Ils jouent un rôle dans le renouvellement et l'entretien de la MEC osseuse. Ils sont responsables du maintien de l'homéostasie osseuse.

Les ostéocytes sont aussi des « mécano-récepteurs », ils sont capables de percevoir les forces mécaniques exercées sur le tissu osseux (probablement par déformation de leur cytosquelette). Ainsi, suite au signal ressenti, ils réguleraient l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes environnants, par exemple, en permettant le renforcement d'un tissu osseux dans les suites d'une sollicitation mécanique intense (26).

Enfin, les ostéocytes interviennent dans la régulation de l'ostéoclastogenèse (comme détaillé dans le paragraphe suivant I.1.1.1.2.4. Les ostéoclastes), en exprimant, comme toutes les cellules de la lignée ostéoblastique, RANKL qui stimule la différenciation des pré ostéoclastes en ostéoclastes matures et OPG qui inhibe cette différenciation. Les ostéocytes produisent également M-CSF, cytokine soluble, qui permet le recrutement des pré-ostéoclastes depuis le flux sanguin vers le site de remodelage osseux (voir le paragraphe I.1.2.1. L'unité multicellulaire de base).

#### **I.1.1.1.2.4. Les ostéoclastes**

Les ostéoclastes, cellules géantes et multinucléées d'environ 100 µm de diamètre, dérivent de précurseurs d'origine hématopoïétiques, les précurseurs monocytaires CFU-M (Colony Forming Unit - macrophage), ils appartiennent donc au système immunitaire. La différenciation de pré-ostéoclastes à ostéoclastes matures est sous le contrôle du ligand de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa-B (RANKL). RANKL, identifié en 1999, 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 (45,46). L'activation de RANK par RANKL entraîne la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures. Cette activation se fait essentiellement par une signalisation juxtacrine, nécessitant un contact direct entre les deux types cellulaires (les cellules de la lignée ostéoblastique productrices de RANKL et les ostéoclastes portant RANK). Il existe également, mais de manière moins abondante, une sécrétion de RANKL soluble, activant RANK par signalisation paracrine.

Cette différenciation peut être inhibée par l'OPG, qui se lie à RANKL et l'empêche ainsi d'activer RANK. L'OPG est exprimée par les ostéoclastes matures, mais également, comme décrit plus haut, par les cellules du lignage ostéoblastique (ostéoblastes, cellules bordantes, ostéocytes).

RANKL est exprimé principalement par les cellules souches mésenchymateuses, par les ostéoblastes, les cellules bordantes et surtout par les ostéocytes. Ainsi, l'ostéoclastogenèse (formation des ostéoclastes matures) est un processus impliquant toutes les cellules osseuses d'une zone à remodeler (47). Pour obtenir la différenciation en ostéoclastes matures, il faut à la fois une expression forte de RANKL, et également le blocage de l'expression d'OPG. Le contrôle de cette régulation évolue au cours de la vie de l'individu : des travaux menés chez la souris ont montré que l'expression de RANKL chez le sujet jeune se faisait plutôt par les ostéoblastes et par les chondrocytes des plaques de croissance ; alors qu'elle se faisait plutôt par les ostéocytes chez le sujet âgé (47,48).

Les ostéoclastes assurent les fonctions de dégradation de la matrice : dégradation de la trame organique (le collagène est digéré dans leurs vacuoles par une collagénase) et dégradation

de la matrice minérale (solubilisation des cristaux minéraux, et notamment des sels de calcium, par acidification). Ces fonctions sont détaillées dans le paragraphe I.1.2.1. L'unité multicellulaire de base.

### I.1.1.2. Les différentes variétés de tissu osseux

Il existe 2 catégories de tissus osseux, selon le degré de maturation et/ou le type d'organisation : le tissu osseux réticulaire et le tissu osseux lamellaire (36).

**Le tissu osseux réticulaire** (ou non lamellaire, ou tissu osseux primitif) est transitoire, présent durant l'embryogenèse, puis disparaît au cours du développement. C'est un tissu osseux primitif, immature, qui se forme à partir du tissu conjonctif par ossification intramembraneuse ou endoconjonctive (pour les os plats et les os courts) ou à partir du tissu cartilagineux par ossification endochondrale (pour les os longs). Il est mécaniquement faible. Il est composé de nombreuses cellules disposées sans ordre dans une matrice peu minéralisée, formée de faisceaux de fibres de collagène I à disposition aléatoire (absence d'organisation de la matrice organique). Il ne sera retrouvé chez l'adulte qu'en cas de fractures (avec nécessité d'un remodelage osseux) ou de maladies osseuses (par exemple la maladie de Paget osseuse).

**Le tissu osseux lamellaire** remplace le tissu osseux réticulaire. C'est un tissu secondaire, mature et définitif. Il se caractérise par une MEC disposée en lamelles superposées ou concentriques (les fibres de collagène sont orientées dans une direction unique), lui conférant une grande résistance mécanique. Les lamelles sont séparées les unes des autres par des rangées d'ostéocytes contenus dans leurs ostéoplastes. On distingue deux types de tissus osseux lamellaires matures :

Le tissu osseux compact ( ou os compact ou os haversien) forme la diaphyse et recouvre les métaphyses et les épiphyses des os longs, compose les tables interne et externe des os plats et des os courts (90% du tissu osseux de l'adulte). Il est mécaniquement très résistant, composé de peu de cellules et de 95% de matrice minéralisée. Les lamelles de matrice minéralisée forment des ensembles circulaires nommés ostéons (ou ostéones ou systèmes de Havers) (**Figure 4a**). Ces sous-unités sont des structures cylindriques de 400 nm de long et de 200 nm de large et sont au nombre de  $21 \cdot 10^6$  chez l'adulte. Chaque ostéon est formé de 4 à 6 lamelles osseuses, disposées de manière concentrique autour d'un canal (appelé canal de Havers) (**Figure 4b**). Entre les lamelles, on retrouve les ostéoplastes, contenant les ostéocytes. Ils communiquent entre eux par des canaux appelés canalicules dans lesquels leurs prolongements cytoplasmiques se connectent avec ceux des cellules voisines au moyen de jonctions communicantes. Les canaux de Havers contiennent des vaisseaux sanguins (capillaires et veinules), des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses amyéliniques (sensitives et végétatives). Les ostéons sont en rapport entre eux, en interne avec la cavité médullaire spongieuse (os longs), et en externe avec le périoste par des anastomoses obliques (canaux perforants de Volkmann) (**Figure 4a**).

Le tissu osseux spongieux (ou os spongieux ou os trabéculaire) représente les 10% restant du squelette de l'adulte. Il est essentiellement composé de cellules, la matrice ne représente que 20% du tissu osseux spongieux. Il compose le cœur (le diploé) des os courts et des os plats, ainsi que les épiphyses et les métaphyses des os longs. Il diffère de l'os compact par la taille et le nombre de ses cavités. En effet, il s'organise en structures ressemblant à des nids d'abeille concédant un espace libre important et offrant en même temps une résistance à la compression (à l'écrasement) en toute direction. Il se compose d'un réseau de trabécules (travées) osseuses délimitant une multitude d'espaces libres (**Figure 4c**). Ces cavités médullaires multiples renferment de la moelle osseuse hématopoïétique (moelle rouge) et des vaisseaux. Chaque travée (trabécule), mesurant de 50 nm à 400 nm, est constituée de lamelles de matrice minéralisée concentriques, séparées par des canalicules et organisées en demi-lune.

La surface des trabécules est recouverte d'endoste. L'os spongieux est richement vascularisé.

Les surfaces externes osseuses sont recouvertes d'un tissu osseux conjonctif non spécialisé, le périoste (49,50). Il est composé de trois couches. La couche externe est inélastique fibreuse composée de collagène, de fibroblastes et d'un important réseau neurovasculaire vascularisant et innervant l'os. La couche intermédiaire est fibroélastique, essentiellement composée de fibres élastiques. La couche interne, nommée le cambium est essentiellement cellulaire : cellules souches mésenchymateuses, cellules ostéoprogénitrices, ostéoblastes, fibroblastes. Le périoste est ancré à la surface de l'os par des fibres de collagène perforantes appelées fibres de Sharpey. Il joue un rôle essentiel dans la réparation tissulaire osseuse. Il participe également à la vascularisation et à l'innervation du tissu osseux.

Les surfaces internes osseuses sont recouvertes d'une fine couche de tissu conjonctif nommé endoste. Il tapisse la cavité médullaire, les canaux de Havers et les canaux perforants de Volkmann de l'os compact, les trabécules de l'os spongieux. Sa composition est proche de la couche interne du périoste, à savoir peu fibreuse et riche en cellules.

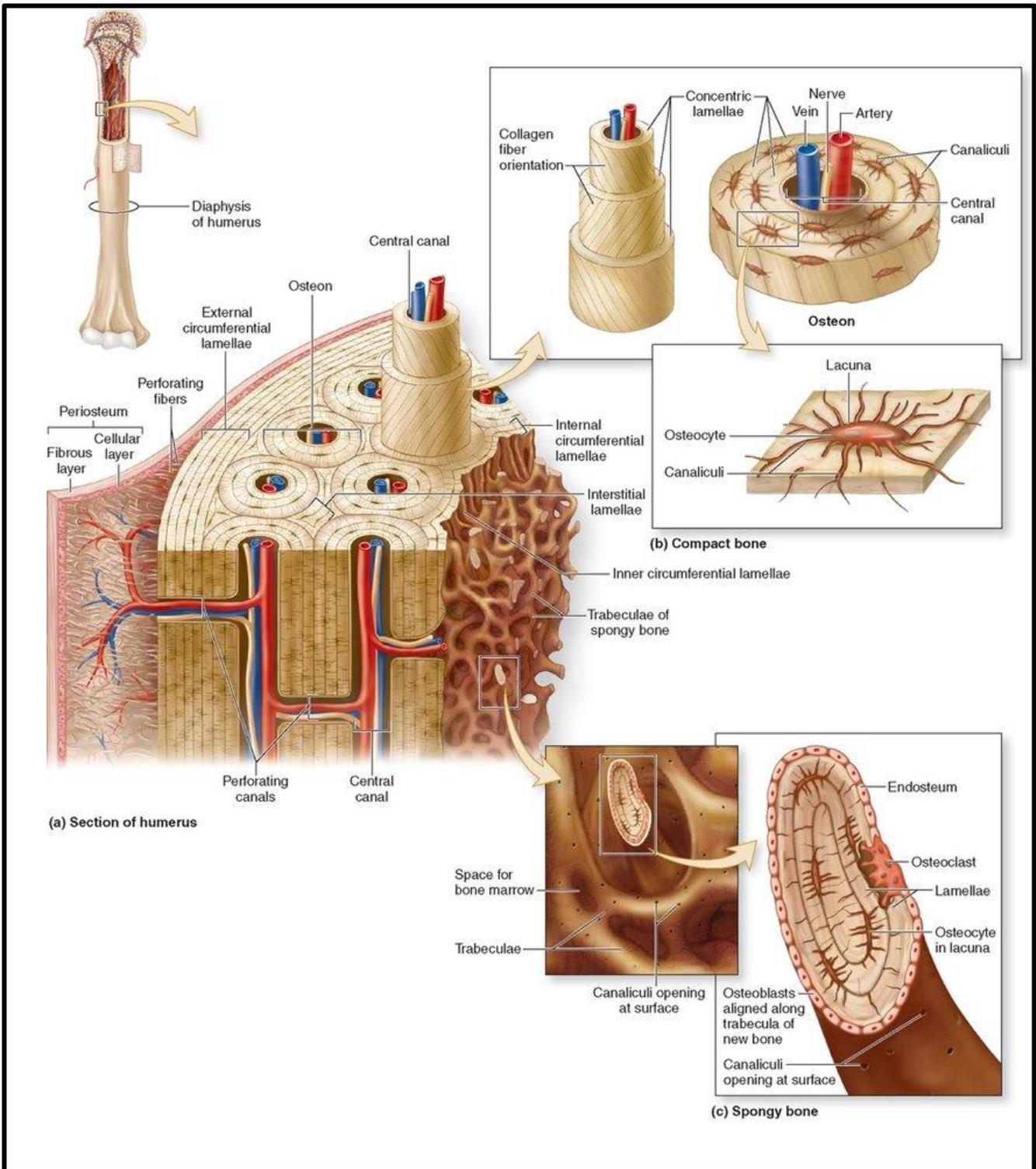


Figure 4 : Organisation structurelle anatomique de la diaphyse d'un os long type humerus (a) : tissu osseux lamellaire compact (b) et spongieux (c) d'après Mescher (51)

### I.1.1.3. Les os

Le corps humain adulte est composé de 206 os, que l'on peut répartir anatomiquement en plusieurs familles. Les os longs soutiennent le poids du corps et favorisent la locomotion, ce sont les os du squelette appendiculaire (humérus, fémur, ...). Les os plats protègent les organes (côtes, os crâniens, scapulas, ...). Les os courts, cubiques, presque aussi longs que larges, permettent une stabilité et une certaine amplitude de mouvements dans les articulations du poignet (os carpiens) et de la cheville (os tarsiens). Les os irréguliers, ne rentrant dans aucune des autres familles, ont des formes variables souvent complexes (vertèbres, pubis, osselets ...). Les os sésamoïdes, intégrés dans les tendons des mains, des genoux ou des pieds, servent à les protéger des tensions et de l'usure (patella, ...). Ces différentes formes d'os sont la résultante de l'organisation spatiale des différentes catégories de tissu osseux décrites au chapitre précédent.

#### I.1.1.3.1. Les os longs

Les os longs soutiennent le poids du corps et permettent la locomotion. Ils sont ainsi fortement soumis aux contraintes mécaniques et doivent posséder une résistance forte aux tensions (52). De par leur position au niveau du squelette appendiculaire et leur fonction dans la motricité, ce sont les os les plus exposés aux traumatismes et donc aux fractures. Leur bonne consolidation est essentielle pour pouvoir à nouveau exercer leurs propriétés mécaniques et redonner une qualité de vie au patient.

La **Figure 5** représente une coupe schématique d'un os long, composé de plusieurs régions :

- un long corps central, la diaphyse, essentiellement composée d'os compact. Le cœur de la diaphyse est constitué d'une cavité creuse, le canal médullaire, tapissé d'endoste et contenant la moelle osseuse jaune composée d'adipocytes, de vaisseaux et de terminaisons nerveuses ;
- deux parties terminales, les épiphyses proximale et distale ;
- deux parties intermédiaires, les métaphyses proximale et distale ;
- à noter la présence de cartilage de conjugaison (ou cartilage de croissance ou plaque de croissance), entre épiphyse et diaphyse, zone de croissance osseuse en longueur, qui disparaît vers l'âge de 20 ans pour laisser la ligne épiphysaire.

Les épiphyses et les métaphyses sont essentiellement composées d'os spongieux, recouvert d'une fine couche d'os compact. La moelle osseuse rouge hématopoïétique est donc retrouvée principalement dans ces régions, dans les cavités délimitées entre les travées (53).

A chaque extrémité, les épiphyses sont recouvertes de cartilage articulaire, qui est en contact, au niveau de l'articulation, avec le cartilage articulaire de l'os adjacent.

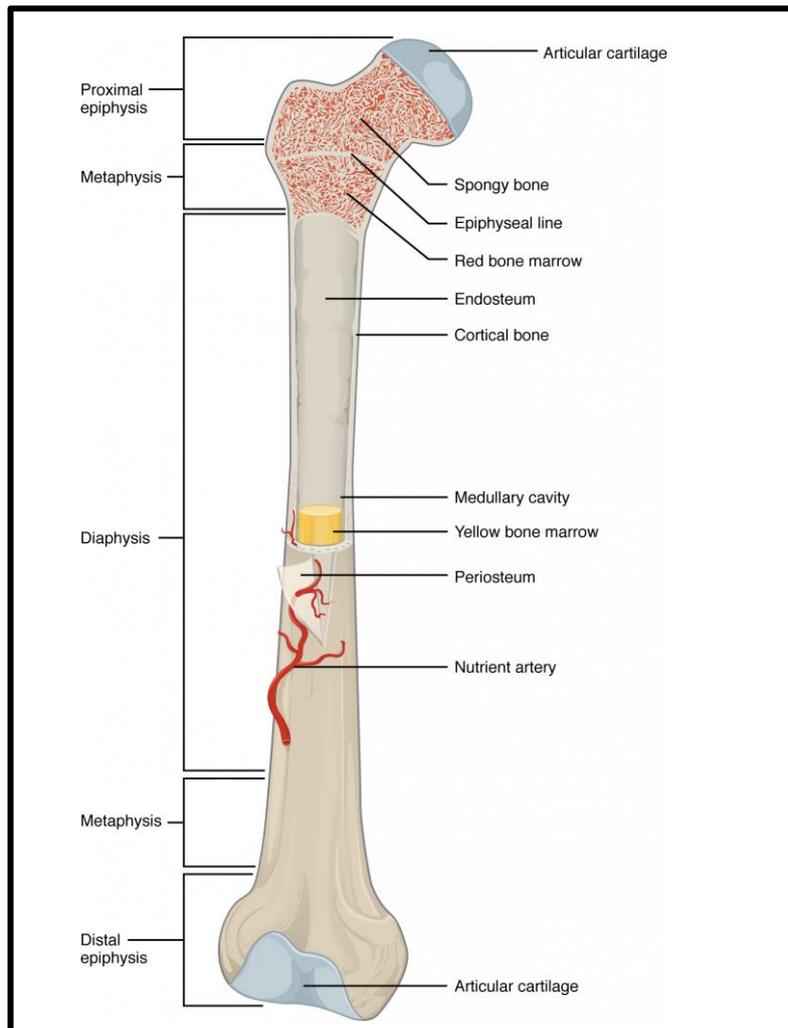


Figure 5 : Schéma de l'anatomie d'un os long, d'après Biga (54)

### I.1.1.3.2. Les os plats

Les os plats jouent un rôle de protection des organes : la cage thoracique (sternum, côtes, scapulas) protège le système cardio-pulmonaire, les os du crâne protègent le cerveau, et ceux du pelvis (ischion, pubis) les organes uro-gynéco-digestifs. Ils sont aussi le lieu d'ancrage des muscles et tendons. Ce sont les os les plus nombreux du corps humain. La **Figure 6** schématise l'os pariétal, un os plat, composé :

- de deux fines couches d'os compact externe et interne, recouverte de périoste,
- d'une zone plus épaisse, centrale, d'os spongieux.

Les os plats hébergent ainsi 80% de la moelle osseuse rouge hématopoïétique du corps humain (dans l'os spongieux central).

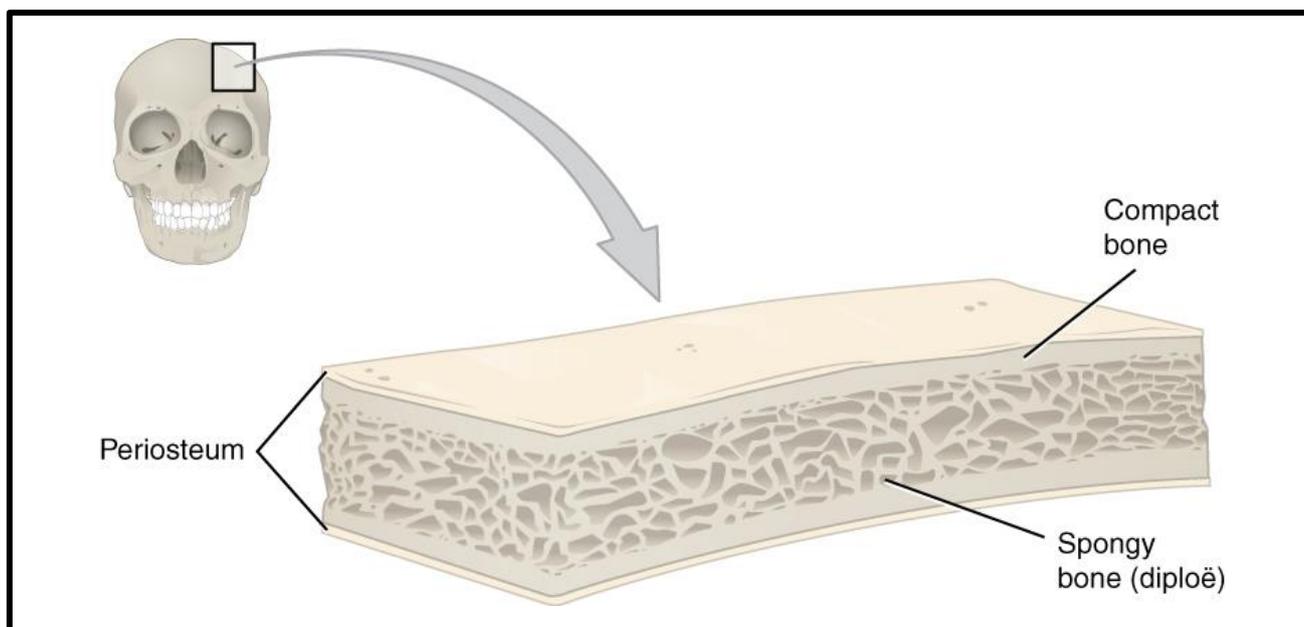


Figure 6 : Schéma de l'anatomie d'un os plat, d'après Biga (54)

#### I.1.1.4. Les propriétés et les fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux assure une fonction mécanique (55). Il se différencie des autres tissus conjonctifs par sa capacité à se minéraliser en formant des cristaux d'hydroxyapatite. Ainsi, il est à la fois rigide et résistant aux forces de traction et de torsion ; mais également flexible et élastique aux forces de compression. Grâce à ces propriétés, le squelette maintient le corps (dans sa forme et dans sa taille) et permet la locomotion (mouvements par ancrage des muscles squelettiques aux os par les tendons). Résistant aux contraintes mécaniques (notamment grâce à la minéralisation de sa matrice), il est également protecteur des organes vitaux internes (cœur-poumons, système nerveux) (56).

Sa fonction métabolique est également essentielle (57). Il contrôle notamment le métabolisme phospho-calcique. Le tissu osseux constitue la plus grande réserve en calcium de l'organisme. Les échanges entre tissu osseux et organisme sont contrôlés par des facteurs calciotropes (parathormone PTH, vitamine D, calcitonine) permettant la régulation de la calcémie à un taux fixe (58). Le paragraphe I.1.2.3.2. Le rôle des facteurs systémiques développe ce point. La concentration plasmatique en calcium (calcium total) est ainsi maintenue dans des limites étroites entre 2,2 et 2,6 mmol/L chez l'adulte. Par le biais des mêmes mécanismes, le tissu osseux régule le métabolisme du phosphore. Il constitue également un réservoir de sels minéraux en permettant leur stockage ou leur libération.

Par ses rôles de régulation de la thermogenèse dans les adipocytes ou de la sécrétion d'insuline dans le pancréas, au moyen de sécrétions endocrines, il joue également une fonction énergétique (59).

Enfin, le tissu osseux abrite l'hématopoïèse (ensemble des mécanismes assurant la production continue et régulière des différentes cellules sanguines) au cœur de la moelle osseuse hématopoïétique (ou hématogène) : les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules différenciées de trois lignées : érythrocytes, plaquettes, cellules de l'immunité, ainsi qu'aux cellules précurseurs impliquées dans le remodelage osseux, les ostéoclastes.

Le tissu osseux, tissu conjonctif spécialisé composé de cellules osseuses dispersées dans une MEC abondante minéralisée, possède des fonctions mécaniques, énergétiques, métaboliques et hématopoïétiques. Son organisation et ses propriétés diffèrent en fonction des zones de tissu osseux compact cortical ; ou tissu osseux spongieux. Il constitue majoritairement les os du squelette.

### I.1.2. Les grands principes de l'ostéogenèse

L'ostéogenèse signifie formation de tissu osseux (55). C'est un processus de métaplasie (transformation d'un tissu cellulaire différencié en un autre tissu cellulaire différencié) au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. Au cours de la vie, se succèdent trois types d'ossification :

- L'ossification primaire : elle a lieu durant l'embryogenèse. Elle débute par la condensation des cellules mésenchymateuses, étape initiée par l'expression de différents facteurs de croissance, dont les BMPs, les FGFs (Fibroblast Growth Factor) et le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta) (60). Selon la nature des signaux, deux types d'ossification sont observés : l'ossification intramembraneuse ou endoconjonctive, caractérisée par la différenciation des cellules mésenchymateuses directement en ostéoblastes (observée dans les os plats) ; et l'ossification endochondrale caractérisée par un intermédiaire cartilagineux nécessaire à l'ossification (observée dans les os longs). Cela aboutit, dans les deux cas, à la formation du tissu osseux primaire, ou réticulaire (décrit au paragraphe I.1.1.2. Les différentes variétés de tissu osseux).
- L'ossification secondaire : elle a également lieu durant l'embryogenèse. Elle correspond à la destruction du tissu osseux primaire par les ostéoclastes puis reconstruction d'un tissu osseux secondaire par les ostéoblastes, tissu lamellaire compact ou spongieux (décrit au paragraphe I.1.1.2. Les différentes variétés de tissu osseux).
- L'ossification tertiaire correspond au remodelage osseux. C'est un équilibre permanent entre destruction et reconstruction durant toute la vie de l'individu. Il permet le maintien de la masse osseuse au cours de la vie adulte normale.

La synthèse du tissu osseux commence donc dès la phase embryonnaire pour atteindre un pic de masse osseuse en moyenne 2 ans après la puberté chez la femme et 3 ans chez l'homme. Par la suite, 5 à 10% de la masse osseuse se renouvelle chaque année (61). Le remodelage osseux est en général en équilibre, mais peut, selon les besoins, faire pencher la balance du côté formation (lors de la croissance ou lors de la cicatrisation d'une fracture) ou du côté destruction (diminution du capital osseux avec le vieillissement). Ce processus continu de remodelage osseux permet d'assurer la réparation des petits traumatismes, de contrôler le taux de calcium dans l'organisme, et de moduler la résistance du tissu osseux en fonction des sollicitations mécaniques (62). Le remodelage osseux est principalement dû à l'action couplée des ostéoclastes, qui dégradent l'os (résorption) et des ostéoblastes qui fabriquent un nouveau tissu osseux (ostéogenèse). Il se déroule au sein de l'unité multicellulaire de base UMB (BMU: Basal Multicellular Unit).

### I.1.2.1. L'unité multicellulaire de base (UMB)

Le remodelage osseux s'effectue au sein de petites structures appelées UMB, à différents endroits sur l'ensemble du tissu osseux, ce qui permet son renouvellement constant. La **Figure 7** schématise la composition d'une UMB, qui correspond à un compartiment de remodelage osseux.

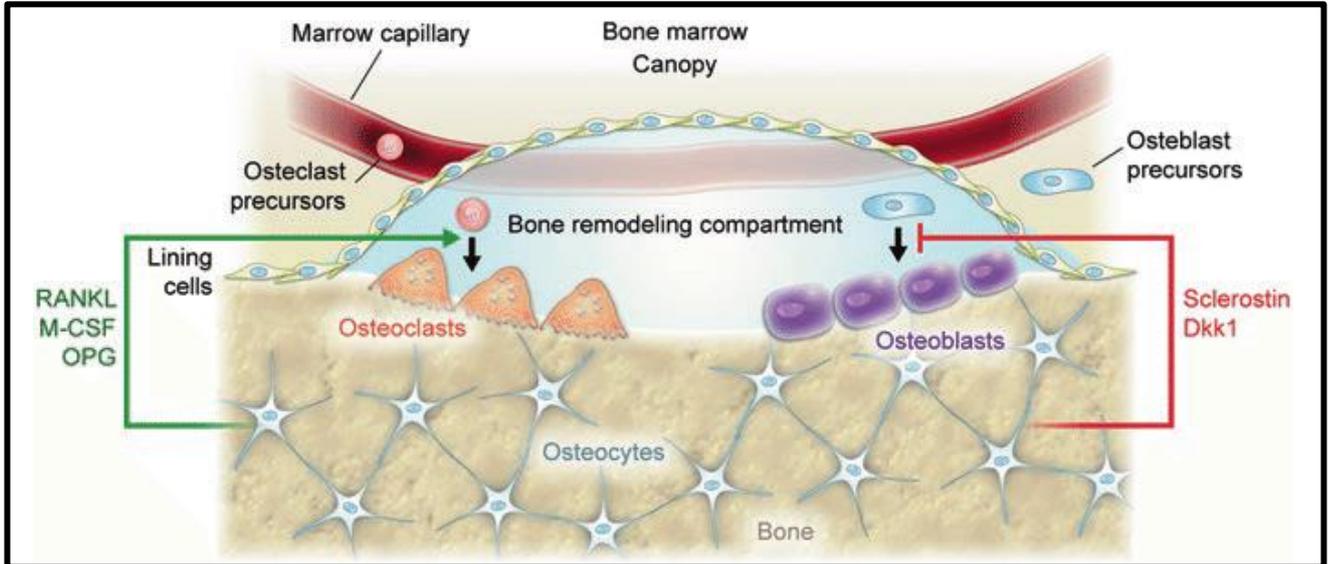


Figure 7 : Représentation schématique d'une UMB et du compartiment de remodelage osseux, d'après Gasser (63)

Chaque UMB est composée de cellules osseuses et alimentée par un capillaire sanguin. Elle a une forme de cylindre sur l'ostéon de l'os compact cortical, et une forme de tranchee sur l'os spongieux. Elle comprend trois zones :

- la canopée, tissu conjonctif composé de cellules bordantes, qui recouvre l'UMB et la cloisonne dans l'espace. La canopée est connectée à un capillaire de la moelle osseuse, permettant ainsi l'arrivée sur le site de remodelage des précurseurs ostéoclastiques, ainsi que l'apport en nutriments et en oxygène essentiels aux cellules de l'UMB.
- La surface de l'os, sur laquelle sont situés les ostéoclastes matures et les ostéoblastes matures. Les ostéoclastes résorbent l'os, tandis que les ostéoblastes forment une nouvelle matrice osseuse.
- L'intérieur de l'os, dans lequel sont nichés les ostéocytes, qui régulent ce processus de remodelage. Comme explicité dans le paragraphe I.1.1.1.2.3. Les Ostéocytes, les ostéocytes participent au recrutement des pré-ostéoclastes grâce à la sécrétion de M-CSF et à leur maturation en ostéoclastes par la signalisation RANKL et OPG. En parallèle, en exprimant la sclérostine qui inhibe la voie WNT, les ostéocytes bloquent la différenciation des MSC dans la voie ostéoblastique, et limitent ainsi la formation osseuse (44,64).

La détermination de la zone de remodelage (la création de l'UMB) peut se faire soit par les ostéocytes lorsqu'une zone osseuse doit être remodelée (fracture, vieillissement), soit par sélection aléatoire sous le contrôle de la PTH dans le cadre de l'homéostasie phosphocalcique (62).

### I.1.2.2. Le cycle de remodelage osseux

Un cycle de remodelage osseux dure en moyenne 4 mois. Il est plus court au niveau de l'os compact cortical (celui de l'os alvéolaire de la mandibule dure environ 3 mois), et plus long au niveau de l'os spongieux (celui des os de la voûte crânienne peut durer jusqu'à 2 ans). Cette période dépasse donc la durée de vie des cellules composant l'UMB (environ 15 jours pour les ostéoclastes et deux-trois mois pour les ostéoblastes), et cela nécessite la formation de nouveaux ostéoblastes et de nouveaux ostéoclastes durant une phase de remodelage. Cette formation de nouvelles cellules osseuses est sous le contrôle des ostéocytes environnants.

Le cycle de remodelage osseux est initié et orchestré par les ostéocytes, qui sont intégrés dans l'os minéralisé et communiquent via des ramifications de processus dendritiques. L'initiation du remodelage osseux peut résulter de signaux locaux, comme des changements dans la charge mécanique au niveau d'une zone sur-sollicitée (les ostéocytes sont des mécano-récepteurs) ou des dommages structurels (zone osseuse dégradée, fracturée ou hypoxique) entraînant une apoptose des ostéocytes. Le remodelage osseux peut aussi être initié sur une zone aléatoire, sous l'action de facteurs systémiques ou paracrines ostéorésorbants (PTH, vitamine D3, prostaglandines, ...), pour répondre à un besoin d'homéostasie phospho-calcique.

Lors d'un cycle de remodelage osseux, 5 phases se succèdent (36,65) (**Figure 8**):

- La phase d'activation : les cellules bordantes se rétractent et laissent libre la surface osseuse. Les pré-ostéoclastes, quant à eux, sont recrutés depuis la circulation sanguine sous l'effet du M-CSF sécrété par les ostéocytes, puis ils se différencient en ostéoclastes matures par la signalisation RANKL pour venir adhérer à la surface osseuse (ils se fixent à la matrice par des intégrines). L'UMB est ainsi délimitée.
- La phase de résorption à proprement parler, également nommée ostéoclasie : durant deux semaines en moyenne, les ostéoclastes matures dégradent la matrice. Les cristaux d'hydroxyapatite de la matrice minérale sont solubilisés par acidification (baisse du pH par excrétion de  $H^+$  et  $Cl^-$ ) à la suite de l'activation d'une pompe à proton : l'anhydrase carbonique de type II, localisée au niveau de la bordure en brosse de l'ostéoclaste. Il se forme ainsi une chambre de résorption (ou lacune de Howship) dans laquelle sont déversées par exocytose des enzymes protéolytiques lysosomales entraînant la dégradation de la matrice organique : TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase), MMP 13 et 14 (collagénases qui dégradent les fibres de collagène par exemple), cathepsine K. Lorsque les ostéoclastes ont terminé de dégrader une zone, soit ils meurent par apoptose, soit ils sont recrutés vers un nouveau cycle de résorption (62,66).
- La phase d'inversion ou de réversion : durant 4 à 6 semaines, plusieurs types cellulaires arrivent sur site pour nettoyer les débris cellulaires et de matrice laissés à la suite de la dégradation par les ostéoclastes. Il peut s'agir de cellules mononucléées de type macrophagiques, d'ostéomacs (macrophages résidents localisés à la surface des os), de cellules bordantes (rôle de dégradation des fibrilles de collagène). Puis, les cellules bordantes déposent une fine couche de matrice minéralisée, sans collagène, permettant l'adhérence des ostéoblastes à cette zone. Les progéniteurs ostéoblastiques sont recrutés sur la zone, et se différencient en ostéoblastes matures.
- La phase de formation : elle peut durer jusqu'à 4 mois durant lesquels les ostéoblastes produisent une matrice organique riche en collagène (ostéoïde) puis la minéralisent.

L'ostéogénèse, processus par lequel l'hydroxyapatite biologique est déposée dans la MEC, correspond à la formation du tissu osseux depuis l'activation des cellules progénitrices (phase d'inversion) jusqu'à l'étape finale de minéralisation (phase de formation et de minéralisation).

- La phase de terminaison (ou phase quiescente) : en réponse à la sécrétion de facteurs anti-ostéogéniques, comme la sclérostine (notamment par les ostéocytes), les ostéoblastes meurent par apoptose, ou se transforment en cellules bordantes (ostéoblastes quiescents) ou en ostéocytes inclus dans l'os. La surface de l'os est ainsi recouverte de cellules bordantes, qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la MEC.

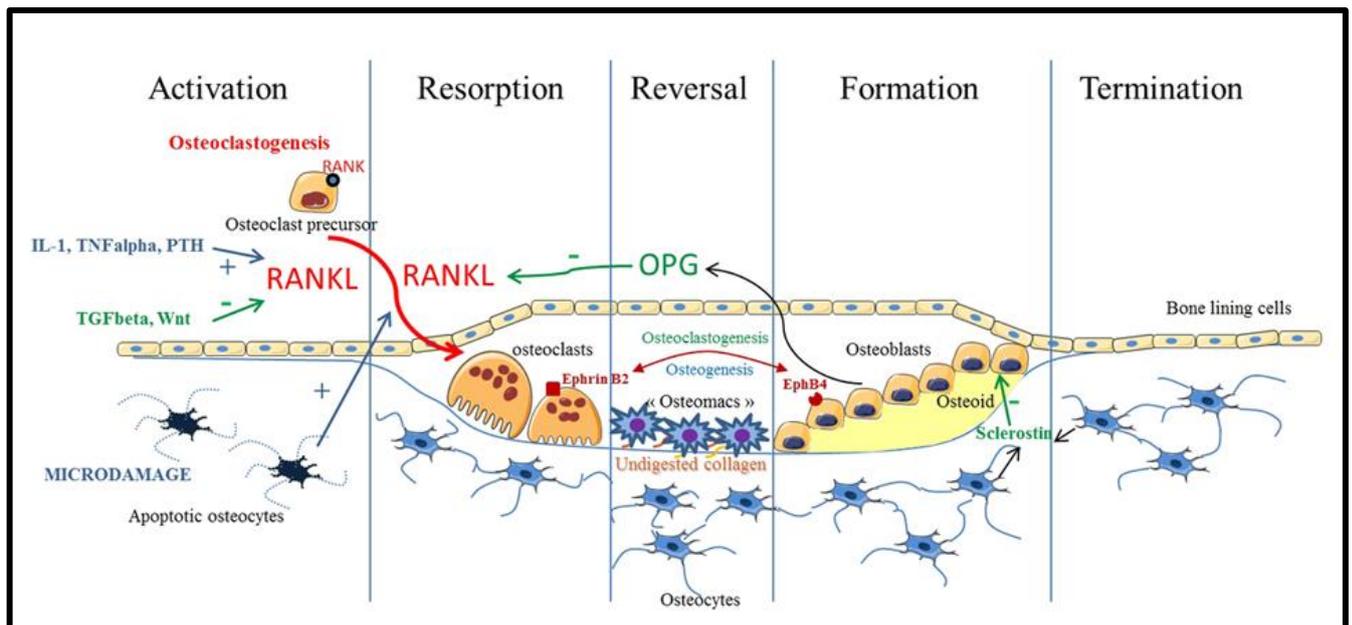


Figure 8 : Les cinq phases d'un cycle de remodelage osseux, d'après Florencio-Silva (26)

### I.1.2.3. Le contrôle du remodelage osseux

Le bon déroulement du remodelage osseux nécessite des interactions étroites entre les cellules osseuses, la moelle osseuse et la matrice ; régulées par des facteurs solubles synthétisés par les cellules osseuses ou intégrés dans la matrice.

La régulation de ce remodelage osseux est assurée par la communication cellulaire et par de multiples facteurs systémiques. Ces facteurs peuvent exercer un effet pro-formation osseuse, ou pro-résorption osseuse, ou même les deux. La **Figure 9** ci-dessous résume les différents acteurs intervenant dans la régulation du remodelage osseux.

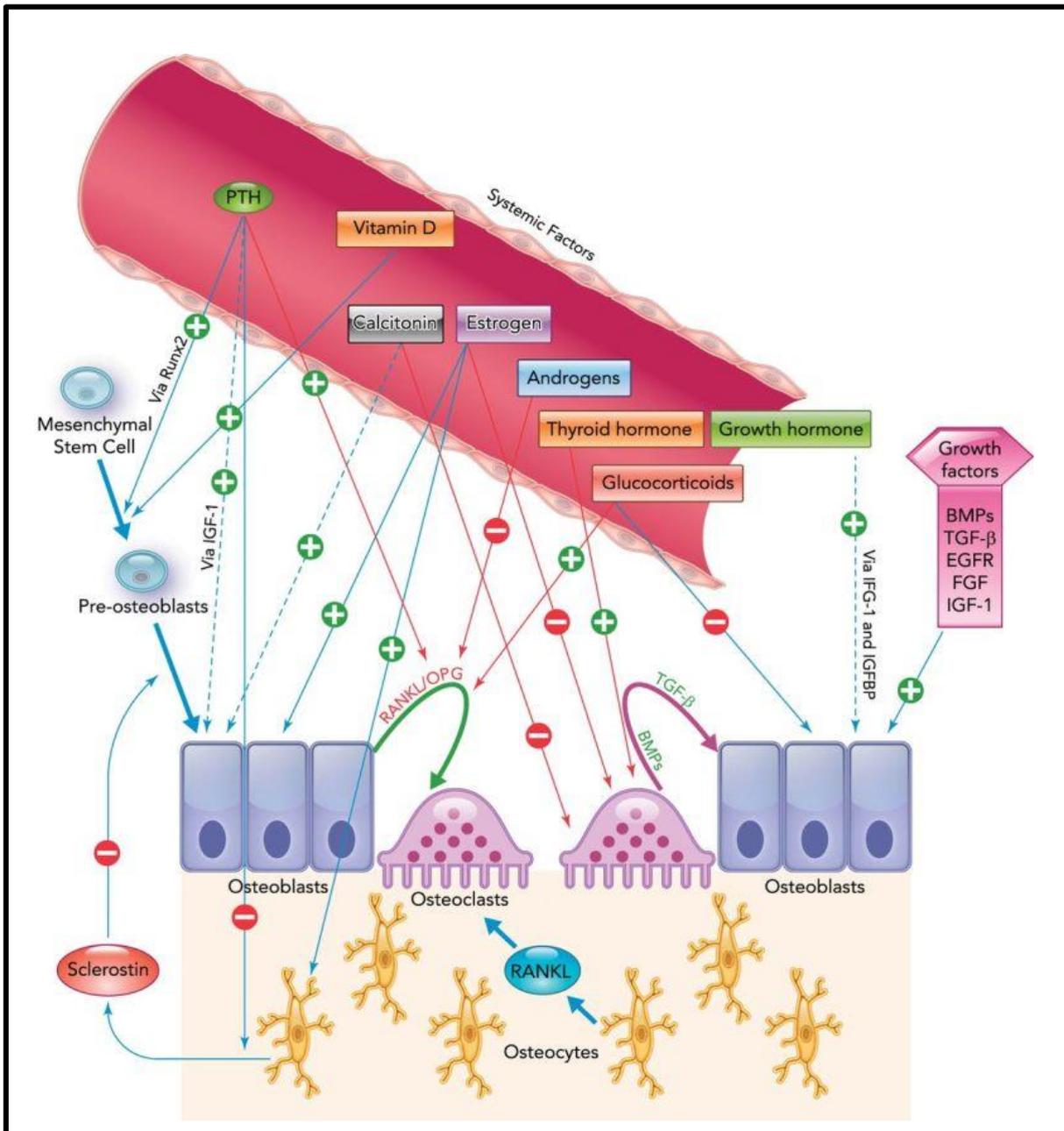


Figure 9 : Facteurs systémiques et locaux de régulation du remodelage osseux, d'après Siddiqui (67)

### I.1.2.3.1. Le rôle des interactions cellulaires

La communication intercellulaire est nécessaire à la synthèse organisée des protéines osseuses par l'ostéoblaste *in vivo* et permet ainsi une régulation du remodelage osseux. Par exemple, les jonctions communicantes de type *gap* formées par les connexines contrôlent également l'activité fonctionnelle des ostéoblastes. Ainsi, la surexpression des connexines 43 et 45 fait varier l'expression dans les ostéoblastes de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse (68). *In vivo*, l'invalidation de la connexine 43 chez la souris altère la fonction ostéoblastique et entraîne un retard d'ossification (par altération de minéralisation de la MEC par les ostéoblastes) (69). Un autre exemple est la N-cadhérine, molécule d'adhésion intercellulaire, qui stimule l'induction des gènes de différenciation, dont RUNX2, dans les ostéoblastes (70).

### **I.1.2.3.2. Le rôle des facteurs systémiques**

Il s'agit principalement d'hormones, secrétées par les organes endocrines. Elles peuvent avoir des fonctions pro-formation osseuse ou pro-résorption osseuse, certaines sont même capables d'exercer les deux fonctions selon le contexte.

L'hormone parathyroïdienne ou parathormone (PTH) est la principale hormone de l'homéostasie phosphocalcique, elle est synthétisée et secrétée par les glandes parathyroïdes. Elle exerce un effet pro-formation à petites doses intermittentes (71). Elle se fixe sur le PTH-R des ostéoblastes et favorise ainsi la formation osseuse. Certains effets de la PTH sur les ostéoblastes pourraient être secondaires à l'induction de facteurs de croissance locaux comme l'IGF (Insulin-like Growth Factor) ou le TGF $\beta$ . Elle stimule aussi la prolifération et la différenciation de la lignée ostéoblastique par l'activation de la voie RUNX2 et l'inhibition de l'expression de la sclérostine par les ostéocytes. Elle exerce un effet pro-résorption à forte dose constante, en stimulant l'expression de RANKL et inhibant celle de OPG chez les cellules du lignage ostéoblastique, ce qui entraîne la maturation des ostéoclastes.

La 1,25(OH)<sub>2</sub>-dihydroxyvitamine D3 - la forme active de la vitamine D – participe également au maintien de l'homéostasie phospho-calcique. Sur le plan osseux, elle exerce un effet pro-formation par promotion de la différenciation des ostéoblastes (stimulation de l'expression de gènes ostéoblastiques tels que OPN ou OCN) (72).

Les œstrogènes, hormones sexuelles femelles, exercent un effet pro-formation. D'une part, elles agissent sur les ostéoblastes en se fixant sur leur récepteur, notamment de type  $\beta$ , et augmente leur prolifération et leur différenciation (73). Elles ont de plus des effets anti-apoptotiques sur les ostéoblastes qui sont indépendants de l'activité transcriptionnelle de leurs récepteurs (74). D'autre part, elles agissent sur les ostéoclastes en bloquant la signalisation RANKL, en modulant l'expression de cytokines pro-résorption comme IL-1, IL-6, le TNF- $\alpha$  et M-CSF.

Les androgènes, hormones sexuelles mâles, exercent un effet pro-formation par deux voies. D'une part, elles inhibent le système RANK/RANKL/OPG chez les cellules du lignage ostéoblastique entraînant ainsi une inhibition des ostéoclastes. D'autre part, elles augmentent la sécrétion par les ostéoblastes de collagène de type 1, d'OCN et l'activité de l'ALP.

La calcitonine exerce un effet pro-formation d'une part par inhibition de la formation de la bordure en brosse des ostéoclastes (et blocage ainsi de la résorption osseuse) et réduction de leur nombre. D'autre part, elle favorise la différenciation des ostéoblastes et inhibe leur apoptose, ainsi que celle des ostéocytes.

L'hormone de croissance (GH Growth Hormone) exerce un effet pro-formation en agissant directement (ou via la voie de l'IGF-1 de concert avec la PTH) sur les ostéoblastes en stimulant leur différenciation et leur prolifération.

Les glucocorticoïdes exercent des effets pro-résorption. D'une part, ils stimulent l'expression de RANKL et inhibent celle de l'OPG par les cellules du lignage ostéoblastique, ce qui induit une augmentation de la différenciation des ostéoclastes (42). D'autre part, à long terme, ils agissent directement sur les ostéoblastes en inhibant leur prolifération et leur différenciation, ainsi qu'en stimulant leur apoptose (75). Leur effet pro-résorption est également visualisé par diminution de la sécrétion des œstrogènes et des androgènes (deux familles d'hormones pro-formation).

L'hormone thyroïdienne triiodothyronine, T3, forme active des hormones thyroïdiennes, exerce également un effet pro-résorption par stimulation directe ou indirecte (modulation de l'expression de cytokines pro-résorption) de l'activité ostéoclastique. Elle a cependant un effet stimulant sur la différenciation des ostéoblastes, mais inhibe leur prolifération.

### **I.1.2.3.3. Le rôle des facteurs locaux**

De nombreux facteurs locaux non hormonaux régulent le remodelage osseux. Ces facteurs peuvent agir en tant que facteurs autocrines ou paracrines ou servir de relais pour les hormones (comme nous venons de le voir au paragraphe précédent). Les facteurs les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes et qui s'incorporent dans la MEC.

Les BMP (BMP-2, -4, -5, -6 et -7) sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental pro-formation. Les BMP agissent à plusieurs étapes, en augmentant l'expression de RUNX2 dans les précurseurs ostéoblastiques (favorisant ainsi l'orientation de la différenciation des MSC vers la lignée ostéoblastique) et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques (ALP, collagène de type I, OCN) dans les ostéoblastes (76). Contrairement aux autres BMP, la BMP-3 inhibe la différenciation des cellules ostéoprogénitrices induite par la BMP-2. Les BMP sont essentiellement secrétées par les ostéoblastes, les MSC et les ostéocytes. En condition de régénération tissulaire osseuse, les chondrocytes et les cellules endothéliales peuvent également sécréter des BMP.

Le TGF $\beta$  est un facteur local fondamental dans le contrôle du remodelage osseux. Le TGF $\beta$  est produit sous forme latente par les ostéoblastes, puis stocké dans la matrice osseuse organique en association avec une protéine de transport (LTBP : Latent TGF-beta Binding Protein), et enfin libéré lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes (77,78). Le TGF $\beta$ 1 exerce un effet pro-formation en stimulant l'apoptose des ostéoclastes, tandis que le TGF $\beta$ 2 exerce un effet pro-résorption en stimulant l'activité des ostéoclastes. De même, il exerce des effets opposés sur les ostéoblastes (79). D'une part, il est pro-formation en stimulant les premières étapes de la différenciation et de la prolifération des ostéoblastes. Il stimule également le dépôt de protéines dans la MEC organique (collagène de type 1, OP) et inhibe la dégradation de la MEC organique par blocage de l'activité de la collagénase (61). D'autre part, il exerce un effet pro-résorption en freinant la maturation complète des ostéoblastes.

Les FGFs sont des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes (80). Ils ont des fonctions pro-formation. FGF-2 est essentiel à l'action pro-formation de la PTH et de BMP-2, et participe à la stimulation de la différenciation des MSC dans la voie ostéoblastique. Les effets des FGF dépendent du stade de différenciation cellulaire. Les FGF stimulent la prolifération ostéoblastique mais inhibent l'expression de plusieurs gènes ostéoblastiques dans les pré-ostéoblastes. En revanche, un traitement à long terme par le FGF-2 augmente la population de cellules pré-ostéoblastiques et l'ostéogenèse. Bien que le FGF-2 module l'expression des gènes ostéoblastiques, une partie de ses effets anaboliques sont indirects, induits par une stimulation de la production de TGF- $\beta$ , d'IGF-I, d'IGF-II et d'IGFBP (IGF-Binding Protein) par les ostéoblastes. L'activité biologique des FGF dépend de leur liaison à leur récepteur de haute affinité, les FGFR (FGF receptors). FGFR1 inhibe la maturation des ostéoblastes, alors que FGFR2 régule positivement l'activité de ces derniers. Des mutations activatrices des FGFR induisent une ostéogenèse prématurée et sont associées à la majorité des formes d'achondrodysplasie. Le gain de fonction des FGFR induit

une augmentation de la différenciation des ostéoblastes (81), ce qui démontre l'importance des interactions FGF/ FGFR dans le contrôle de l'ostéoblaste.

L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) maintient l'équilibre entre formation et résorption. D'un côté, ce facteur de croissance stimule la différenciation des MSC en pré-ostéoblastes et diminue l'apoptose des ostéoblastes, de l'autre il stimule la différenciation des ostéoclastes en maintenant l'expression de RANKL/RANK (82). Comme décrit plus haut, il intervient également de concert avec les hormones PTH et GH dans leur effet pro-formation. Comme pour les TGF, son activité biologique est dépendante de sa liaison à une protéine de transport IGFBP, principalement l'IGFBP-3 et l'IGFBP-5, protéine produite par les ostéoblastes, incluse dans la matrice osseuse et contrôlée par des protéases spécifiques.

Les EGF (Epidermal Growth Factor) et leur récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) ont des fonctions qui peuvent paraître contradictoires. EGFR stimule la formation osseuse, alors que ses ligands EGF inhibent la différenciation des ostéoblastes et diminuent l'expression des facteurs de transcriptions ostéogéniques RUNX2 et Ostérix. De plus, EGF diminue la production d'OPG par les cellules du lignage ostéoblastique et stimule ainsi la différenciation des ostéoclastes.

PTHrP (Parathormone related-protein) est une petite protéine sécrétée localement par les cellules du lignage ostéoblastique (particulièrement par les ostéoblastes) qui va avoir un effet paracrine similaire à l'action endocrine de la PTH. Son récepteur est, comme pour la PTH, PTH-R.

Ainsi, il apparaît clairement que l'ostéoformation est sous le contrôle de facteurs agissant au niveau de l'engagement des MSC vers la voie ostéoblastique (BMP et ses protéines modulatrices), de la prolifération des pré-ostéoblastes (TGF- $\beta$ , FGF), de la différenciation en ostéoblastes matures (BMP, IGF), de la régulation de la fonction ostéoblastique (IGF, TGF- $\beta$ ), et enfin de la durée de vie des ostéoblastes (FGF, IGF, TGF- $\beta$ , BMP).

Le tissu osseux est un tissu en perpétuel renouvellement (remodelage osseux) assurant ainsi le maintien de la masse osseuse de l'adulte, la réparation des traumatismes et l'homéostasie phospho-calcique. Ce cycle de remodelage osseux, par action conjointe des ostéoclastes (dégradation) puis des ostéoblastes (formation) se déroule au sein de l'UMB (Unité Multicellulaire de Base) en cycle de cinq phases successives (activation, résorption, inversion, formation, terminaison). Il est précisément régulé par des facteurs systémiques et locaux, en fonction des besoins.

Ce métabolisme osseux est soutenu par une très riche vascularisation, pénétrant jusque dans les zones les plus profondes de l'architecture osseuse. Une vascularisation efficace est donc indispensable pour un remodelage osseux de qualité. La vascularisation joue un rôle majeur dans la croissance osseuse (ostéogénèse), le remodelage et la réparation des tissus osseux (consolidation de fractures). Lors d'un besoin accru de formation osseuse (fractures), les cellules ostéogéniques vont stimuler la sécrétion des facteurs de croissance vasculaire (et notamment le VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) permettant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en direction de la zone de besoin en oxygène et nutriments (zone de remodelage osseux).

## I.2. Vascularisation

Ce sous-chapitre décrit tout d'abord le système cardiovasculaire et les différents types de vaisseaux sanguins permettant le transport du sang et les échanges tissulaires. Les particularités de la vascularisation des os longs sont rappelées. La structure et les fonctions multiples et essentielles de la cellule endothéliale, pierre angulaire du système vasculaire, sont abordées. Ensuite, un rappel est réalisé sur les différentes étapes de la formation des vaisseaux avec la description de la vasculogénèse, de l'angiogénèse et de l'artériogénèse. Puis, la capacité des cellules à s'organiser pour former des structures tubulaires (tubulogénèse) et sa possibilité d'étude *in vitro* sont détaillées. Enfin, les voies de signalisation de l'angiogénèse (qui seront ensuite étudiées dans nos travaux) sont analysées.

### I.2.1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire, ou système circulatoire, est spécialisé dans le transport et la diffusion du sang dans l'organisme. Il est composé de trois principaux éléments : le cœur, les vaisseaux et le sang. La **Figure 10** schématise l'organisation du système cardiovasculaire (83). Il possède de nombreuses fonctions. Tout d'abord, par la circulation principale systémique (ou grande circulation), il contribue aux échanges entre le sang et les tissus. Il distribue ainsi aux différents tissus et organes, par le sang, l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur vie, tout en éliminant leurs déchets. Le sang, chargé en oxygène, est propulsé par le cœur (par contraction du ventricule gauche) dans l'aorte, puis dans les artères, les artérioles (petites artères) jusqu'aux capillaires, qui distribuent aux tissus l'oxygène et les nutriments nécessaires dans tout l'organisme (membres supérieurs et inférieurs, extrémité céphalique, abdomen et pelvis). Puis le sang chargé en gaz carbonique (dioxyde de carbone, CO<sub>2</sub>) et en déchets revient par le circuit veineux (veinules, veines, puis veines caves) jusqu'au cœur (oreillette droite ou atrium droit). De plus, par la circulation pulmonaire (ou petite circulation), il contribue aux échanges gazeux entre le sang et l'air. Cette boucle permet de « détoxifier » le sang chargé en CO<sub>2</sub> revenu dans le cœur par la circulation systémique. Le sang riche en CO<sub>2</sub> présent dans l'oreillette droite passe dans le ventricule droit qui se contracte et le propulse vers le tronc pulmonaire et les artères pulmonaires jusqu'aux poumons. Au niveau des capillaires entourant les alvéoles pulmonaires, le CO<sub>2</sub> passe du sang aux poumons, et l'oxygène des poumons au sang. Le sang oxygéné rejoint les veines pulmonaires jusqu'à l'oreillette gauche ou atrium gauche. En outre, il permet le transport des déchets métaboliques vers les organes spécialisés dans leur élimination, comme les reins ou le foie. Enfin, il participe également à la communication intra-organisme. En effet, il transporte des chémokines (cytokines chimiotactiques présentes dans le sang), petites protéines solubles contrôlant le motif de migration, l'adhérence et l'activation des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation, comme les plaies par exemple.

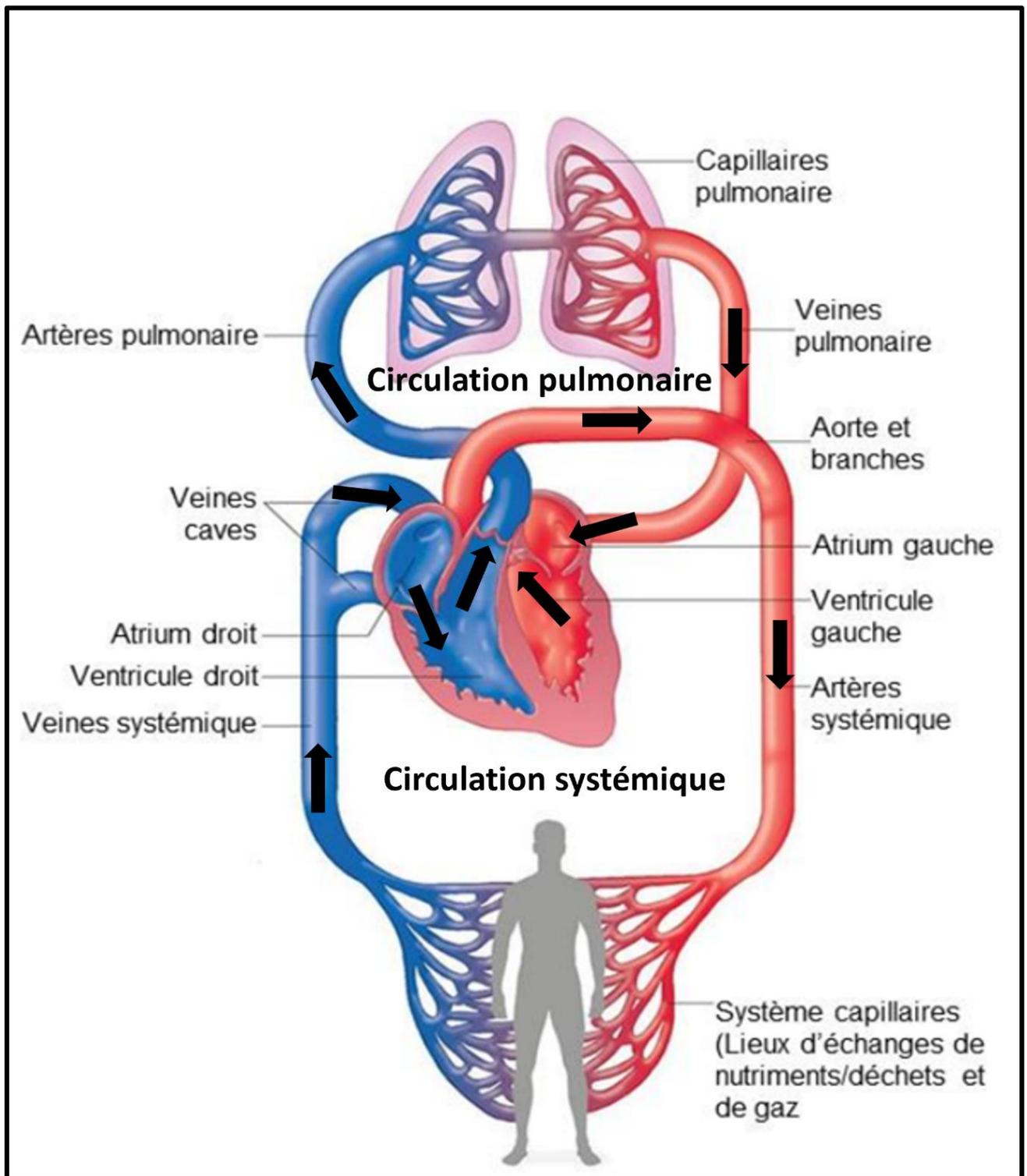


Figure 10 : Schéma représentant l'organisation du système cardiovasculaire, d'après Marieb (83)

### I.2.1.1. Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins correspondent à des conduits transportant le sang dans l'organisme.

#### I.2.1.1.1. Les artères et les veines

Les artères et les veines sont composées de trois couches tissulaires ou tuniques. La **Figure 11** représente un vaisseau sanguin en coupe transversale avec :

- Une couche externe, l'adventice (*tunica adventitia*). Périphérique et rigide, c'est un tissu conjonctif composé de fibres de collagène et de fibres élastiques, dans l'entremêlement desquelles on retrouve des cellules adipeuses et des macrophages. Cette couche est en contact avec les tissus environnants des vaisseaux. Dans les vaisseaux de gros calibres, l'adventice possède son propre système vasculaire (*vasa vasorum*) et sa propre innervation (*nervi vasorum*) (84). La vascularisation des plus petits vaisseaux se fait par diffusion à partir de leur lumière.

- Une couche médiane, la média (*tunica media*). Elle est composée de fibres de collagène et de fibres élastiques, ainsi que de cellules musculaires lisses. C'est la plus épaisse. Dans les artères, les fibres élastiques sont nombreuses et forment une couche externe, au-dessus des cellules musculaires lisses, appelée la limitante élastique externe. Juste en dessous, les cellules musculaires lisses sont nombreuses, parfois organisées en plusieurs couches. Elles sont orientées perpendiculairement par rapport au vaisseau, ce qui permet une forte vasoconstriction (modification du diamètre du vaisseau). La proportion entre fibres élastiques et cellules musculaires lisses varie en fonction de la taille des artères. Les artères les plus proches du cœur (aorte et ses branches) sont nommées artères élastiques ou artères de conductance : de grand diamètre, avec une média épaisse, les fibres élastiques y sont nombreuses. Cette élasticité permet de recevoir le sang à haute pression en provenance du cœur et de diminuer sa composante pulsatile afin de le distribuer de manière continue, c'est l'effet Windkessel (85). On retrouve ensuite les artères musculaires ou artères de résistance, de diamètre plus petit, avec une média contenant de nombreuses cellules musculaires lisses, leur accordant ainsi une capacité importante de vasomotricité (capacité à moduler leur diamètre). Enfin, dans les artérioles, de diamètre inférieur à 0,3 mm, la média est extrêmement fine. Dans les veines, la limitante élastique externe est souvent absente, et les cellules musculaires lisses sont moins bien organisées.

- Une couche interne, l'intima (*tunica intima*). Elle est formée par l'endothélium vasculaire reposant sur une couche de tissu conjonctif, la lame basale. L'endothélium vasculaire correspond à une couche de cellules endothéliales, en contact direct avec le sang au niveau de la lumière du vaisseau. Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées (*zonulae occludens*) et des jonctions d'adhérence. L'endothélium repose sur la lame basale, composée de fibres de collagène et de fibres élastiques. Dans les artères, la lame basale correspond réellement à une couche distincte, appelée la limitante élastique interne ; qui est absente dans les veines. A travers la limitante élastique interne, les cellules endothéliales émettent des processus leur permettant de rentrer en contact avec les cellules musculaires lisses de la média. Les veines, elles, possèdent des structures particulières qui leur sont propres, appelées valvules veineuses. Elles correspondent à des protrusions de l'endothélium, soutenu par la lame basale, permettant de former des valves anti-retours dans la lumière vasculaire. En 1980, Furchgott et Zawadzki décrivent pour la première fois le rôle essentiel de l'endothélium dans la vasomotricité (86). Furchgott recevra le prix Nobel pour cette découverte en 1998.

La paroi des veines est toujours plus mince, et leur lumière plus grande que celles des artères correspondantes.

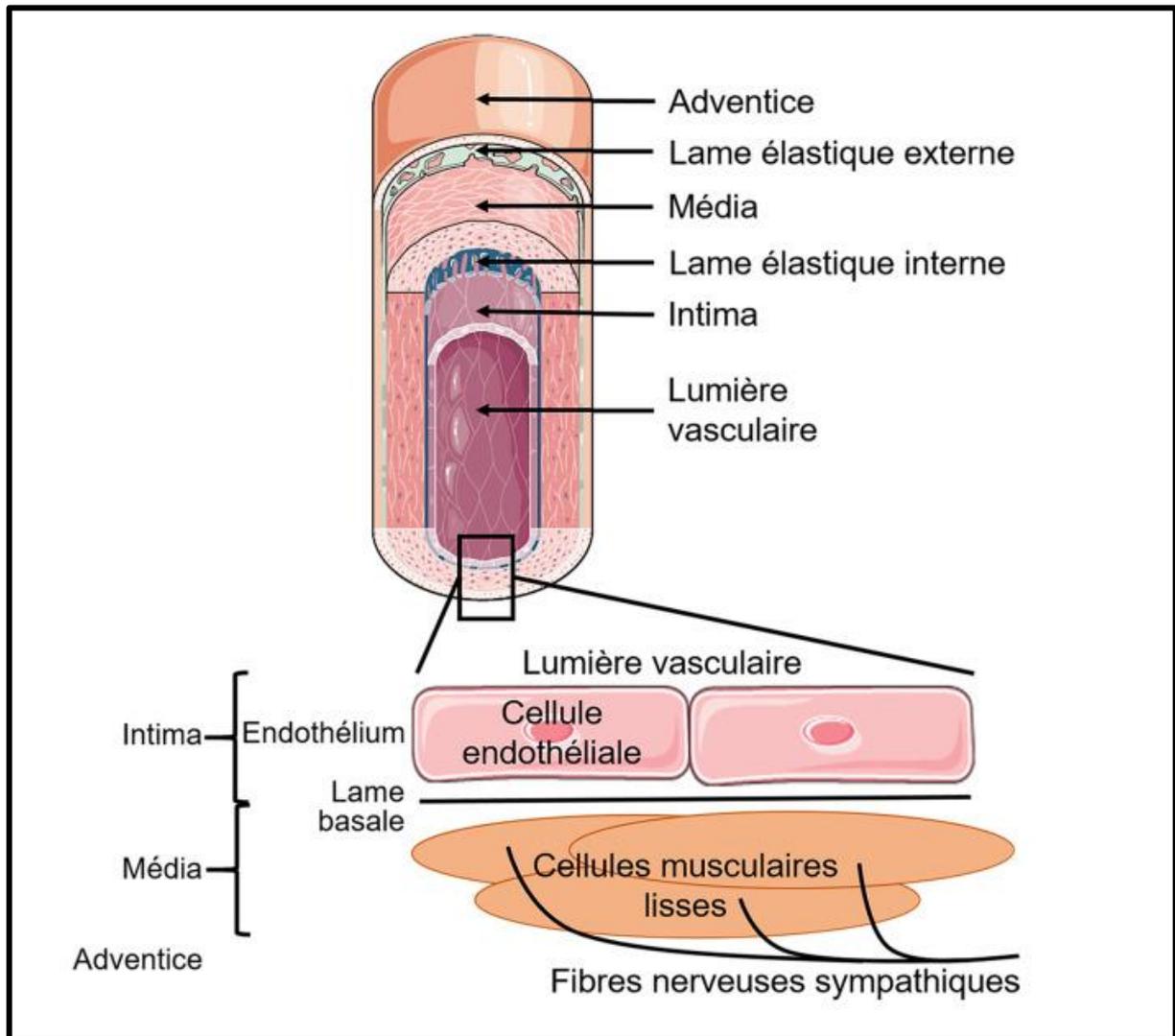


Figure 11 : Organisation générale d'un vaisseau sanguin, d'après Bessaguet (87)

Ces différences de structures entre artères et veines s'expliquent par des caractéristiques fonctionnelles différentes. Tout d'abord, les artères transportent du sang oxygéné, et les veines du sang riche en  $\text{CO}_2$  (exception faite de la circulation pulmonaire, explicitée en début de chapitre). Le sang circule ainsi à haute pression dans les artères et à basse pression dans les veines.

Selon les besoins des différents organes, les artères ont la capacité de réguler le débit sanguin (en complément de l'ajustement du débit cardiaque) en régulant leur diamètre par contraction ou relaxation des cellules musculaires lisses de la média. Cette vasoconstriction est moins développée dans les veines. Par contre, leur système de valvules anti-reflux leur permet de faire remonter vers le cœur le sang provenant des organes périphériques, en le retenant entre les pulsations cardiaques, même à basse pression.

#### I.2.1.1.2. Les capillaires

Les artères et les veines permettent la circulation du sang dans tout l'organisme, mais il existe un troisième type de vaisseaux sanguin permettant les échanges une fois le sang arrivé dans l'organe. Il s'agit des capillaires. Ces vaisseaux sanguins très fins (8 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre) relient le système artériel (artérioles) au système veineux (veinules) fermant ainsi la boucle du réseau de la circulation sanguine. Ils assurent la distribution de l'oxygène et des nutriments

transportés par les artères et les artérioles ; et la récupération du CO<sub>2</sub> et des déchets métaboliques, qui seront transportés ensuite par les veinules puis les veines jusqu'au cœur. Agencés en réseaux arborescents nommés « lits capillaires », ils représentent la partie du système cardiovasculaire ayant la plus basse pression. A l'extrémité artérielle du lit capillaire, se trouve un anneau de muscle lisse formant le sphincter précapillaire. Son niveau de contraction est régi par le système nerveux autonome par l'intermédiaire de médiateurs chimiques (par exemple, l'adrénaline provoque la constriction des sphincters), et par des facteurs locaux (par exemple, relâchement du sphincter en cas d'hypoxie cellulaire pour augmenter l'apport sanguin et en oxygène).

Le réseau capillaire a une surface totale évaluée entre 600 et 700 m<sup>2</sup>. Sa densité varie en fonction des tissus : très dense dans le myocarde et les alvéoles pulmonaires, il est peu abondant dans les tendons, et complètement absent dans l'épithélium de revêtement, la cornée et le cartilage.

Structurellement, le capillaire est composé d'une couche interne de cellules endothéliales plus ou moins aplaties dans le sens du flux sanguin (endothélium), entourée d'une lame basale (membrane basale) lui conférant sa résistance mécanique, puis d'une couche péri-capillaire appelée le périthélium. Le périthélium est une assise cellulaire discontinue de péricytes. Cellules d'origine mésenchymateuses, elles entourent les capillaires par de longs prolongements cytoplasmiques circonférentiels. Les péricytes présentent des similitudes ultrastructurales avec les myocytes (microfilaments), les fibroblastes (riches en réticulum endoplasmique rugueux) et les cellules endothéliales (vésicule de micropinocytose). Ce sont des cellules murales ayant pour fonction la stabilité structurelle du capillaire et la régulation des échanges au travers de l'endothélium. Par leur fonction contractile, ils permettent également de réguler le débit sanguin dans le capillaire, notamment au niveau de la barrière hémato-encéphalique (88). Enfin, ils semblent jouer un rôle dans la régénération tissulaire, notamment au niveau cérébral (89,90).

En plus de ses fonctions de contrôle du débit sanguin et d'échanges gazeux et de nutriments avec les tissus, le réseau capillaire assure des fonctions métaboliques. Il participe au métabolisme de certains médiateurs ou de certaines hormones, et par leurs propriétés de pinocytose<sup>4</sup> et de transcytose<sup>5</sup>, il participe à l'épuration du sang. En outre, lors d'une réaction inflammatoire, il existe un passage actif des leucocytes entre deux cellules endothéliales puis à travers la membrane basale du capillaire leur permettant de se retrouver libres dans l'espace péri-capillaire pour rejoindre un foyer inflammatoire interstitiel par exemple : c'est la diapédèse. Enfin, par fermeture complète des jonctions intercellulaires, réduction du nombre de vésicules de micropinocytose, et présence d'enzyme catabolisant les médiateurs nerveux, les capillaires peuvent devenir plutôt une barrière de protection qu'un lieu d'échanges (comme dans les capillaires cérébraux).

Contrairement aux artères et aux veines, les capillaires sont perméables, pour permettre la diffusion et les échanges. Leur porosité va être variable en fonction de leur organisation

---

<sup>4</sup> type d'endocytose par lequel les cellules absorbent des liquides extracellulaires et les solutés dissous, permettant ainsi une ingestion non spécifique de nutriments et d'autres substances nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

<sup>5</sup> processus cellulaire permettant le transport de macromolécules à travers une cellule, de sa surface apicale à sa surface basolatérale ou vice versa.

structurale, qui peut schématiquement se classer en trois types, illustrés dans la **Figure 12** (91) :

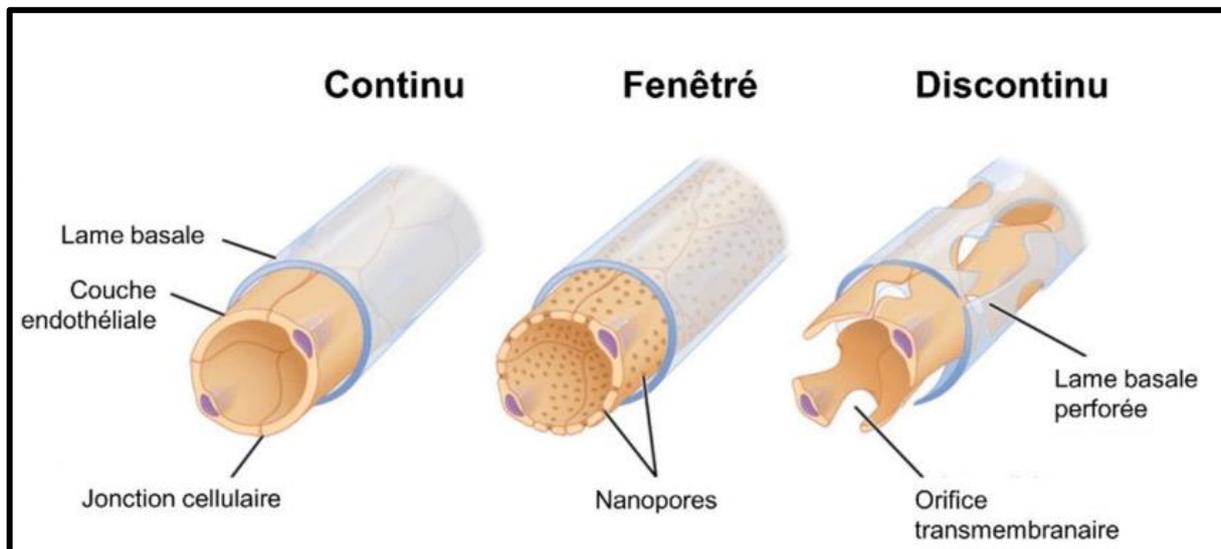


Figure 12 : Les trois types d'organisations structurales des capillaires sanguins, d'après Louis (92)

- les capillaires continus, qui sont les plus nombreux. Ils permettent le passage de l'eau, des solutés de taille inférieure à 3-4 nm (sels minéraux) et des gaz par diffusion entre les jonctions serrées des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont unies par des jonctions serrées, la lame basale qui les recouvre est continue, les péricytes sont nombreux. Les échanges des composés plus gros se font par des canaux trans-endothéliaux (situés entre les cellules endothéliales) ou par transcytose (les composés sont transportés du pôle apical au pôle basal des cellules endothéliales par des vésicules de 60 à 70 nm de diamètre, leur permettant ainsi de traverser l'endothélium). Les capillaires continus se retrouvent dans le cerveau, la peau, les muqueuses, le cœur, les poumons, les muscles.

- Les capillaires fenestrés. Dans ce cas, les cellules endothéliales présentent des pores de 50 à 80 nm. Les pores sont soit ouverts (dans les capillaires des glomérules rénaux), soit obturés par un diaphragme non membranaire de 2-4 nm d'épaisseur, ce qui augmenterait la sélectivité des fenestrations. Le passage de l'eau et des petits solutés est ainsi augmenté par rapport aux capillaires continus mais les grosses molécules restent bloquées (dans les pores avec diaphragme). La membrane basale est continue et les péricytes sont peu nombreux. Comme pour les capillaires continus, les échanges peuvent se faire par transcytose. Les capillaires fenestrés se retrouvent dans les tissus impliqués dans les fonctions de filtration ou de sécrétion comme les glandes exocrines, les glandes endocrines, les organes lymphoïdes comme la rate, ou les glomérules rénaux, les plexus choroïdes, les villosités intestinales.

- Les capillaires discontinus ou capillaires sinusoides, plus larges et irréguliers. Les cellules endothéliales présentent des fenestrations de 100 à 200 nm, ainsi que des pores transmembranaires intercellulaires (espaces entre deux cellules endothéliales) allant jusqu'à 1000 nm, permettant le passage des molécules de grandes tailles ou de cellules entières. De plus, leur lame basale est incomplète ou absente, les péricytes sont absents. Ils se retrouvent dans le foie ou les organes hématopoïétiques comme dans la moelle osseuse.

Grâce aux capillaires, il existe un passage de plusieurs litres de liquide par jour vers les différents tissus de l'organisme, permettant ainsi leur hydratation et leur nutrition. Ces pertes sont bien sûr compensées par récupération de manière à maintenir la volémie et à ne pas

entraîner d'œdème tissulaire (93). La récupération de la phase liquide du sang dans les tissus et les fluides interstitiels est assurée par le système vasculaire lymphatique qui ramène ce liquide par les veines sous-clavières au cœur droit, pour être remis dans la circulation.

### I.2.1.1.3. Le système vasculaire des os longs

Dans les os, la vascularisation s'organise en un réseau complexe de vaisseaux sanguins. L'os est hautement vascularisé, avec un réseau dense de vaisseaux sanguins irriguant à la fois la surface externe de l'os et le cœur de l'os.

Macroscopiquement, les os longs sont irrigués par un apport sanguin provenant de plusieurs sources, principalement l'artère nutritive centrale, les artères métaphyso-épiphysaires et les artères périostées (**Figure 13**). Le retour sanguin est effectué par une grande veine centrale (94–96).

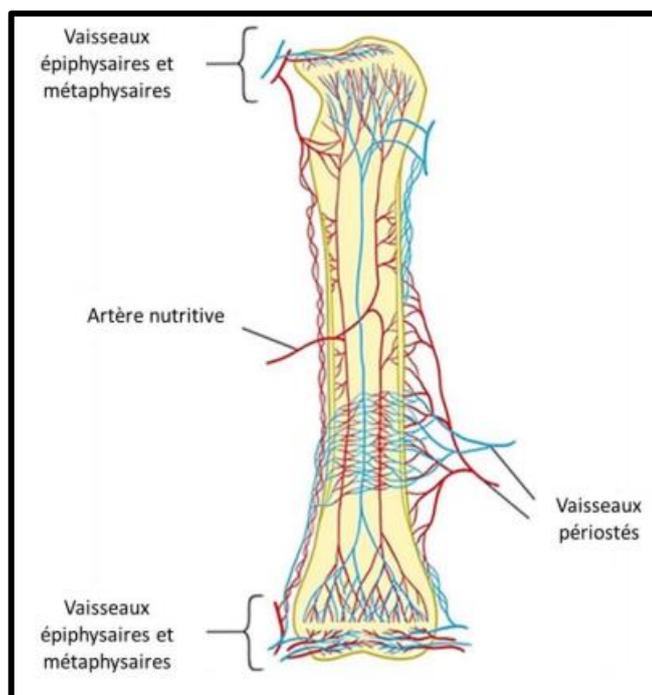


Figure 13 : Le système vasculaire des os longs, d'après Filipowska (95)

L'artère nutritive centrale traverse la diaphyse et pénètre dans la cavité médullaire. Les artères périostées (perforantes) proviennent de la membrane périostique externe de l'os et pénètrent dans l'os pour fournir une vascularisation à la périphérie de l'os et au périoste. Les artères métaphyso-épiphysaires irriguent les extrémités de l'os, où se trouvent les cartilages de croissance et les articulations.

Microscopiquement, les vaisseaux sanguins des os longs cheminent dans les canaux de Havers et de Volkmann de l'os cortical, et dans les trabécules de l'os spongieux (97). Ce réseau se ramifie en artérioles et finalement en capillaires. Les capillaires vont ensuite ramener le sang vers des veinules puis vers la grande veine centrale (98). Deux types de capillaires sont décrits (99) : Les microvaisseaux de type H sont localisés dans les régions métaphysaires des os longs, ils expriment des niveaux élevés de marqueurs vasculaires: endomucine et PECAM (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) et ont la capacité d'induire la

formation osseuse. Les microvaisseaux de type L, qui expriment peu les marqueurs vasculaires, sont localisés au niveau de la diaphyse et de la cavité médullaire.

Malgré l'abondance de ce réseau capillaire, la diaphyse est physiologiquement hypoxique par rapport à la métaphyse et l'épiphyse qui sont, elles, normalement oxygénées. Il est retrouvé au sein des noyaux des cellules osseuses diaphysaires une expression forte de facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant cette hypoxie diaphysaire : un flux sanguin moins important dans la diaphyse (moins de ramifications vasculaires et une densité osseuse plus importante sur un os essentiellement cortical), une consommation de l'oxygène par les cellules souches hématopoïétiques locales, la présence de capillaires moins fenestrés et donc moins perméables (100).

La moelle osseuse est ainsi hautement vascularisée. Les capillaires sanguins y fournissent non seulement des nutriments et de l'oxygène aux cellules hématopoïétiques responsables de la production de cellules sanguines, mais également aux cellules osseuses, contribuant ainsi à la réparation, la régénération et au remodelage du tissu osseux.

### **I.2.1.2. La cellule endothéliale**

La cellule endothéliale est le composant commun à toutes les structures vasculaires. Elle a été décrite pour la première fois au XIX<sup>e</sup> siècle par le physiologiste allemand Theodore Schwann. L'endothélium a longtemps été considéré principalement comme une simple couche de cellules endothéliales formant la paroi interne des vaisseaux sanguins (91). Il est maintenant admis que la cellule endothéliale joue des rôles bien plus importants et complexes. De la régulation du tonus vasculaire à la réponse immunitaire, en passant par la coagulation sanguine et la perméabilité vasculaire, elle est véritablement au cœur de la physiologie vasculaire. Elle en constitue l'un des acteurs essentiels, jouant un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et la régulation de multiples processus physiologiques.

#### **I.2.1.2.1. La structure de la cellule endothéliale**

Il n'existe qu'un seul type de cellule endothéliale mais les cellules endothéliales sont capables de s'adapter de sorte à présenter des phénotypes différents selon le vaisseau qu'elles constituent et les besoins environnants.

Les cellules endothéliales sont aplaties et allongées, formant une couche monocellulaire qui tapisse la surface interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques (endothélium). Mais leur morphologie peut varier selon le type de vaisseau et leur localisation anatomique. Par exemple, les cellules endothéliales des capillaires sont souvent plus plates et minces (pour favoriser les échanges rapides de nutriments et de gaz avec les tissus avoisinants), tandis que celles des artères et des veines peuvent être plus sphéroïdes et épaisses, contribuant à la régulation du tonus vasculaire et du débit sanguin.

Polarisées, elles possèdent une face apicale en contact avec la lumière du vaisseau et le sang, et une face basale externe reposant sur la lame basale de l'intima. La surface des cellules endothéliales est richement ornée de microvillosités qui augmentent la surface de contact avec le flux sanguin et facilitent les échanges moléculaires avec les cellules sanguines et les composants du plasma.

La membrane plasmique des cellules endothéliales est riche en protéines membranaires spécifiques, telles que les protéines d'adhérence cellulaire et les récepteurs de signalisation. Ces protéines jouent un rôle crucial dans l'interaction des cellules endothéliales avec les

cellules sanguines, les composants de la matrice extracellulaire et les signaux environnementaux. La structure et le rôle de ces protéines membranaires seront développés au paragraphe suivant I.2.1.2.2 Les molécules d'adhérence de la cellule endothéliale.

Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par différents types de jonctions représentées sur la **Figure 14**. Les jonctions serrées (ou tight junctions ou *zonulae occludens*), au pôle apical, forment une barrière étanche entre les cellules endothéliales, empêchant le passage de molécules et de cellules d'un compartiment à un autre (101). Elles sont composées de protéines transmembranaires telles que l'occludine, les claudines (16 isoformes) et les JAM (Junctional Adhesion Molecules), qui s'associent avec des protéines d'attachement intracellulaires cytoplasmiques telles que les protéines ZO (Zonula Occludens) permettant les interactions avec les microfilaments d'actine du cytosquelette. Les jonctions serrées jouent un rôle crucial dans le maintien de la perméabilité sélective de la paroi vasculaire.

Les jonctions adhérentes (ou *zonulae adherens*) sont responsables de l'adhérence cellulaire entre les cellules endothéliales. Elles se situent plus en basal. Elles comprennent des protéines transmembranaires telles que PECAM ou VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin) qui s'associent avec des protéines d'ancrage intracellulaires telles que les caténines. Les jonctions adhérentes contribuent à la cohésion intercellulaire et à la transmission des forces mécaniques entre les cellules endothéliales. La structure, les fonctions et les modes d'activation de PECAM et VE-cadhérine sont décrits dans le paragraphe suivant (I.2.1.2.2 Les molécules d'adhérence de la cellule endothéliale).

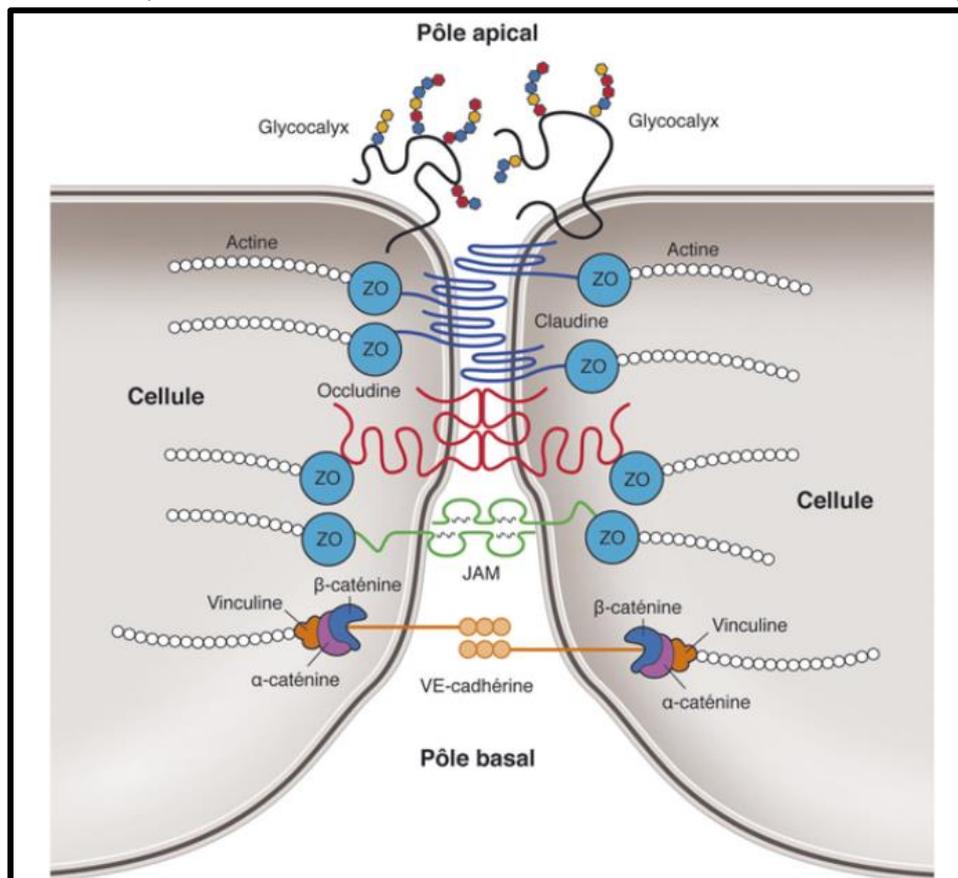


Figure 14 : Représentation schématique des jonctions serrées et jonctions adhérentes, d'après Runkle (102)

JAM : Junctional Adhesion Molecules – ZO : Zonula Occludens

Bien que moins courantes que les autres types de jonctions, les desmosomes sont des structures d'adhérence cellulaire qui contribuent à la résistance mécanique des tissus. Ils sont composés de cadhérines desmosomales et de protéines d'ancrage intracellulaires telles que la desmoplakine. Les desmosomes jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité structurelle des cellules endothéliales.

Au pôle basal, Les jonctions communicantes (ou gap junctions) permettent le passage direct de petites molécules et d'ions entre les cellules endothéliales. Elles sont composées de connexines, qui forment des canaux à travers lesquels les molécules de petite taille en fraction dans le cytosol peuvent être échangées. Les jonctions communicantes facilitent la communication intercellulaire et la coordination des activités cellulaires au sein de la paroi vasculaire.

Ces différents types de jonctions intercellulaires contribuent ensemble à la cohésion et à l'intégrité de la paroi vasculaire, ainsi qu'à la régulation de la perméabilité et de la fonction des vaisseaux sanguins.

Le cytosquelette des cellules endothéliales est une structure complexe et dynamique qui joue un rôle essentiel dans de nombreux aspects de la physiologie de ces cellules, y compris la forme cellulaire, la motilité, la signalisation et la régulation de la perméabilité vasculaire. Il est composé principalement de trois types de filaments de nature protéique : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Les microfilaments d'actine sont des polymères d'actine globulaire qui forment des structures filamentaires, également appelées fibrilles d'actine, à l'intérieur de la cellule endothéliale. Ces microfilaments sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment la contraction cellulaire (et la régulation du diamètre des vaisseaux et du débit sanguin), la migration cellulaire (lors de processus tels que l'angiogenèse, la réponse inflammatoire ou la cicatrisation des plaies), la formation et la stabilisation des jonctions cellulaires (contribuant à l'intégrité de la barrière vasculaire et régulant la perméabilité vasculaire). Les filaments intermédiaires sont des structures fibrillaires composées de divers types de protéines, telles que la vimentine et la desmine, qui fournissent un soutien mécanique et une résistance à la cellule endothéliale. Ces filaments intermédiaires sont impliqués dans le maintien de la forme cellulaire, la résistance aux contraintes mécaniques et la régulation de la stabilité des organites cellulaires. Les microtubules sont des structures tubulaires composées de protéines tubulines alpha et bêta ( $\alpha$  et  $\beta$  tubulines). Ils jouent un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, tels que le transport intracellulaire, la division cellulaire et la migration. Dans les cellules endothéliales, les microtubules participent également à la régulation de la perméabilité vasculaire en influençant la distribution des protéines membranaires et des récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire.

Ensemble, ces composants du cytosquelette de la cellule endothéliale contribuent à maintenir l'intégrité structurelle de la cellule, à réguler sa forme et sa motilité, ainsi qu'à moduler sa réponse aux signaux environnementaux. Ils jouent un rôle crucial dans la fonction vasculaire en permettant aux cellules endothéliales de répondre de manière dynamique aux changements dans leur microenvironnement, notamment en régulant la perméabilité vasculaire, la réponse inflammatoire et la migration cellulaire.

La cellule endothéliale présente donc une structure hautement spécialisée qui lui permet de remplir ses nombreuses fonctions vitales au sein des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Sa morphologie, ses jonctions cellulaires, sa membrane, son cytosquelette, ses organites et sa

surface cellulaire sont tous finement ajustés pour répondre aux exigences spécifiques de la circulation sanguine et des processus physiologiques associés.

### **I.2.1.2.2. Les molécules d'adhérence de la cellule endothéliale**

L'organisation structurale de la cellule endothéliale lui permet de remplir ses multiples fonctions, et notamment d'assurer le bon fonctionnement du système vasculaire. Elle possède des protéines qui régulent fortement ses capacités de liaisons dans l'espace.

#### **I.2.1.2.2.1. VE-Cadhérine**

La VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin), est une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire et jouant un rôle crucial dans la formation et le maintien de l'intégrité des couches cellulaires endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Cette protéine est essentielle pour la fonction barrière des vaisseaux sanguins et la régulation de processus tels que l'angiogenèse, le développement vasculaire, et la migration des leucocytes.

La VE-cadhérine est particulièrement importante dans le maintien de l'étanchéité des jonctions entre les cellules endothéliales, ce qui prévient la fuite de liquides et de cellules sanguines hors des vaisseaux sanguins et maintient ainsi l'homéostasie vasculaire. Elle réalise des liaisons homophiliques<sup>6</sup> assurant la cohésion des cellules endothéliales dans les jonctions adhérentes (comme décrit dans le paragraphe précédent) (103). Elle régule la perméabilité vasculaire en influençant l'ouverture et la fermeture des jonctions intercellulaires. En réponse à divers signaux physiologiques et pathologiques, la VE-cadhérine peut subir des modifications conformationnelles qui modulent l'interaction entre les cellules endothéliales et régulent la perméabilité de la barrière endothéliale.

La VE-cadhérine appartient à la famille des cadhérines, qui sont des protéines de liaison cellulaire calcium-dépendantes. La structure de la VE-cadhérine est similaire à celle des autres membres de cette famille. Elle est composée de plusieurs domaines fonctionnels qui contribuent à ses fonctions d'adhésion cellulaire et de signalisation. La VE-cadhérine comporte cinq répétitions en tandem de domaines extracellulaires de type cadhérine (appelés également répétitions EC ou domaines cadhérine). Ce sont ces domaines qui sont responsables de l'interaction homophile entre VE-cadhérines sur les cellules endothéliales adjacentes, ce qui assure l'adhérence cellulaire. Son domaine transmembranaire est constitué d'une seule hélice transmembranaire qui traverse la membrane cellulaire. Il ancre la protéine à la membrane plasmique. Enfin, son domaine intracellulaire est relié au cytosquelette cellulaire via des protéines d'ancrage telles que les caténines. Ces interactions jouent un rôle crucial dans la stabilisation des jonctions cellulaires et la transduction des signaux intracellulaires. La structure tridimensionnelle de la VE-cadhérine n'a pas été complètement résolue, mais des études ont montré que sa conformation change en fonction de son état de liaison au calcium et de son interaction avec d'autres protéines associées à la jonction cellulaire. Ces changements de conformation sont essentiels pour réguler l'adhérence cellulaire et la perméabilité endothéliale.

L'activation de la VE-cadhérine et la modulation de son activité sont régulées par divers mécanismes, notamment par des signaux intracellulaires et extracellulaires. La voie de signalisation par les facteurs de croissance et les cytokines est un mode d'activation de la VE-

---

<sup>6</sup> Liaison entre deux molécules d'adhérence identiques présentes sur les surfaces de cellules adjacentes.

cadhérine. Des facteurs de croissance, tels que le VEGF, et des cytokines, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1, peuvent moduler l'activité de la VE-cadhérine. Suite à la liaison du VEGF-A sur son récepteur VEGFR-2 au niveau de la cellule endothéliale (signal pro-angiogénique), VEGFR-2 se dimérise et s'autophosphoryle. Cela entraîne l'activation de la tyrosine kinase Src (Sarcoma) qui va à son tour phosphoryler la VE-cadhérine, entraînant son internalisation dans la cellule, favorisant la perte des jonctions adhérentes, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la migration des cellules endothéliales (104). Des forces mécaniques, telles que le flux sanguin et les forces de cisaillement, peuvent également activer la VE-cadhérine. Ces forces mécaniques induisent des changements conformationnels dans la VE-cadhérine et influencent l'organisation des jonctions cellulaires, ce qui contribue à la régulation de la perméabilité vasculaire. La phosphorylation, la glycosylation et d'autres modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine peuvent aussi moduler son activité. Par exemple, la phosphorylation de la VE-cadhérine par des kinases telles que la protéine kinase C (PKC) et la tyrosine kinase Src peut réguler son interaction avec des protéines d'ancrage intracellulaires et influencer la dynamique des jonctions cellulaires. Enfin, la VE-cadhérine interagit avec plusieurs protéines associées à la jonction cellulaire, telles que les caténines et les protéines de la famille des caténines p120. Ces interactions protéiques peuvent stabiliser la VE-cadhérine à la membrane cellulaire et moduler son activité adhésive.

#### **I.2.1.2.2.2. PECAM**

PECAM (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule), également identifiée comme CD31 (CD : cluster de différenciation), est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines (Ig) exprimée principalement sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les leucocytes, les plaquettes et d'autres types cellulaires. C'est la protéine la plus importante en nombre dans les jonctions cellulaires des cellules endothéliales.

Cette molécule est impliquée dans plusieurs processus biologiques. PECAM participe à l'adhérence cellulaire en interagissant avec d'autres molécules d'adhésion cellulaire, telles que la VE-cadhérine. PECAM est également impliquée dans la migration des leucocytes à travers la paroi vasculaire lors de processus inflammatoires. Elle régule la diapédèse des leucocytes en facilitant leur passage à travers les jonctions endothéliales. Elle joue aussi un rôle dans la transduction de signaux intracellulaires. Son engagement avec des ligands ou des anticorps peut entraîner l'activation de voies de signalisation cellulaires, notamment celles impliquées dans la régulation de l'adhésion, de la migration et de la prolifération cellulaires. Comme la VE-cadhérine, PECAM contribue au maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire en régulant la formation de jonctions endothéliales et en influençant la perméabilité vasculaire. Enfin, PECAM est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse.

Comme la VE-cadhérine, la structure de PECAM comprend plusieurs domaines fonctionnels, qui jouent un rôle dans ses diverses fonctions biologiques (105). Elle possède six domaines Immunoglobulines extracellulaires, également appelés domaines Ig-like. Ces domaines sont impliqués dans les interactions protéine-protéine, notamment dans l'adhérence cellulaire et la formation de jonctions entre les cellules endothéliales. Ils sont essentiels pour la liaison de la PECAM à d'autres protéines d'adhésion cellulaire, telles que la PECAM elle-même ou la VE-cadhérine. Ces interactions sont facilitées par leur conformation en forme de « coudes ». Son domaine transmembranaire unique traverse la membrane plasmique. Ce domaine ancre la protéine à la membrane cellulaire et est impliqué dans la transduction de signaux intracellulaires. Le domaine intracellulaire de la PECAM est relativement court et comprend des motifs de signalisation, tels que des sites de phosphorylation pour les kinases. Ce domaine

joue un rôle important dans la transmission de signaux intracellulaires en réponse à des interactions avec des ligands ou des modifications de son environnement cellulaire. Sa phosphorylation influence sa fonction et sa localisation cellulaire.

PECAM peut être activée en réponse à divers signaux extracellulaires et intracellulaires (106). On retrouve des interactions avec d'autres protéines d'adhésion cellulaire, telles que la VE-cadhérine et d'autres membres de la superfamille des immunoglobulines. Ces interactions favorisent la formation de jonctions cellulaires stables et contribuent au maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire. En outre, des facteurs de croissance, tels que le VEGF, ainsi que des cytokines inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1, peuvent stimuler l'activation de la PECAM. Ces signaux extracellulaires peuvent induire des changements conformationnels de la PECAM et déclencher des réponses cellulaires spécifiques, telles que la modulation de la perméabilité vasculaire et la migration des leucocytes. De plus, la PECAM peut être phosphorylée sur des résidus tyrosine dans son domaine intracellulaire. La phosphorylation de la PECAM peut être induite par des interactions avec des ligands ou par l'activation de récepteurs de surface cellulaires. La phosphorylation de la PECAM peut influencer sa capacité à recruter des protéines adaptatrices et à activer des voies de signalisation intracellulaires qui régulent divers processus cellulaires, tels que la migration cellulaire et la prolifération. Enfin, des forces mécaniques, telles que le flux sanguin et les forces de cisaillement, peuvent également activer la PECAM. Ces forces mécaniques induisent des changements conformationnels dans la PECAM et peuvent influencer ses interactions avec d'autres protéines d'adhésion cellulaire ainsi que ses fonctions biologiques.

La **Figure 15A** schématise l'endothélium dans des conditions physiologiques. Les jonctions serrées, constituées par les occludines, les claudines et les JAM, ainsi que les jonctions d'adhérence, formées par la VE-cadhérine, la PECAM et le CD99, contrôlent la fonction de barrière endothéliale en maintenant les jonctions inter-endothéliales. Les cellules endothéliales sont connectées à la MEC vasculaire, aux péricytes et aux cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) par l'intermédiaire de la N-cadhérine et d'autres interactions. La N-cadhérine active Trio, Rac1 et induit aussi directement l'assemblage des jonctions VE-cadhérine. Trio, ainsi que VE-PTP (protéine tyrosine phosphatase de l'endothélium vasculaire), inhibent RhoA. En outre, la VE-PTP empêche la phosphorylation et, par la suite, la dégradation de la VE-cadhérine. Le NO (monoxyde d'azote) est formé dans le but de maintenir un flux laminaire ainsi qu'un glycocalyx fonctionnel et intact (voir paragraphe 1.2.4.4 L'enzyme eNOS). La **Figure 15B** schématise l'activation des cellules endothéliales par des médiateurs inflammatoires. Le VEGF active le VEGFR-2, ce qui entraîne l'internalisation et la dégradation de la VE-cadhérine. L'activation des TLR (Toll-Like Receptors) entraîne l'activation du NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B). Cette activation entraîne la régulation des molécules d'adhésion et la production de cytokines et d'interférons. Cela conduit finalement à la transmigration des leucocytes (diapédèse), à une augmentation de la perméabilité vasculaire, à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'angiogenèse.

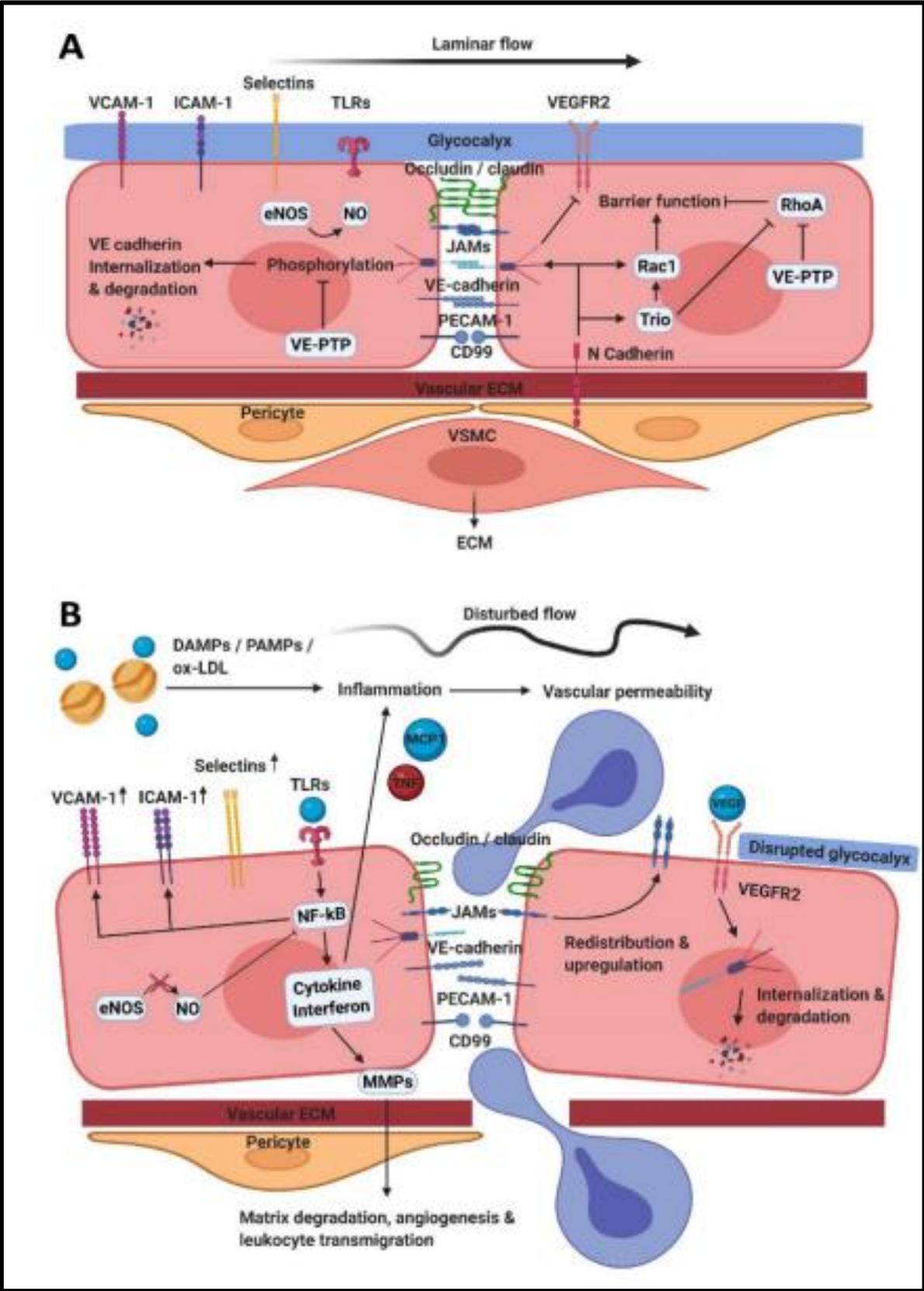


Figure 15 : Schéma de la régulation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, d'après Sluiter (107)

### **I.2.1.2.3. Les fonctions de la cellule endothéliale**

Exception faite des capillaires, l'endothélium forme une couche continue et jointive, jouant un rôle de barrière, maintenant le flux sanguin dans la lumière du vaisseau. Il peut résister à de fortes contraintes mécaniques (hautes pressions, notamment à proximité de la pompe cardiaque). Il permet la régulation du passage des molécules, des nutriments et des cellules sanguines à travers la paroi des vaisseaux sanguins.

La régulation de la perméabilité vasculaire est également sous le contrôle des cellules endothéliales, qui ajustent sélectivement la perméabilité des vaisseaux (et notamment des capillaires) en réponse à divers stimuli, tels que les cytokines, les hormones et les forces mécaniques. Cette capacité de modulation de la perméabilité est essentielle dans des processus physiologiques tels que la migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation et la régulation du passage des nutriments, des lipoprotéines et des hormones à travers la barrière endothéliale.

Elles jouent également un rôle dans le contrôle du tonus vasculaire, et donc du débit sanguin local et du maintien de la pression artérielle. La régulation du tonus vasculaire est assurée par la production de facteurs vasoactifs vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique ou le NO ou les prostacyclines, qui induisent la relaxation des muscles lisses vasculaires, favorisant ainsi la vasodilatation et la diminution de la résistance vasculaire périphérique. Les cellules endothéliales sécrètent également des facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline ou les prostaglandines, contribuant ainsi à la régulation fine du débit sanguin dans les différents segments du réseau vasculaire.

Elles participent à la réponse à l'hypoxie, en activant des mécanismes adaptatifs, tels que l'expression de facteurs de croissance et la modulation de la vasomotricité.

De plus, elles interviennent dans le contrôle de l'hémostase. Les cellules endothéliales présentent des fonctions à la fois anticoagulantes et pro-coagulantes, selon les conditions environnementales et les signaux qu'elles reçoivent. Leur fonction anticoagulante est principale. Les cellules endothéliales produisent et libèrent des substances anticoagulantes (molécules antithrombotiques) telles que le NO, la prostacycline ou l'antithrombine III, qui inhibent l'agrégation plaquettaire, la formation de caillot et la thrombose vasculaire. De plus, elles expriment des molécules de surface telles que la thrombomoduline, qui se lie à la thrombine pour déclencher l'activation de la protéine C, inhibant à son tour les facteurs Va et VIIIa ralentissant ainsi la cascade de la coagulation ; et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), qui, par division hydrolytique, active la formation de plasmine à partir du plasminogène ; contribuant ainsi à la dissolution des caillots. Enfin, leur surface est généralement non thrombogène, c'est-à-dire qu'elle ne favorise pas l'adhérence des plaquettes et des facteurs de coagulation. Toutes les cellules endothéliales ont ainsi des propriétés anticoagulantes, fibrinolytiques et anti-agrégantes pour les plaquettes.

Cependant, lorsqu'elles sont exposées à des stimuli inflammatoires, à des dommages tissulaires ou à d'autres signaux pro-coagulants, les cellules endothéliales peuvent subir une activation et adopter un phénotype pro-coagulant. Dans cette situation, elles peuvent exprimer des molécules d'adhésion pour les plaquettes et les cellules sanguines, libérer des facteurs pro-coagulants et réduire la production de substances anticoagulantes. Ce changement de fonction peut contribuer à l'initiation et à l'amplification de la coagulation sanguine lors de processus tels que la formation de caillots sanguins dans les vaisseaux endommagés.

Les cellules endothéliales ont ainsi la capacité de réguler la coagulation sanguine en fonction du contexte physiologique et pathologique, agissant à la fois comme des acteurs anticoagulants et pro-coagulants en réponse aux signaux environnementaux.

Elles jouent également un rôle dans le métabolisme de certains médiateurs et de certaines hormones. Dans le tissu nerveux, les cellules endothéliales possèdent un équipement enzymatique adapté à la dégradation des neuromédiateurs. Les cellules endothéliales (dans toute la circulation) élaborent par exemple l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui transforme l'angiotensine I en angiotensine II.

En outre, elles participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins lors du processus d'angiogenèse dans les cas de cicatrisation de plaies, de croissance tumorale ou de réparation des tissus par exemple (voir paragraphe 1.2.2.2 Angiogenèse).

Enfin, elles sont un composant essentiel et actif de la réponse immunitaire et inflammatoire (108) par leur rôle notamment dans la diapédèse : passage actif de cellules sanguines et notamment les leucocytes, entre deux cellules endothéliales puis à travers la membrane basale des capillaires pour rejoindre un foyer inflammatoire interstitiel. Ce passage est régulé par l'expression de molécules d'adhérence cellulaire et de chimiokines. Les cellules endothéliales agissent comme des sentinelles immunitaires en détectant les agents pathogènes et en initiant les réponses inflammatoires appropriées.

Les dysfonctionnements des cellules endothéliales sont associés à de nombreuses pathologies vasculaires et métaboliques, telles que les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension. La dysfonction endothéliale est souvent caractérisée par une diminution de la production de NO, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une activation accrue de la coagulation sanguine (avec augmentation du risque thrombo-embolique).

La dysfonction endothéliale peut être causée par divers facteurs, notamment le stress oxydatif, l'inflammation chronique, les facteurs métaboliques et génétiques, ainsi que les facteurs de risque cardiovasculaire tels que le tabagisme, l'obésité et l'hypertension. Ces facteurs contribuent à l'altération de la fonction endothéliale, favorisant ainsi le développement de maladies vasculaires et métaboliques.

Le système cardiovasculaire permet le transport du sang vers les différents tissus de l'organisme. Grâce à leur structure particulière, les artères délivrent l'eau, les électrolytiques, les nutriments et l'oxygène ; les veines éliminent les déchets métaboliques ; et les capillaires permettent de nombreux échanges. Le tissu osseux est vascularisé par un réseau complexe. La cellule endothéliale, pierre angulaire du système cardiovasculaire, joue un rôle crucial dans l'homéostasie et la régulation de multiples processus physiologiques comme le tonus vasculaire et le débit sanguin, la réponse inflammatoire et immunitaire, la coagulation, les échanges. Par ses molécules d'adhésion spécifiques, elle participe à l'adhésion et la cohésion cellulaire ; ainsi qu'au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale et à la régulation de la perméabilité vasculaire.

## I.2.2. Vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse

La vascularisation permet aux cellules et aux tissus d'assurer leur alimentation continue en oxygène et en nutriments par la circulation sanguine. Ainsi, au cours de la formation du tissu osseux (ostéogénèse) ou de son remodelage, il est nécessaire que tout le nouveau tissu osseux soit bien vascularisé (voir paragraphe I.3.3. Intérêt de la vascularisation). La communication entre les cellules osseuses et les cellules endothéliales permet ensuite un maintien de cette vascularisation au cœur du tissu osseux.

Plusieurs mécanismes sont successivement impliqués dans le développement du réseau vasculaire (109).

### I.2.2.1. Vasculogénèse

A cours du développement embryonnaire, la formation du système cardiovasculaire débute par la **vasculogénèse (Figure 16)** (110), processus aboutissant à la création d'un réseau primitif de structures vasculaires par différenciation et croissance *in situ* de cellules endothéliales à partir de précurseurs mésenchymateux, les angioblastes, eux-mêmes dérivés des hémangioblastes (109). L'hémangioblaste, dérivé du mésoderme et présent dans la moelle osseuse rouge hématopoïétique, est le précurseur unique et commun ; d'un côté des cellules souches hématopoïétiques ; et de l'autre des angioblastes (qui donneront les cellules endothéliales). Le VEGF et les récepteurs au VEGF sont les premières voies de transduction du signal spécifique aux CE activées au cours de la vasculogénèse. Les facteurs de croissance tels que le VEGF ou le FGF-2 permettent la migration et l'organisation des cellules endothéliales qui vont s'anastomoser pour former le plexus capillaire primaire.

Il est généralement admis que la vasculogénèse est limitée au début de l'embryogénèse et qu'elle ne se produit pas chez l'adulte (111). Cependant, l'existence d'une vasculogénèse post-natale est étayée par la présence dans la circulation sanguine de cellules endothéliales mais également de progéniteurs de cellules endothéliales (EPC), provenant de la moelle osseuse. A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueurs spécifiques des EPC. Les EPC et les cellules endothéliales matures peuvent exprimer des marqueurs similaires, spécifiques de l'endothélium, notamment le VEGFR-2 et la VE-Cadhérine (111). Les cellules endothéliales matures circulantes jouent un rôle dans le remodelage vasculaire, tandis que les EPC circulantes seraient plutôt impliquées dans les processus de réparation et de régénération tissulaire (112). De plus, dans des modèles animaux d'ischémie, Asahara et al. (113) retrouvaient des cellules progénitrices endothéliales au niveau des sites d'angiogénèse active. Cela suggère qu'il peut y avoir une part de vasculogénèse lors de l'angiogénèse thérapeutique. Des EPC persisteraient donc à l'âge adulte et pourraient coloniser des surfaces (biomatériaux) pour former des systèmes vasculaires *de novo* (vasculogénèse) comme l'ont montré Shi et al. (114), prouvant la colonisation endothéliale de prothèse en dacron chez le chien. Chez l'homme, la première preuve de l'existence d'EPC circulantes remonte à 1995. Rafii et al. ont démontré la colonisation de la surface d'écoulement d'un boîtier d'assistance ventriculaire gauche en titane par des cellules endothéliales (115). Les EPC, d'origine médullaire, sont donc retrouvées dans le sang circulant chez l'adulte, s'intégrant dans des structures vasculaires sur les sites de néo-angiogénèse. Elles sont naturellement impliquées dans la prévention de l'ischémie en participant au processus de vascularisation (116). Dans la moelle, les EPC composent la niche stromale, avec notamment les cellules souches mésenchymateuses. Elles présentent un état quiescent et sont destinées à se différencier et à se mobiliser dans la circulation en réponse à des signaux spécifiques (ischémie, réparation

tissulaire,...) (117). Quelques phénomènes de vasculogénèse peuvent se retrouver ainsi chez l'adulte, notamment en cas de réparation osseuse dans une zone contenant du tissu osseux spongieux et donc de la moelle osseuse. Lorsque du tissu osseux se forme dans cette zone (pour consolider une fracture par exemple), une néovascularisation est nécessaire pour lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires, et cette néovascularisation peut se faire, en partie, par vasculogénèse à partir des précurseurs endothéliaux présents dans la moelle osseuse rouge du spongieux.

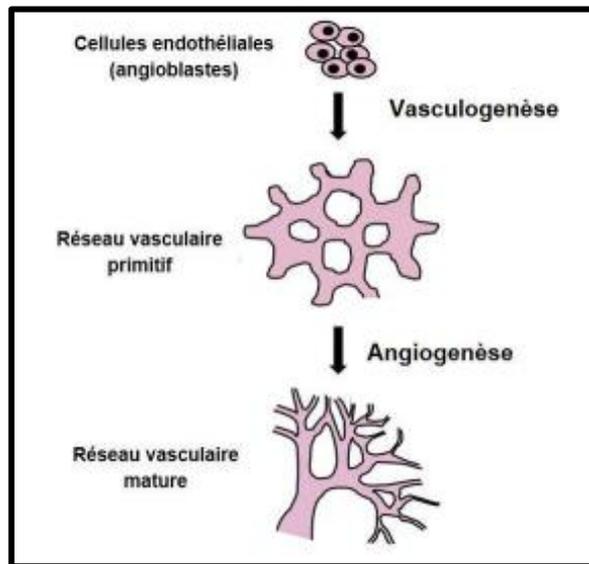


Figure 16 : Schéma illustrant la formation du système cardiovasculaire par vasculogénèse puis angiogénèse, d'après Curtis (110)

### I.2.2.2. Angiogénèse

L'**angiogénèse** correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (118). Les nouveaux vaisseaux sanguins vont permettre d'irriguer une zone jusqu'alors peut desservie et donc en manque d'oxygène et de nutriments. L'angiogénèse va donc transformer un réseau vasculaire primitif en réseau vasculaire mature.

Chez l'embryon, l'angiogénèse est responsable du remodelage et de l'expansion du réseau vasculaire primitif formé par vasculogénèse (119). Si l'angiogénèse est un phénomène très actif au cours du développement, c'est un événement rare chez l'adulte où l'endothélium est quiescent avec un faible renouvellement des cellules endothéliales. Cependant, le processus d'angiogénèse peut être réactivé sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques. De manière physiologique, c'est le cas lors du cycle menstruel chez la femme, au cours des processus de cicatrisation tissulaire, de réparation cellulaire (ischémie tissulaire, cardiaque ou des membres inférieurs) ou encore pendant la grossesse. L'angiogénèse est également impliquée dans de nombreuses pathologies : dans les cancers, le diabète, le psoriasis mais aussi dans certaines pathologies oculaires telles que la forme vasculaire ou humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et dans des pathologies auto-immunes. Dans ces conditions pathologiques, les vaisseaux néoformés présentent des défauts d'organisation structurelle, et sont peu fonctionnels (120).

Plusieurs mécanismes permettent la formation d'un nouveau vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant (121) :

- **l'angiogenèse par intussusception** divise les lumières des vaisseaux dans le sens de la longueur (120). Elle débute par la mise en contact des cellules opposées d'un endothélium jusqu'à ce que deux cellules endothéliales opposées d'un vaisseau se touchent. La zone de contact entre les cellules est ensuite perforée et les jonctions cellulaires remodelées, créant un espace (une cavité) (**Figure 17**). Cet espace est ensuite colonisé par des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules murales (péricytes). Ces cellules et les cellules endothéliales se réorganisent et synthétisent de la MEC par dépôt de collagène de type IV permettant l'agrandissement de la cavité. Le collagène de type IV est un composant essentiel de la MEC des vaisseaux sanguins en formation, aidant à soutenir et à stabiliser la structure des vaisseaux nouvellement formés. Il contribue également à réguler les interactions cellulaires et à guider la migration des cellules endothéliales pendant la formation des nouveaux vaisseaux. Les vaisseaux se séparent alors dans le sens de la longueur créant ainsi deux nouveaux vaisseaux distincts. Cette forme d'angiogenèse par intussusception nécessite peu de prolifération des cellules endothéliales (cela correspond plutôt à une réorganisation) tout en permettant une grande ramification du réseau vasculaire préexistant. Elle permet ainsi d'augmenter la quantité de vaisseaux sans augmenter la quantité de cellules endothéliales. La génération de vaisseaux est rapide et économique en énergie (pas de nécessité de division cellulaire). Le vaisseau reste fonctionnel tout le long du processus. Ce mécanisme est utilisé pour ajuster et remodeler les besoins des réseaux capillaires existants, notamment en augmentant rapidement la surface d'un plexus capillaire pour faciliter les échanges métaboliques. Il permet également d'optimiser le flux sanguin en ajustant la forme, la taille et la position des capillaires. C'est le mécanisme d'angiogenèse prédominant lors de la cicatrisation de plaies ou de pathologie tumorale.

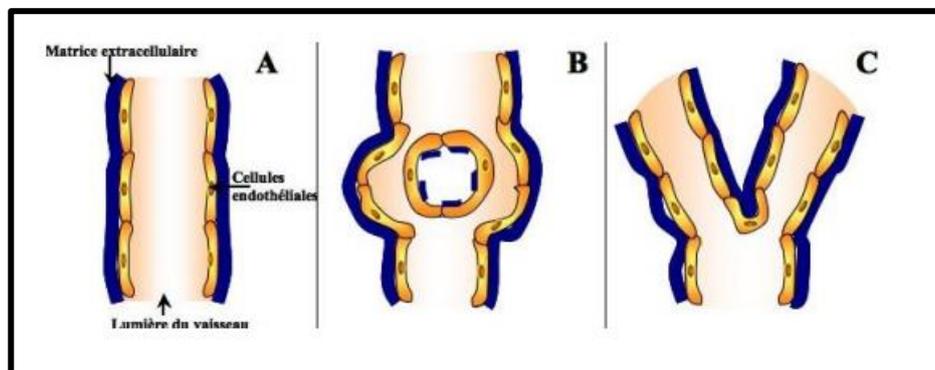


Figure 17 : Angiogenèse par intussusception – coupe longitudinale, d'après Gentil Dit Maurin (122)

- **L'angiogenèse par bourgeonnement** correspond à l'expansion du réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants par formation de bourgeons endothéliaux (**Figure 18**). Elle se déroule en deux principales étapes. La première phase est celle d'activation au cours de laquelle les cellules endothéliales sortent de leur état de quiescence, prolifèrent et migrent afin de constituer un nouveau vaisseau, allant se connecter au vaisseau voisin (123). La seconde phase, dite de maturation, vise à stabiliser le vaisseau et à le rendre fonctionnel. Elle est le mécanisme prédominant d'angiogenèse dans la réparation tissulaire (et notamment pour le tissu osseux).

Les cellules endothéliales forment des vaisseaux sanguins et reposent sur une matrice extracellulaire (**Figure 18A**). En cas d'hypoxie, c'est-à-dire en cas de besoins tissulaires en oxygène, les ostéoblastes commencent à sécréter des facteurs pro-angiogéniques, ce qui

déclenche la phase d'activation. D'autre part, sensibles à l'hypoxie, les cellules endothéliales les plus proches y répondent à travers l'activation de voies de signalisation stimulant la prolifération et la migration. Tout d'abord, la membrane basale des cellules endothéliales est localement dégradée par des collagénases ou des métalloprotéinases matricielles (MMPs), notamment MMP1, MMP2 et MMP9 secrétées par les cellules endothéliales, ce qui permet aux cellules de se dégager du vaisseau et de migrer en direction du stimulus angiogénique pour former un bourgeon endothélial (**Figure 18B**). Le VEGF et plus précisément le VEGF-A (facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales) est la molécule clé de l'angiogenèse notamment au cours de la migration et la prolifération des cellules endothéliales, agissant comme un agent chimioattractant et permettant l'assemblage correct des cellules endothéliales en tubes (124) (voir paragraphe 1.2.4.1 Le VEGF et ses récepteurs). Dans ce cas, le récepteur au VEGF VEGFR-2 semble être important dans l'orientation des cellules de l'extrémité des capillaires en croissance appelées « tip cells ». Les « tip cells » vont alors progresser vers le signal pro-angiogénique et entraîner d'autres cellules endothéliales dites « stalk cells ». Les « stalk cells » vont former le *lumen* du nouveau vaisseau en proliférant et en sécrétant des protéines de la MEC qui constitueront la future lame basale. Au bout de ces « tip cells », de nombreux filopodes se forment. Le blocage de l'activité du VEGFR-2 par des anticorps spécifiques inhibe la formation de ces filopodes (125). Les « tip cells » répondent à un gradient de concentration en VEGF-A qui guide leur migration. Lorsque le signal pro-angiogénique est insuffisant, par exemple à la suite du rétablissement d'une perfusion d'oxygène suffisante dans un tissu, la progression des « tip cells » s'arrête (**Figure 18C**). Une lumière est ensuite formée entre les cellules endothéliales. Les « tips cells » dirigent les vaisseaux au cours de leur formation et permettent l'interconnexion entre deux vaisseaux (**Figure 18D**). Enfin, le passage du flux sanguin 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 (126,127).

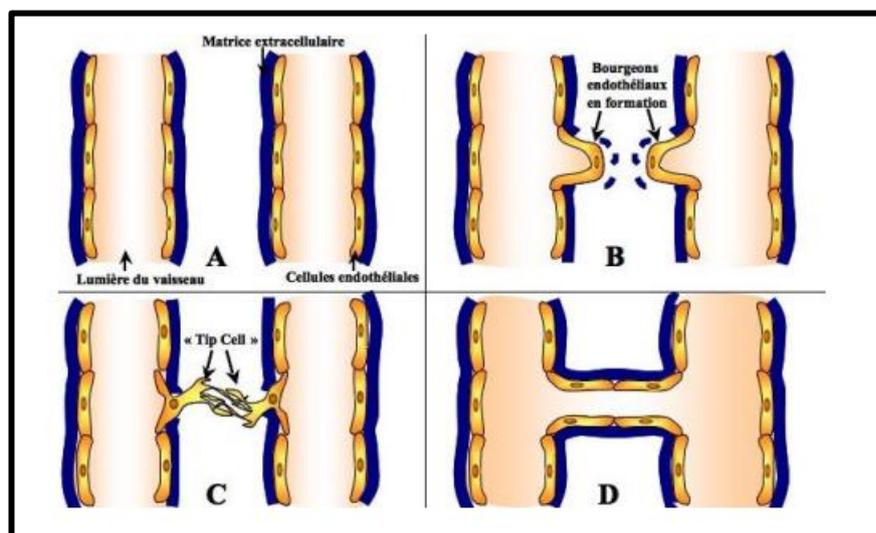


Figure 18 : Angiogenèse par bourgeonnement – coupe longitudinale, d'après Gentil Dit Maurin (122)

- **L'angiogenèse en boucle** est un mécanisme basé sur le concept que ce sont des forces mécaniques (comme les forces de pression dues au débit sanguin, la tension exercée par les tissus et les organes à l'extérieur du vaisseau et l'augmentation de la pression à l'intérieur des capillaires) qui régulent la croissance des vaisseaux (128). Les myofibroblastes

impliqués dans la reconstruction de la zone de contact lésée tirent les vaisseaux sanguins à proximité et entrent dans l'aire de remodelage comme un réseau de boucles (**Figure 19**). Cette angiogenèse est retrouvée lors de la réparation tissulaire et également considérée comme un processus rapide de formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels (129).

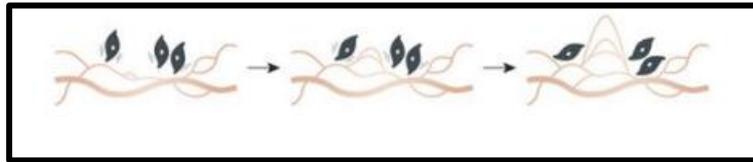


Figure 19 : Angiogenèse en boucle (en noir les myofibroblastes), d'après Leite De Oliveira (130)

La distinction entre vasculogenèse et angiogenèse n'est pas absolue et ces deux processus se chevauchent. Toutes deux nécessitent la prolifération des CE, leur migration, la réorganisation tridimensionnelle des agrégats nouvellement formés et utilisent des mécanismes similaires d'adhésion à la matrice extracellulaire (131). De plus, la vasculogenèse et l'angiogenèse ne s'excluent pas mutuellement, dans la mesure où les angioblastes peuvent être incorporés dans des vaisseaux sanguins préexistants en expansion (132).

### I.2.2.3. Artériogenèse

L'artériogenèse est définie comme le processus de développement des vaisseaux artériels. Elle intervient après l'angiogenèse, sous l'influence notamment des contraintes mécaniques environnementales. Elle correspond à une augmentation du diamètre des vaisseaux artériels existants et à la formation de nouveaux vaisseaux collatéraux matures de diamètre conséquent (133). C'est une phase de maturation et de stabilisation durant laquelle le réseau vasculaire rentre en phase de quiescence. Les cellules endothéliales cessent de migrer et de proliférer et synthétisent la membrane basale. Le recouvrement des cellules endothéliales par des cellules murales (péricytes pour les capillaires, cellules musculaires lisses pour les vaisseaux de plus gros calibre) stabilise enfin le vaisseau sanguin (126,134).

Tous ces différents mécanismes permettent d'aboutir à un réseau vasculaire pleinement fonctionnel.

La formation du système cardiovasculaire débute chez l'embryon par la vasculogenèse, permettant la création d'un réseau primitif vasculaire par organisation et différenciation des cellules endothéliales. Puis, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux existants : c'est l'angiogenèse. Dans le cas de la réparation tissulaire, l'angiogenèse par bourgeonnement est principalement observée. Enfin, lors de l'artériogenèse, les vaisseaux, et notamment les artères, se développent, augmentent de diamètre et se stabilisent.

### I.2.3. Tubulogenèse

#### I.2.3.1. In vivo

La tubulogenèse est la capacité des cellules à s'organiser pour former des structures tubulaires (135). On la retrouve évidemment lors de la formation du système vasculaire, mais également pour d'autres organes et structures tubulaires : glandes exocrines, poumons, reins et voies urinaires, voies biliaires et tube digestif. Dans l'organisme, les tubes constituent une structure essentielle dans le transport et la distribution des métabolites.

La tubulogenèse est un phénomène encore peu connu. Les données concernant la morphogenèse cellulaire et les voies moléculaires qui dirigent la formation des "tubes" vasculaires sont encore insuffisantes (136). Néanmoins, quelques éléments communs de la tubulogenèse sont évidents. Tout d'abord, la polarité est une condition préalable essentielle à la formation de la lumière. Deuxièmement, les mécanismes moléculaires impliquent le même grand groupe d'acteurs, y compris le cytosquelette, l'adhérence cellulaire, les complexes jonctionnels et les interactions cellule-matrice.

Lors de la formation du système vasculaire, une tubulogenèse est observée lors de la vasculogenèse et lors de l'angiogenèse (**Figure 20**). Lors de la vasculogenèse, la tubulogenèse est un processus au cours duquel les précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) organisés en cordon passent de la forme cuboïde à une forme aplatie. Ils réorganisent leurs points de jonction à la périphérie du cordon et permettent ainsi l'ouverture d'un espace entre ces cellules, espace à l'origine de la formation de la lumière du vaisseau ou lumen (136). Lors de l'angiogenèse, le bourgeonnement prolonge les lumières existantes à l'intérieur de ces nouveaux vaisseaux et les élargit.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la tubulogenèse sont complexes et également non encore entièrement connus.

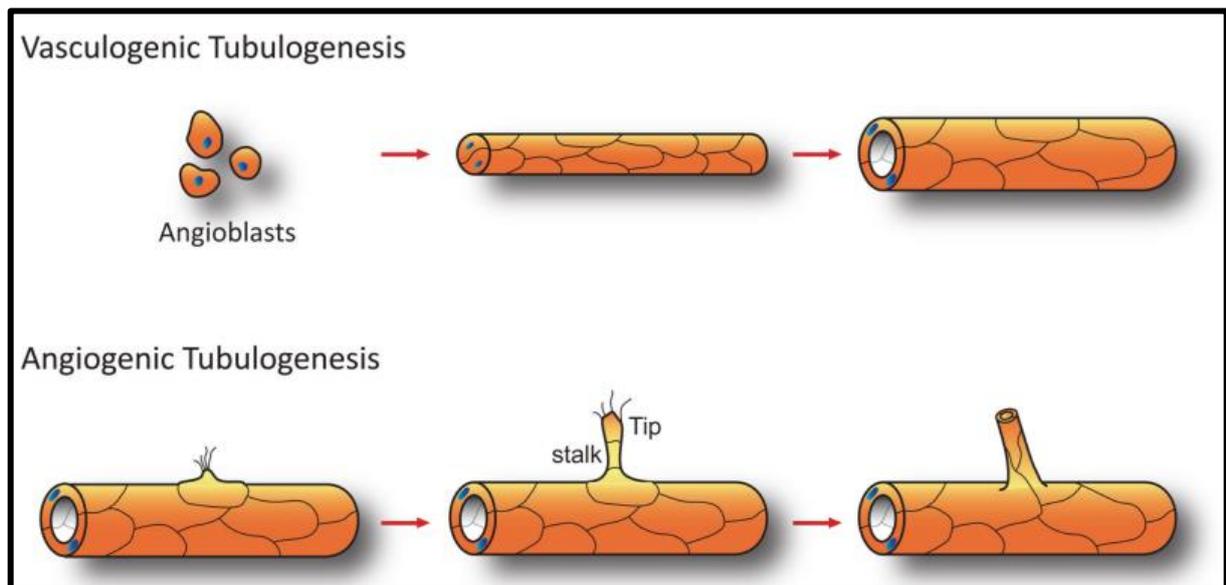


Figure 20 : Tubulogenèse lors de la vasculogenèse (en haut) et lors de l'angiogenèse (en bas), d'après Xu (136)

### I.2.3.2. In vitro

La tubulogenèse vasculaire peut être étudiée *in vitro*. Elle permet de ne pas se limiter à l'étude d'un modèle de tapis cellulaire en 2D sans lumière vasculaire. Un environnement 3D, mimant le microenvironnement cellulaire *in vivo* peut être créé, donnant ainsi un environnement aux cellules propice à la formation de tubules et permettant l'étude de structures avec lumière vasculaire (137).

En pratique, les modèles de tubulogénèse avec des cellulesensemencées sur des MEC de type Matrigel®<sup>7</sup> ou sur des hydrogels sont le plus souvent utilisés et fournissent un environnement adapté pour la formation de tubules. Ils apportent de nombreux facteurs de croissance mais leur composition exacte n'est pas toujours connue et peut varier (138,139). Ce sont des modèles idéaux *in vitro*, mais qui ne reflètent pas parfaitement l'environnement *in vivo*.

En revanche, les modèles à base de fibrine sont tout à fait intéressants (137,140,141). La fibrine est une protéine filamenteuse insoluble issue de la dégradation du fibrinogène (protéine soluble du plasma) sous l'action de la thrombine (enzyme clef de la coagulation) lors de la deuxième phase de la coagulation (appelée coagulation plasmatique). Une fois activée, la fibrine s'assemble en fibrilles qui s'entrecroisent pour former un réseau tridimensionnel en maille. Ce maillage est essentiel pour la formation d'un caillot sanguin stable. Le réseau de fibrine agit comme un piège, emprisonnant les cellules sanguines et d'autres composants du sang pour former un caillot. Cette structure en maille de fibrine fournit une matrice solide et stable pour renforcer le caillot et permettre la cicatrisation ultérieure de la plaie. Ce caillot permet à la fois de stopper l'hémorragie et de restaurer la paroi du vaisseau sanguin. La fibrine joue ainsi un rôle essentiel dans les processus de coagulation. Elle participe également à la réparation tissulaire. Elle compose, entre autres, le tissu de bourgeonnement venant combler la perte de substance tissulaire. Elle favorise la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales sur le site de la lésion. Grâce à ses propriétés chimiotactiques, la fibrine va optimiser l'inflammation et protéger la plaie en attirant sur place les globules blancs. Enfin, dans les modèles biologiques de co-culture avec des cellules osseuses, la fibrine favorise la production par les ostéoblastes de protéines de la MEC (dont le collagène I) qui permet l'obtention des forces de tension nécessaires à la formation des tubules (142,143).

Actuellement, il existe peu de modèles fiables pour l'évaluation de la tubulogénèse *in vitro*. Un des objectifs de ce travail de thèse a été de développer une méthode efficace d'évaluation de la vascularisation de la surface de céramiques à base d'hydroxyapatite par des cellules endothéliales et leur capacité à former des tubules en fonction de leur composition et de leur microstructure dans un modèle à base de fibrine (voir Chapitre II).

La tubulogénèse désigne la capacité des cellules à s'organiser pour former des structures tubulaires. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la tubulogénèse sont complexes et encore peu connus. La tubulogénèse vasculaire peut être étudiée *in vitro*, par élaboration d'un environnement 3D (par exemple à base de fibrine) permettant aux cellules de s'organiser en tubules.

#### **1.2.4. La signalisation inductrice et régulatrice de l'angiogénèse**

La signalisation inductrice et régulatrice de l'angiogénèse est un processus complexe qui implique une série de signaux moléculaires et de voies de signalisation cellulaires qui régulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants. Les voies de signalisation impliquées dans l'angiogénèse décrites dans ce chapitre sont celles qui ont été étudiées lors de nos expérimentations.

---

<sup>7</sup> Matrice extra-cellulaire commerciale produite par des cellules en culture permettant la culture cellulaire dans un environnement tridimensionnel.

### I.2.4.1. Le VEGF et ses récepteurs

Le VEGF est une protéine essentielle impliquée dans l'angiogenèse. Découvert initialement comme un facteur de perméabilité vasculaire, le VEGF a été largement étudié pour son rôle central dans le développement vasculaire normal et dans diverses conditions pathologiques, telles que la croissance tumorale et les maladies cardiovasculaires. En condition physiologique, le VEGF peut être sécrété par divers types cellulaires en réponse à des stimuli tels que l'hypoxie, l'inflammation, un stress métabolique ou d'autres signaux biochimiques, une plaie ou une lésion tissulaire : les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses (en particulier celles des vaisseaux sanguins), certaines cellules immunitaires comme les macrophages ou les lymphocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales. En condition pathologique, les cellules tumorales peuvent surproduire du VEGF pour stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins vers la tumeur, assurant ainsi un approvisionnement adéquat en nutriments et en oxygène pour soutenir la croissance et la progression tumorale.

Le VEGF est une famille de glycoprotéines comprenant plusieurs isoformes, dont les plus importants sont VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PIGF). L'isoforme VEGF-A est le principal déclencheur de l'angiogenèse. Chez l'homme, il existe sous trois isoformes (résultant de l'épissage<sup>8</sup> alternatif du gène VEGFA) : VEGF121, VEGF 165 et VEGF181. La combinaison de leur relargage différé, notamment lors de la dégradation de la lame basale des vaisseaux sanguins, permet d'avoir un gradient de VEGF contrôlé pour guider le bourgeonnement (100,144). En dehors de l'angiogenèse, le VEGF-A est sécrété en permanence par les cellules endothéliales en quantité limitée, nécessaire au maintien du réseau vasculaire. Il favorise également la perméabilité vasculaire en influençant la formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. L'expression du VEGF-A est régulée par divers facteurs, notamment l'hypoxie (niveaux réduits d'oxygène), les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones et les interactions avec la matrice extracellulaire. L'hypoxie est l'un des principaux déclencheurs de l'expression de VEGF-A, ce qui permet d'augmenter l'apport sanguin aux tissus en réponse à un manque d'oxygène (145).

Les VEGF exercent leurs effets biologiques en se liant aux récepteurs du VEGF présents à la surface des cellules endothéliales. Les récepteurs du VEGF incluent VEGFR-1 (Flt-1 : fms related receptor tyrosine kinase 1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR : Fetal liver kinase / Kinase insert domain receptor) et VEGFR-3 (Flt-4 : fms related receptor tyrosine kinase 4), qui sont exprimés de manière différentielle dans divers tissus et jouent des rôles distincts dans la signalisation du VEGF (134). Une fois activés, les récepteurs du VEGF déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. VEGFR-2 est considéré comme le principal car il transmet plus fortement le signal pro-angiogénique suite à la liaison avec le VEGF-A. Il stimule la progression et la migration des cellules endothéliales. VEGFR-1 transmet moins efficacement le signal pro-angiogénique et existe sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble. Il aurait une fonction inhibitrice et régulatrice de l'angiogenèse en régulant (par liaison avec sa forme soluble) la quantité de VEGF disponible pour les autres récepteurs. VEGFR-3 n'est exprimé que pendant le bourgeonnement ou dans les cellules endothéliales lymphatiques.

---

<sup>8</sup> Processus de maturation qui consiste à l'excision des introns et la réunion des exons de l'ARN pré-messager avant sa traduction en protéine.

En outre, le VEGF stimule la production et interagit avec d'autres facteurs de croissance et cytokines pour réguler la néovascularisation et la croissance des vaisseaux sanguins.

Dans le contexte physiologique, le VEGF est impliqué dans de nombreux processus vitaux, y compris le développement embryonnaire, la cicatrisation des plaies, la régénération tissulaire et la réponse aux besoins métaboliques des tissus. Par exemple, pendant le développement embryonnaire, le VEGF joue un rôle crucial dans la formation des vaisseaux sanguins, assurant une vascularisation adéquate des tissus en croissance.

De même, lors de la cicatrisation des plaies, le VEGF est libéré en réponse à des signaux inflammatoires et favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour fournir des nutriments et des facteurs de croissance aux tissus endommagés, facilitant ainsi leur réparation. En outre, le VEGF est impliqué dans la régulation de la perméabilité vasculaire et de la fonction endothéliale, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie vasculaire.

Bien que le VEGF soit essentiel pour le développement et la santé des vaisseaux sanguins, sa surproduction ou sa dysrégulation peut avoir des conséquences néfastes. Par exemple, une surexpression chronique du VEGF est associée à la croissance tumorale et à la progression métastatique dans de nombreuses maladies oncologiques, en favorisant la vascularisation des tumeurs et en permettant leur survie et leur propagation.

De plus, une expression aberrante du VEGF est observée dans diverses maladies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose, la rétinopathie diabétique et l'hypertension pulmonaire, où elle contribue à la dysfonction endothéliale, à l'angiogenèse anormale et à l'inflammation vasculaire. En conséquence, les inhibiteurs de la voie du VEGF sont devenus des outils thérapeutiques importants dans le traitement de ces conditions pathologiques.

Au total, le VEGF entraîne la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux impliqués dans l'angiogenèse (146).

#### **1.2.4.2. Les métalloprotéases matricielles**

Les métalloprotéases, ou métalloprotéinases (MMPs), matricielles constituent une famille d'enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation et la modification de la MEC, ainsi que dans la régulation de divers processus biologiques.

Ces enzymes possèdent une caractéristique structurale commune : un site actif contenant un ion zinc ( $Zn^{2+}$ ), qui est essentiel pour leur activité catalytique. Les métalloprotéases sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives, également appelées zymogènes, en raison de la présence d'un propeptide inhibiteur. Elles sont ensuite activées en condition physiologique lors de la perte de ce propeptide et deviennent fonctionnelles.

Les MMPs agissent en dégradant de manière sélective et spécifique les composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène, l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines. Cette dégradation des protéines se fait par hydrolyse des liaisons peptidiques au sein des chaînes d'acides aminés.

Les MMPs sont régulées à plusieurs niveaux, tant au niveau de leur expression génique que de leur activité enzymatique (147). Ces mécanismes de régulation sont essentiels pour maintenir l'homéostasie tissulaire et prévenir la suractivation des métalloprotéases, ce qui pourrait conduire à des déséquilibres dans la dégradation de la matrice extracellulaire et à des conséquences pathologiques. Tout d'abord, l'expression des gènes codant pour les MMPs est régulée au niveau transcriptionnel par une variété de facteurs de transcription et de voies de

signalisation qui peuvent activer ou inhiber l'expression des gènes des MMPs en réponse à des signaux cellulaires, tels que des cytokines, des facteurs de croissance, ou des stimuli de stress. Après la transcription, l'ARNm des MMPs peut être soumis à des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, tels que l'épissage alternatif, la stabilisation ou la dégradation de l'ARNm, ou la régulation de la traduction. Ces mécanismes peuvent influencer la quantité d'ARNm des MMPs disponibles pour la traduction et donc leur expression protéique. Ensuite, les MMPs sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs (proenzymes) et doivent subir une activation protéolytique pour devenir fonctionnelles. Cette activation peut être réalisée par d'autres protéases, telles que d'autres MMPs, ou par des modifications post-traductionnelles, telles que le clivage protéolytique par des sérine-protéases ou des cystéine-protéases. L'activité des MMPs est également régulée par des inhibiteurs spécifiques, tels que les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMPs : Tissue inhibitor of matrix metalloprotease), qui se lient spécifiquement aux MMPs et inhibent leur activité enzymatique. Les TIMPs jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en régulant l'activité des MMPs et en prévenant une dégradation excessive de la matrice extracellulaire. Enfin, les métalloprotéases peuvent interagir avec différents composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène, les protéoglycanes et les glycoprotéines, ce qui peut influencer leur localisation, leur activité et leur stabilité. Ces interactions peuvent affecter la capacité des métalloprotéases à dégrader la matrice extracellulaire et à réguler les processus biologiques associés. En combinant ces mécanismes de régulation, les cellules sont capables de contrôler finement l'expression et l'activité des métalloprotéases en réponse à des signaux extracellulaires et intracellulaires, contribuant ainsi à maintenir l'homéostasie tissulaire et à réguler de nombreux processus biologiques importants. La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs joue un rôle crucial dans divers processus physiologiques, notamment la cicatrisation des plaies, le remodelage tissulaire, la migration cellulaire, la régulation de la réponse inflammatoire.

Les MMPs sont également impliquées dans la régulation de l'angiogenèse de trois manières. Elles favorisent la croissance et la ramification des vaisseaux sanguins en dégradant la membrane basale et la matrice extracellulaire environnante pour permettre la migration et la prolifération des cellules endothéliales (comme décrit précédemment dans le paragraphe 1.2.2.2. Angiogenèse). Elles relarguent des facteurs solubles pro et anti-angiogéniques. Elles modulent certaines voies de signalisation de l'angiogenèse (PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes et VEGF notamment) (148).

La MMP9, également connue sous le nom de gélatinase B, joue un rôle clé dans la régulation de l'angiogenèse. La MMP9 est capable de dégrader la matrice extracellulaire en clivant différents composants, tels que le collagène de type IV, la laminine et le fibronectine, qui sont des constituants importants de la membrane basale entourant les vaisseaux sanguins. En dégradant la membrane basale, la MMP9 crée des voies pour la migration et la prolifération des cellules endothéliales, favorisant ainsi la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins. En plus de dégrader la matrice extracellulaire, la MMP9 peut également cliver et activer des facteurs de croissance et des cytokines pro-angiogéniques, tels que le VEGF et le FGF, à partir de leur forme inactive liée à la matrice extracellulaire (149). Cette activation libère ces facteurs de croissance et cytokines, ce qui amplifie les réponses cellulaires et tissulaires associées à la cicatrisation, à l'inflammation, à la croissance tumorale, et à d'autres processus biologiques comme l'angiogenèse. La MMP9 peut également favoriser l'angiogenèse en recrutant des cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les macrophages, qui sécrètent à leur tour des facteurs de croissance et des cytokines pro-angiogéniques. Ces

cellules inflammatoires peuvent également libérer des MMPs supplémentaires, créant un environnement favorable à l'angiogenèse. Enfin, la MMP9 peut influencer la perméabilité vasculaire en dégradant les jonctions serrées entre les cellules endothéliales, facilitant ainsi la sortie des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et leur migration vers les sites de néovascularisation. La dysrégulation de la MMP9 peut contribuer à des processus pathologiques associés à une angiogenèse excessive, tels que la croissance tumorale, les maladies inflammatoires et les maladies cardiovasculaires.

#### **I.2.4.3. Le facteur de Von Willebrand**

Le facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine plasmatique importante impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, l'inflammation et l'hémostase. Le vWF est synthétisé principalement dans les cellules endothéliales et dans les mégacaryocytes de la moelle osseuse. Il est sécrété dans la circulation sanguine sous forme d'une protéine multimérique, ce qui signifie qu'il peut exister sous différentes formes.

Le vWF joue un rôle crucial dans l'adhésion des plaquettes aux sites de lésion vasculaire, où il favorise la formation du clou plaquettaire (150,151). Cette adhésion plaquettaire est essentielle pour l'angiogenèse, car elle favorise la libération de facteurs de croissance et de cytokines par les plaquettes, qui peuvent à leur tour stimuler la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins. Le vWF agit également comme un co-facteur pour le facteur VIII de la coagulation. Le complexe vWF-facteur VIII protège le facteur VIII de la dégradation dans la circulation sanguine et augmente sa demi-vie. Hormis son rôle dans la cascade de la coagulation, le facteur VIII peut avoir des effets angiogéniques directs, en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le vWF peut influencer la perméabilité vasculaire en régulant l'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales, ainsi qu'en stabilisant la matrice extracellulaire. Des niveaux anormaux de vWF peuvent entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui peut favoriser l'angiogenèse en permettant le passage de facteurs de croissance et de cellules endothéliales à travers la paroi vasculaire.

En résumé, bien que le rôle du facteur de von Willebrand dans l'angiogenèse ne soit pas aussi bien compris que son rôle dans la coagulation sanguine, des preuves émergentes suggèrent qu'il peut contribuer à la régulation de ce processus crucial en influençant l'adhésion plaquettaire, la perméabilité vasculaire et d'autres aspects du microenvironnement vasculaire. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider pleinement les mécanismes exacts par lesquels le vWF affecte l'angiogenèse.

L'expression du vWF est régulée à plusieurs niveaux (152). L'expression du gène du vWF est principalement régulée au niveau transcriptionnel. Plusieurs facteurs de transcription se lient aux régions promotrices du gène pour activer ou inhiber sa transcription en réponse à différents signaux cellulaires et environnementaux. La synthèse et la sécrétion du vWF sont principalement assurées par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes de la moelle osseuse. La maturation et la différenciation de ces cellules jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression du vWF. Par exemple, les mégacaryocytes en cours de différenciation peuvent moduler l'expression du vWF en réponse à des signaux spécifiques dans leur microenvironnement. Certains facteurs de croissance, tels que le VEGF et le facteur de croissance des mégacaryocytes (MGF), peuvent stimuler la production de vWF par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Ces facteurs de croissance agissent en activant des voies de signalisation spécifiques qui régulent l'expression du vWF. Après la transcription, l'ARN messager du vWF peut être soumis à des mécanismes de régulation post-

transcriptionnelle, tels que la stabilité de l'ARNm, la modification de l'épissage, et la régulation de la traduction. Ces mécanismes peuvent influencer la quantité d'ARNm du vWF disponible pour la traduction et donc son expression protéique. Des études récentes suggèrent que des modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, peuvent également jouer un rôle dans la régulation de l'expression du vWF en modifiant l'accessibilité des régions régulatrices du génome et en influençant l'activité des facteurs de transcription. En résumé, l'expression du facteur de von Willebrand est finement régulée par une combinaison complexe de mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels, de signalisation cellulaire, et épigénétiques. Cette régulation est essentielle pour maintenir l'homéostasie de la coagulation sanguine et prévenir les déséquilibres qui pourraient conduire à des troubles de la coagulation comme la maladie de von Willebrand.

#### **I.2.4.4. L'enzyme eNOS**

La synthase endothéliale de monoxyde d'azote (eNOS), également connu sous le nom de NOS3, est une enzyme clé impliquée dans la production de NO dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le NO joue un rôle crucial dans la régulation de l'angiogenèse (153,154).

L'une des principales fonctions du NO est la vasodilatation et la relaxation des vaisseaux sanguins (comme explicité dans le paragraphe I.2.1.2.3 Les fonctions de la cellule endothéliale). L'élargissement des vaisseaux sanguins facilite le flux sanguin vers les tissus environnants, favorisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pendant l'angiogenèse. Le NO peut également agir comme un médiateur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. L'activation de eNOS et la production de NO peuvent stimuler la prolifération des cellules endothéliales et favoriser leur migration vers les sites de néovascularisation. Des études ont montré que le NO peut augmenter l'expression de VEGF et renforcer ses effets pro-angiogéniques en activant eNOS. Le VEGF peut à son tour stimuler la production de NO par eNOS, créant ainsi un rétrocontrôle positif qui amplifie le processus d'angiogenèse. En outre, l'hypoxie est un puissant stimulateur de l'angiogenèse. En réponse à l'hypoxie, l'activation de eNOS et la production de NO augmentent, favorisant ainsi la vasodilatation, la prolifération endothéliale et la migration des cellules endothéliales vers les zones hypoxiques pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. eNOS est surexprimée lors de la liaison du VEGF-A sur son récepteur VEGFR-2 (155).

Des dysfonctionnements de eNOS et de la voie du NO sont associés à des troubles vasculaires, tels que l'athérosclérose, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires, qui peuvent présenter des altérations de l'angiogenèse. Une angiogenèse excessive ou insuffisante peut contribuer au développement et à la progression de ces maladies.

En résumé, eNOS et la production de NO jouent un rôle crucial dans la régulation de l'angiogenèse en influençant la vasodilatation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que la réponse aux signaux angiogéniques comme le VEGF et l'hypoxie. Ces mécanismes sont essentiels pour maintenir l'homéostasie vasculaire et pour répondre aux besoins métaboliques et physiologiques des tissus.

Il existe d'autres voies de signalisation de l'angiogenèse non décrites ici car non étudiées lors de nos expérimentations, comme par exemple la voie de l'hypoxie et du facteur induit par l'hypoxie 1 (HIF-1), la voie de l'angiopoïétine qui se lie au récepteur Tie des cellules endothéliales, la voie de l'intégrine, les voies du PDGF et du FGF qui activent une signalisation proche de la voie du VEGF.

Plusieurs voies de signalisation (VEGF, MMPs, vWF, eNOS) interagissent de manière complexe et coordonnée pour réguler tous les aspects de l'angiogenèse, y compris la prolifération, la migration, la différenciation et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

### **I.3. Réparation tissulaire osseuse**

Le tissu osseux est l'un des rares tissus de l'organisme à présenter des facultés d'autoréparation qui peuvent être qualifiées de régénération car le tissu cicatriciel résultant de sa cicatrisation est identique au tissu initial.

La réparation tissulaire osseuse fait référence au processus biologique par lequel le corps régénère et répare les lésions ou les fractures des os (tissu osseux). Par extension, ce processus est également impliqué lors de l'ostéointégration de substituts osseux. Ce processus complexe implique différentes étapes et peut être influencé par de nombreux facteurs locaux ou généraux, et notamment la vascularisation. La réparation tissulaire osseuse permet ainsi à un os fracturé de retrouver sa structure et ses fonctions : c'est la consolidation osseuse (ou guérison osseuse).

Un retard de consolidation est observé dans 5 à 10% des cas, tandis qu'une véritable pseudarthrose (absence de consolidation et arrêt de l'évolution de celle-ci à 6 mois) est retrouvée dans 1 à 5% des cas (156). L'absence de consolidation (pseudarthrose) correspond à la formation d'un mélange de tissus fibreux et osseux ne permettant pas la restauration de la continuité osseuse, de la structure osseuse et n'assurant pas la fonction osseuse.

Ce sous chapitre décrit tout d'abord les mécanismes cellulaires mis en jeu à la suite d'une lésion osseuse de petite taille, puis dans le cadre d'implantation de biomatériau pour réparation de perte de substance osseuse de plus grande taille. Les facteurs (locaux et généraux) influents sur la réparation tissulaire osseuses sont rappelés. Enfin, le rôle primordial de la vascularisation est souligné.

#### **I.3.1. Les mécanismes cellulaires mis en jeu**

##### **I.3.1.1. Lors d'une lésion osseuse de petite taille**

La lésion d'un organe entraîne généralement une cascade biologique conduisant à la fermeture de la plaie par un tissu fibreux (et non pas par le tissu spécialisé de l'organe). Probablement qu'il est apparu plus avantageux, au cours de l'évolution, de perdre cette capacité de régénération de l'organe au profit d'une fermeture rapide de la plaie. Dans une certaine mesure, l'os échappe à cette règle puisqu'il est capable de s'auto-réparer à condition que la lésion soit de petite taille (157). Prenons comme exemple la technique chirurgicale de distraction osseuse qui permet l'allongement progressif d'un membre et qui prouve bien ce potentiel d'auto-réparation du tissu osseux. À la suite d'une fracture, on observe ainsi une cascade d'événements reproduisant, chez le sujet adulte, l'ostéogenèse observée chez l'embryon. Le processus biologique de réparation osseuse est généralement suffisamment efficace pour que l'intervention humaine se limite à un réalignement (réduction du foyer de fracture) et à une immobilisation de l'os fracturé (contention, plâtre, ostéosynthèse....), suivis ou non de rééducation fonctionnelle. Dans les cas où la perte de substance osseuse est trop importante, une reconstruction osseuse chirurgicale sera nécessaire.

Dans les suites d'une lésion osseuse, le processus de réparation tissulaire osseuse nécessite la mise en jeu de mécanismes cellulaires complexes se succédant en plusieurs étapes. La phase initiale qui survient immédiatement après la fracture est une réaction inflammatoire et immunitaire. La lésion osseuse entraîne une rupture des vaisseaux sanguins autour d'elle, créant un hématome, puis un caillot de fibrine aidant à stabiliser la fracture. Cette réaction est caractérisée par la libération de médiateurs inflammatoires (cytokines) et l'activation des cellules immunitaires. L'objectif de cette phase est d'éliminer de la zone lésée les débris

cellulaires et les micro-organismes, afin de la préparer à la phase de régénération osseuse à proprement parler. Les macrophages régulent cette réponse inflammatoire immunitaire. Tout d'abord, les macrophages de type M1 pro-inflammatoires interviennent, puis laissent place aux macrophages de type M2 anti-inflammatoires et pro-réparation tissulaire (158). Les MSC se différencient en ostéoblastes (par activation des voies ostéogéniques, comme celle de la BMP-2) qui migrent vers la zone lésionnelle. Ils synthétisent un tissu mou, appelé tissu de granulation, servant de pont osseux entre les fragments fracturés. Ce tissu de granulation est ensuite minéralisé par les ostéoblastes pour aboutir à la formation d'un cal osseux, permettant une stabilisation primaire du foyer de fracture, terminant la phase inflammatoire. Ensuite, l'étape de réparation osseuse commence. Dans les zones où la fracture est stabilisée par le cal osseux mais où la consolidation osseuse n'est pas encore complète, les chondrocytes (cellules spécialisées du cartilage dérivant de la différenciation des MSC) prolifèrent et produisent un tissu cartilagineux, appelé cal cartilagineux. Il s'agit d'une MEC cartilagineuse composée de collagène de type II, de protéoglycanes (agrégat de sulfate de chondroïtine) et d'eau. Ce cal temporaire sert de soutien mécanique et de structure de croissance pour la future formation osseuse. Par ossification primaire endochondrale (régulée par la sécrétion de facteurs de croissance par les chondrocytes, comme BMP-2, MMP-13, ALP, VEGF), le cal cartilagineux est remplacé par du tissu osseux primaire réticulaire. Ce tissu osseux primaire réticulaire est mécaniquement faible. Il est composé de nombreuses cellules disposées sans ordre dans une matrice peu minéralisée, formée de faisceaux de fibres de collagène I à disposition aléatoire (absence d'organisation de la matrice organique). L'ossification secondaire consiste ensuite à l'organisation de la MEC et à la minéralisation de celle-ci par les ostéoblastes pour aboutir à un tissu osseux secondaire mature lamellaire (compact ou spongieux). C'est la fin de la phase de réparation osseuse. Dans les mois suivants, la phase de remodelage commence. Les ostéoclastes dégradent progressivement le tissu osseux excédentaire et remodelent la structure osseuse pour restaurer sa forme, sa structure et ses fonctions. C'est une phase importante pour renforcer l'os et le rendre capable de supporter à nouveau des charges par exemple. A la fin de cette étape, le tissu osseux nouvellement formé est remodelé et renforcé pour restaurer la structure et la fonction normales de l'os : c'est la consolidation finale.

Le processus entier de réparation tissulaire osseuse jusqu'à consolidation finale peut prendre plusieurs mois.

Physiologiquement, la minéralisation suit de peu la formation de la matrice ostéoïde. Cependant, lors d'un traumatisme, l'os entre localement en remodelage actif. Les ostéoblastes produisent de grandes quantités de matrice ostéoïde. Ainsi plusieurs couches de matrice ostéoïde non minéralisée peuvent s'interposer entre la couche d'ostéoblastes actifs et l'os préalablement minéralisé, avant que la minéralisation ne démarre.

Les cellules endothéliales jouent également un rôle crucial dans le processus de réparation tissulaire osseuse (voir paragraphe 1.3.3 Intérêt de la vascularisation).

La consolidation osseuse implique une orchestration complexe de différents types cellulaires interagissant entre eux permettant la restitution de la structure et des fonctions du tissu osseux après une fracture ou une lésion.

### **I.3.1.2. Après implantation d'un biomatériau pour réparation d'une perte de substance osseuse de plus grande taille**

L'implantation d'un biomatériau dans le cadre de reconstruction de perte de substance osseuse induit en premier lieu une réaction inflammatoire et immunitaire (comme décrite juste au-dessus) déclenchée par la lésion osseuse chirurgicale (faite par le chirurgien pour préparer la zone à combler). Puis, dans un second temps, les macrophages recrutés sur la zone vont moduler l'immunité (159,160). Soit le biomatériau est perçu comme pro-inflammatoire, déclenchant ainsi une inflammation chronique avec maintien des macrophages M1. Puis les macrophages M2 vont contrôler la formation d'une membrane fibreuse d'encapsulation autour de l'implant, bloquant le remodelage osseux et l'ostéointégration de ce dernier. Si le biomatériau n'entraîne pas d'inflammation chronique, les macrophages M1 vont laisser place aux macrophages M2 pro-réparation osseuse permettant la réparation osseuse (ossification primaire, puis secondaire, puis remodelage) jusqu'à consolidation finale et ostéointégration de l'implant. Tout comme dans la réparation tissulaire osseuse, la vascularisation joue un rôle essentiel dans l'ostéointégration des biomatériaux (voir paragraphe I.4.3 La vascularisation des CPC).

### **I.3.2. Les facteurs influents la réparation tissulaire osseuse**

Le processus de cicatrisation osseuse peut être influencé par plusieurs facteurs (161). Le principal facteur de la bonne évolution de la cicatrisation d'un foyer de fracture est la gravité initiale de la fracture (déplacement important, fracture ouverte, perte de substance osseuse, délabrement des parties molles péri-fracturaires...). La stabilité, l'alignement et l'immobilisation totale du foyer de fracture sont indispensables à une cicatrisation correcte. La survenue d'une fracture sur un terrain irradié ou infecté est un facteur de mauvais pronostic de cicatrisation. L'âge reste un facteur essentiel avec une cicatrisation osseuse plus rapide chez le sujet jeune en raison d'une ostéogenèse plus efficace (diminution du potentiel ostéogénique avec l'âge). Une alimentation équilibrée, riche en nutriments essentiels tels que le calcium, le phosphore, les protéines, les vitamines D et C, ainsi que d'autres minéraux et vitamines, est importante pour soutenir la formation osseuse et la cicatrisation. La dénutrition (déséquilibre nutritionnel par bilan énergétique et/ou protéique négatif) est un facteur de risque de ralentissement, voire de non consolidation osseuse (162). De nombreuses pathologies médicales sous-jacentes peuvent influencer négativement la cicatrisation osseuse en affaiblissant la structure osseuse ou en perturbant le métabolisme. Il s'agit par exemple du diabète, de l'ostéoporose, de l'insuffisance rénale, des maladies vasculaires périphériques. Le tabagisme et la consommation d'alcool peuvent entraver la cicatrisation osseuse en réduisant l'apport sanguin aux tissus, en altérant la fonction des cellules osseuses et en augmentant le risque d'infection. De plus, certains médicaments, tels que les corticostéroïdes ou les anti-inflammatoires, certaines chimiothérapies, les immunosuppresseurs, peuvent avoir un impact sur la cicatrisation osseuse en interférant avec le métabolisme osseux ou en affaiblissant le système immunitaire.

Une réadaptation (rééducation) post-fracture reste intéressante pour une cicatrisation osseuse optimale.

Enfin, un apport sanguin adéquat est essentiel pour fournir les nutriments nécessaires, les cellules immunitaires et les facteurs de croissance à la zone de fracture, favorisant ainsi la régénération osseuse (point développé dans le paragraphe suivant).

De nombreux facteurs locaux et généraux influent sur la qualité et la rapidité de la consolidation osseuse. Certains sont modifiables (dénutrition, infection, tabac, diabète déséquilibré, traitement par anti-inflammatoires,...). L'intérêt en pratique clinique sera donc de les repérer pour les réguler au mieux.

### **I.3.3. Intérêt de la vascularisation**

La vascularisation joue un rôle crucial dans la consolidation osseuse, car elle fournit les nutriments, l'oxygène et les cellules nécessaires à la régénération et à la réparation tissulaire osseuse (163). Le tissu osseux reçoit 10 à 15% du débit cardiaque au repos (164).

Les vaisseaux sanguins fournissent les nutriments essentiels tels que les acides aminés, les glucides, les lipides, les minéraux et les vitamines nécessaires à la synthèse des protéines et des minéraux osseux permettant de minéraliser la matrice osseuse. De plus, l'oxygène fourni par la vascularisation est essentiel pour le métabolisme cellulaire et la production d'énergie dans les cellules osseuses.

Les vaisseaux sanguins permettent l'arrivée sur la zone osseuse lésée des cellules impliquées dans la consolidation osseuse, notamment les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes et les cellules immunitaires. Ces cellules jouent des rôles essentiels dans la formation de nouveau tissu osseux, la résorption de tissu osseux endommagé et la modulation de la réponse inflammatoire (comme explicité dans le paragraphe I.3.1. Les mécanismes cellulaires mis en jeu).

La vascularisation élimine les déchets métaboliques générés lors de la lésion osseuse, puis pendant le processus de régénération osseuse, ainsi que les produits de résorption osseuse générés par les ostéoclastes. Cela contribue à maintenir un environnement favorable à la régénération tissulaire osseuse. Le système vasculaire délivre les facteurs de croissance et les cytokines nécessaires à la prolifération, la différenciation et la migration des cellules impliquées dans la consolidation osseuse, comme les BMPs, TGF ou FGF. De plus, les cellules endothéliales possèdent des capacités importantes de signalisation, contrôlant ainsi la croissance, la structuration, le développement et la régénération osseuse (94).

La formation d'un réseau vasculaire apparaît ainsi essentielle pour une réparation osseuse structurelle et fonctionnelle de qualité (95). La présence de vaisseaux sanguins est indispensable pour une régénération osseuse réussie (165). Une altération de la vascularisation sera liée à un retard de cicatrisation et de réparation osseuse (166). L'interaction synergique entre l'ostéogenèse et l'angiogenèse joue un rôle central dans le processus de régénération osseuse (99,167), tandis qu'une revascularisation rapide est essentielle pour une réparation tissulaire osseuse efficace.

La vascularisation intervient à chaque étape de la réparation tissulaire osseuse. Immédiatement après la lésion osseuse, suite à la rupture des vaisseaux sanguins sur le site lésé, il se forme un hématome qui stabilise la région fracturée et diminue le risque de saignements excessifs. Puis, par libération de cytokines, le processus de coagulation est activé avec conversion du fibrinogène en fibrine, qui forme un réseau de fibres autour de l'hématome. Ce réseau de fibrine forme un caillot fibrineux qui consolide l'hématome, aidant à stabiliser la fracture et à préparer le site pour initier le processus de cicatrisation. Ce caillot sert également de matrice pour la migration et la prolifération des cellules endothéliales. La formation de l'hématome puis du caillot entraîne une hypoxie des tissus environnants. Cette hypoxie déclenche une forte réponse pro-angiogénique par la sécrétion de VEGF

essentiellement par les ostéoblastes par l'activation de HIF-1 $\alpha$  secondaire à l'hypoxie (166). Le VEGF concentré initialement dans le caillot sanguin attire les cellules immunitaires qui vont « nettoyer » le foyer de fracture. Ensuite, grâce au VEGF, la migration des cellules endothéliales se poursuit et l'angiogenèse commence. Ces vaisseaux sanguins nouvellement formés apportent des nutriments, de l'oxygène et des cellules immunitaires à la zone de fracture, ainsi que les MSC qui se différencient en ostéoblastes et qui forment le cal osseux. Puis la vascularisation favorise la régénération osseuse en transportant sur le site fracturé les chondrocytes et les différents facteurs de croissance aboutissant à la formation du cal cartilagineux. Le VEGF régule la quantité de cartilage en inhibant la différenciation des progéniteurs en chondrocytes. Les chondrocytes sécrètent eux-mêmes du VEGF, qui va permettre l'invasion du cal cartilagineux par les vaisseaux et le recrutement des cellules osseuses aboutissant au remplacement du cal cartilagineux par du tissu osseux immature puis du tissu osseux mature. Le VEGF favorise ensuite la pénétration des vaisseaux sanguins dans le tissu osseux nouvellement formé. Les cellules endothéliales de ces nouveaux vaisseaux sécrètent BMP-2 qui stimule la différenciation des ostéoblastes et leur capacité de minéralisation sur le site en régénération osseuse. Cette relation paracrine se poursuit jusqu'à la fin de l'étape de remodelage et la consolidation osseuse finale.

L'angiogenèse au sein d'un tissu osseux en réparation est également régulée par d'autres facteurs : la cytokine TNF- $\alpha$  bloque initialement l'angiogenèse lors de la phase inflammatoire, le temps que les cellules immunitaires aient terminé de préparer la zone à réparer. Les MMPs, et notamment MMP9, favorisent la progression des cellules endothéliales au cœur de la zone lésée. D'autres facteurs comme FGF ou PlGF (Placenta Growth Factor) joueraient également un rôle pro-angiogenèse et pro-réparation. La réponse angiogénique à une lésion osseuse est ainsi plus complexe que l'angiogenèse physiologique, nécessitant un couplage avec la réponse immunitaire.

Le couplage angiogenèse-ostéogenèse est principalement basé sur les interactions entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales vasculaires et demeure indispensable pour la continuité du processus du remodelage, notamment dans le contexte de réparation tissulaire osseuse (168). Les nombreuses interactions entre les cellules osseuses et les cellules endothéliales sont indispensables à la consolidation osseuse. Cet aspect sera développé dans le Chapitre III.

La vascularisation est essentielle à la consolidation osseuse en fournissant les nutriments, l'oxygène, les cellules et les signaux de régulation nécessaires à la régénération et à la réparation des tissus osseux endommagés. Un apport vasculaire de qualité favorise un processus de consolidation osseuse efficace et complet.

## I.4. Substituts osseux en céramiques phosphocalciques

Ce sous chapitre détaille les propriétés des CPC permettant leur ostéointégration. Puis il décrit l'ostéointégration des CPC en elle-même, des principes généraux à l'échelle cellulaire (interface cellules osseuses-biomatériau). Enfin, il rappelle les bases de la vascularisation des CPC et son rôle essentiel jusqu'à l'échelle cellulaire (interface cellules endothéliales-biomatériau).

### I.4.1. Les propriétés des CPC

Les substituts osseux sont des biomatériaux destinés à être implantés chez l'Humain afin de combler ou remplacer une perte de substance osseuse. L'objectif est de reconstruire à la fois l'anatomie (la structure) et la fonction osseuse. Un biomatériau est défini comme un matériau biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme, n'entraînant pas d'inflammation ou de réaction toxique chez le receveur.

Les biomatériaux les plus fréquemment utilisés comme substituts osseux sont les bioverres, les métaux et notamment les alliages de titane, les composites (169), les polymères et les céramiques (170,171).

En raison de leur composition chimique proche de celle du minéral osseux, les céramiques à base de phosphate de calcium (HA et phosphate tricalcique - TCP) présentent un intérêt majeur pour la reconstruction des pertes de substance osseuse. Elles sont utilisées dans plus de 50 % des procédures de reconstruction osseuse chaque année aux USA (172).

Les céramiques phosphocalciques comprennent : l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) avec un ratio molaire Ca/P de 1,67 ; le phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) sous forme cristalline  $\alpha$  ou  $\beta$ , avec un rapport Ca/P de 1,5, dont le plus utilisé est le  $\beta$ -TCP ; le phosphate de calcium biphasique (BCP) combinant HA et TCP ; le polyphosphate de calcium (CPP) ; les ciments de phosphate de calcium et les solutions injectables (poudre de phosphate de calcium et solution aqueuse) (9,173).

En dehors de leur parfaite biocompatibilité, ces matériaux céramiques sont connus pour leur bioactivité (propriété permettant des réactions chimiques spécifiques à l'interface implant - tissu receveur) et s'intègrent au tissu vivant conduisant à une liaison physico-chimique intime avec l'os, appelée ostéointégration. L'ostéointégration d'un biomatériau est le gage de sa tolérance à long terme par l'organisme. De plus, lorsque les céramiques phosphocalciques sont macroporeuses, elles guident la repousse osseuse à leur surface et permettent la pénétration d'os néoformé au cœur de leur structure poreuse. Elles sont ainsi ostéoconductrices (elle guident la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact du matériau)(174–176). Elles favorisent l'adhésion et la prolifération des cellules osseuses, fournissant un support structurel pour la régénération osseuse en permettant aux cellules de coloniser leur surface et de se développer. Cependant, cette colonisation osseuse est limitée à de petits volumes (environ 1 cm de profondeur à partir de l'apposition osseuse) ne permettant pas l'invasion entière des plus gros implants (3,177). Ainsi, les grands implants non entièrement colonisés par le tissu osseux néo-formé restent relativement fragiles.

Le biomatériau idéal doit être également ostéoinducteur (capable d'induire la formation osseuse en site non osseux ou à distance de l'apposition osseuse) et ostéogène, c'est-à-dire possédant des cellules ostéocompétentes capables de former un tissu osseux en répondant à un signal de différenciation. Un matériau ostéoinducteur permet le recrutement, l'adhésion,

la prolifération et la différenciation des cellules osseuses. Cependant, le potentiel ostéogène va dépendre de la survie des cellules ostéogéniques dans l'implant et donc de la qualité de la vascularisation (157).

Tous les types de phosphates de calcium n'entraînent pas les mêmes réponses biologiques, et notamment en terme de biodégradation (3). Ainsi, le  $\beta$ -TCP est entièrement et rapidement (4 à 8 semaines) résorbable en raison d'une solubilité importante. La résorbabilité d'un biomatériau est intéressante pour permettre au nouvel os formé de le remplacer à terme complètement, mais elle ne doit pas être trop rapide au risque de ne pas maintenir assez l'intégrité structurelle du site à combler, notamment sur les grands volumes. Celle du  $\beta$ -TCP semble être trop rapide. L'HA, de ratio molaire Ca/P 1,67 ne se dégrade que superficiellement et très lentement, au moins 10 fois plus lentement que le  $\beta$ -TCP, du fait d'une faible solubilité (178). Le BCP serait une solution de résorbabilité moyenne, mais ses propriétés dépendent fortement des ratios HA/TCP utilisés, il est notamment peu ostéoconducteur.

D'un point de vue mécanique, les céramiques phosphocalciques possèdent une certaine résistance et rigidité mais restent fragiles en flexion et en torsion, inconvénient qui peut être compensé par leur envahissement rapide par un os néoformé. Cependant, elles restent encore très peu implantées dans des sites sous très forte contrainte mécanique.

Sur le plan architectural, les biomatériaux en CPC peuvent se présenter sous différentes formes, y compris des poudres, particules, des granules, des revêtements de surface (sur un implant métallique par exemple) des pièces de tailles et géométries variables (coins, cylindres, parallélépipèdes) et des implants sur mesure, ce qui les rend adaptables à différentes applications chirurgicales et de régénération osseuse.

Une des réflexions actuelles en ingénierie tissulaire est l'amélioration de la vascularisation des biomatériaux apportant au cœur des implants macroporeux l'oxygène et les nutriments essentiels à la croissance des nouvelles cellules osseuses. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, lors de l'ostéogenèse, les nouvelles cellules osseuses ne peuvent proliférer et se différencier qu'en présence d'une vascularisation efficace. L'ischémie autour du biomatériau compromettra son invasion par les nouvelles cellules osseuses, et ainsi son ostéointégration, aboutissant à sa perte.

Les nombreuses propriétés des CPC en font un substitut osseux de choix pour la reconstruction des pertes de substance osseuse. En dehors de leur parfaite biocompatibilité, elles permettent l'adhésion et la prolifération cellulaire à leur surface (ostéoconduction). Elles favorisent l'invasion au cœur de leur structure poreuse, s'intégrant au tissu vivant de manière intime : c'est l'ostéointégration. Leur résorbabilité est variable. L'invasion du biomatériau par la vascularisation est essentielle, soutenant l'ostéogenèse et à terme l'ostéoinduction.

#### **I.4.2. L'ostéointégration des CPC**

Les premiers biomatériaux, dits de première génération, étaient « inertes », c'est-à-dire, biocompatibles et tolérés par l'organisme, mais avec un minimum d'interaction avec les tissus environnants. Ils compensent la perte de substance anatomique mais ne se substituent pas à l'os. Ils entraînent la formation d'un tissu fibreux à l'interface entre l'os et l'implant (membrane d'encapsulation), qui peut être responsable de réaction inflammatoire et à terme de rejet de l'implant (179,180). Cette membrane fibreuse d'encapsulation ne permet pas de réaction à l'interface entre os et implant et diminue ainsi considérablement leurs propriétés biologiques.

Par la suite, les biomatériaux « bioactifs » de deuxième génération ont été développés, capables de former un lien, une liaison biomécanique, entre os et implant sans tissu fibreux intermédiaire. L'HA est un substitut osseux bioactif. Cette propriété n'implique toutefois pas l'existence obligatoire d'une ostéoconduction, d'une ostéoinduction ou d'une ostéogenèse ; elle représente l'existence de liaison chimique ou biologique entre l'implant et l'os environnant (181).

### I.4.2.1. Principes généraux

Les différentes étapes du processus d'ostéointégration d'un biomatériau phosphocalcique, telles que décrites par Ducheyne (182) sont exposées dans la **Figure 21** :

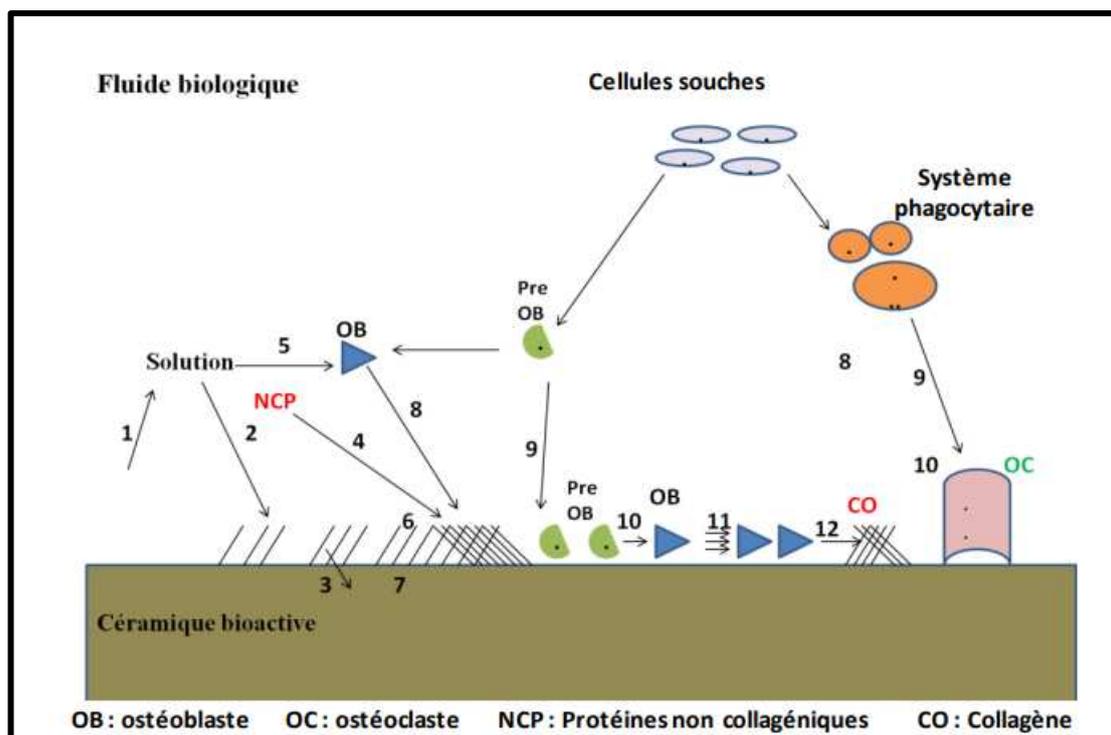


Figure 21 : Les différentes étapes de l'ostéointégration d'un biomatériau phosphocalcique, d'après Ducheyne (182)

Lors de la mise en contact de la CPC avec les fluides biologiques, un équilibre chimique s'établit entre la surface de l'implant et le fluide environnant aboutissant à une dissolution partielle des cristaux de la surface de l'implant (**Figure 21-1**). Cette dissolution est variable selon la composition chimique et la structure cristalline du biomatériau. Elle aboutit à une augmentation locale des concentrations de phosphate et de calcium dans le fluide environnant. Il se produit alors une nucléation secondaire dans les espaces entre les cristaux de la céramique, puis une précipitation et une croissance épitaxiale<sup>9</sup> de fins cristaux d'apatite biologique en surface du biomatériau. Il se forme ainsi, à la surface de l'implant, une couche d'apatite carbonatée de structure chimique similaire à celle de la phase minérale de l'os

<sup>9</sup> L'épitaxie désigne la croissance orientée d'un matériau cristallin sur un substrat. Lors de ce processus, les atomes du matériau en croissance s'alignent sur la structure du substrat, créant ainsi une couche épitaxiale avec une orientation et une morphologie spécifiques.

(**Figure 21-2**). Des échanges ioniques et des interdiffusions<sup>10</sup> s'établissent alors à l'interface implant/couche d'apatite carbonatée (**Figure 21-3**). Puis, les protéines non collagéniques (ostéopontine, sialoprotéine...) de la matrice extracellulaire osseuse s'intègrent en s'adsorbant à la surface de la couche d'apatite carbonatée (**Figure 21-4**) favorisant la fixation des ostéoblastes (**Figure 21-8**). L'activité cellulaire est modifiée par les ions calcium en solution, favorisant le chimiotactisme (**Figure 21-5**) et l'attachement des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) sur le biomatériau (**Figure 21-8**). Cette étape est similaire à la phase d'activation du remodelage osseux, au cours de laquelle les signaux biologiques émis par les cellules bordantes entraînent la migration des cellules osseuses vers les zones lésées en vue de leur reconstruction. Parallèlement, les MSC se différencient en pré-ostéoblastes, les CSH en pré-ostéoclastes, puis adhèrent au matériau (**Figure 21-9**). Les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes, les pré-ostéoclastes en ostéoclastes (**Figure 21-10**). Les ostéoblastes prolifèrent (**Figure 21-11**) et secrètent de la matrice collagénique ostéoïde puis la minéralisent.

Ces interactions chimiques (dissolution, dégradation, précipitation d'ions et formation d'os) à l'interface entre l'os et les matériaux bioactifs, conduisent à ce que les deux soient si étroitement interconnectés qu'ils ne peuvent plus être distingués l'un de l'autre (183). C'est l'ostéocoalescence, qui correspond à l'ostéointégration de l'implant.

#### I.4.2.2. Interface cellules osseuses - biomatériau

La reconnaissance des protéines de la MEC adsorbées en surface du biomatériau par les intégrines transmembranaires (récepteurs spécifiques) de l'ostéoblaste déclenche plusieurs cascades de signalisation conduisant à la formation de structures appelées adhésions focales permettant un ancrage primaire de la cellule au matériau. Par la suite, un réarrangement du cytosquelette permet l'étalement complet de la cellule et l'augmentation des liens protéines adhésives-intégrines (adhésion forte) (**Figure 22**). De la qualité de l'adhésion cellulaire initiale dépendra le comportement physiologique (prolifération et différenciation) ultérieur de l'ostéoblaste. L'adhésion des cellules osseuses au biomatériau dépend avant tout de l'adsorption des protéines de la MEC à sa surface.

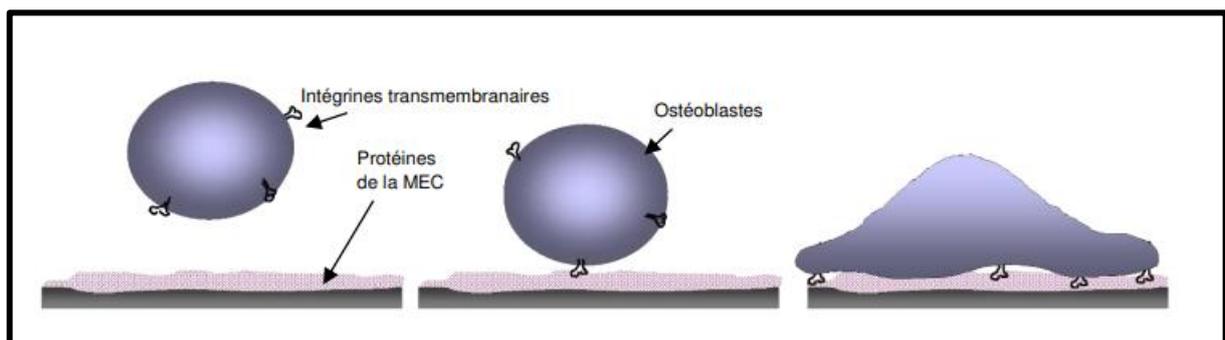


Figure 22 : Schéma représentant l'adhésion cellulaire d'un ostéoblaste aux protéines de la MEC adsorbées en surface d'un biomatériau, d'après Pellenc (184)

*In vitro*, les phosphates de calcium semblent jouer plusieurs rôles essentiels dans les différentes étapes de l'ostéointégration :

- l'HA stimule la différenciation des MSC en préostéoblastes puis ostéoblastes (185) ;

<sup>10</sup> L'interdiffusion est un procédé d'échanges d'atomes par diffusion entre deux matériaux en contact.

- les phosphates de calcium jouent un rôle important dans l'attachement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes au contact du biomatériau (186).

Les intégrines assurent une liaison forte entre le cytosquelette de la cellule (par leur liaison à l'actine) et le biomatériau (par leur liaison aux protéines de la MEC adsorbées à la surface du biomatériau), permettant de contrôler l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Ainsi, l'adhésion des cellules ostéoblastiques dépend d'abord de l'adsorption des protéines de la MEC (fibronectine, collagène,...) à la surface du matériau en phosphate de calcium (187–189). De ce fait, un biomatériau pourrait favoriser l'adhésion et l'étalement des cellules, et donc leurs activités physiologiques (prolifération, différenciation, ...) en favorisant l'adsorption de ces protéines d'adhésion à sa surface. La MEC apparaît ainsi jouer un rôle crucial dans l'organisation interne des cellules (187). La liaison fibronectine-intégrine est essentielle à la maturation des cellules précurseurs vers un phénotype de cellule ostéoblastique différenciée (190) et à la minéralisation de la matrice osseuse (191).

La cellularisation d'un biomatériau implique donc son association à des protéines de la MEC (et essentiellement la fibronectine ou le collagène) favorisant l'adhésion cellulaire des ostéoblastes et ainsi leurs activités physiologiques.

De nombreux travaux sont menés pour étudier l'interface cellules-implant lors de la « cicatrisation » osseuse autour de l'implant. En 1997, Davies et Baldan ont étudié des tiges d'HA implantées dans des fémurs de rats. Ils observaient que la surface de l'implant était composée d'accrétions globulaires qui fusionnaient pour former une couche (matrice semblable à du ciment) à laquelle des fibres de collagène étaient attachées. La dissolution des grains individuels de la surface de l'implant avait créé une topographie de surface rugueuse (192). De nombreux auteurs s'accordent pour dire qu'il se forme en premier cette couche à la surface du biomatériau (193,194). Séparant le biomatériau de la matrice osseuse minéralisée, elle serait constituée d'un dépôt minéral qui aurait pour fonction l'attraction des acteurs permettant la cicatrisation osseuse autour du biomatériau. La première phase de la néoformation osseuse au contact de l'implant est la formation de la matrice ostéoïde et donc l'organisation des fibres de collagènes parallèlement à sa surface. L'ostéointégration va se faire sur les deux surfaces : la surface osseuse et la surface implantaire et ensuite les deux vont se rejoindre.

L'intégration du matériau se fait donc en plusieurs phases : premièrement la synthèse de la matrice ostéoïde, puis la minéralisation de celle-ci qui va permettre l'établissement d'un pontage direct entre la céramique et la surface minérale osseuse.

#### **I.4.2.3. L'effet des CPC sur les cellules osseuses**

La formation de tissu osseux, et sa vascularisation, sont des phénomènes complexes, régulés en partie par de nombreuses espèces chimiques participant au processus de minéralisation de la matrice, agissant comme co-facteurs pour activer des enzymes, ou servant de messagers secondaires des cellules (molécules produites dans la cellule suite à la réception d'un signal extra-cellulaire). Le calcium et le phosphore contenus dans les CPC vont ainsi avoir des effets sur les cellules osseuses.

Le calcium est présent dans l'organisme sous plusieurs formes. La forme ionisée ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est la forme la plus abondante (50%) de calcium dans le sang. Le calcium ionisé est important pour de nombreuses fonctions biologiques, y compris la contraction musculaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine. Une grande partie du calcium dans le sang (40%) est

liée à des protéines, principalement à l'albumine. Cette forme de calcium est moins disponible pour les fonctions biologiques que le calcium ionisé, mais elle constitue une réserve importante. Les 10% restant du calcium dans le sang sont complexés (liés à des composés anioniques tels que le phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ , le bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$ , le citrate, le lactate, ...). Ces complexes contribuent également à maintenir l'homéostasie du calcium. Dans les os (qui contiennent la plus grande partie du calcium de l'organisme) et les dents, le calcium est présent sous forme cristalline (dans les cristaux d'hydroxyapatite), ce qui confère force et rigidité à ces tissus.

Ces différentes formes de calcium dans l'organisme sont régulées par divers mécanismes pour maintenir l'homéostasie du calcium, essentielle à de nombreuses fonctions physiologiques. La calcémie est en moyenne de 8,8 à 10,4 mg/dL (88 à 104 mg/L), soit 2,20 à 2,60 mmol/L, concentration finement régulée par l'action d'hormones : la PTH, la Vitamine D et la Calcitonine évoquées dans le paragraphe I.1.2.3.2. Le rôle des facteurs systémiques. Pour maintenir ou rétablir l'homéostasie du calcium, ces hormones régulent non seulement la formation et la résorption osseuse, mais également la réabsorption et l'excrétion rénales ainsi que l'absorption intestinale du  $\text{Ca}^{2+}$  (195).

Toutes les cellules de l'organisme expriment sur leur membrane un récepteur couplé aux protéines G : la protéine CaSR (Calcium-Sensing Receptor) (196). CaSR est activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, mais également par d'autres ligands comme le  $\text{Mg}^{2+}$ , déclenchant de nombreuses voies de signalisation ayant des effets variables selon le type cellulaire sur lequel se trouve le récepteur.

La concentration intra-cellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  varie très fortement selon les compartiments cellulaires. La majorité du calcium intracellulaire est présente dans le réticulum endoplasmique, où il est majoritairement lié à des protéines comme la calréticuline, avec une concentration estimée entre 40-120 mg/L (1-3 mM). Dans le cytoplasme, elle est environ à 4  $\mu\text{g/L}$  (0,1  $\mu\text{M}$ ). Les flux de calcium intracellulaires déclenchent dans une très grande diversité de fonctions biologiques (197). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans presque toutes les fonctions cellulaires principales, comme le cycle cellulaire et l'apoptose (198). Le contrôle absolu des flux de calcium est ainsi essentiel.

Le calcium exerce plusieurs effets importants sur les ostéoblastes. Tout d'abord, il joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes. Cet effet a été notamment montré *in vitro* par Barradas en 2012 qui retrouvait une expression du facteur de croissance pro-différenciation ostéoblastique BMP-2 triplée dans des MSC humaines cultivées dans un milieu contenant 312 mg/L (7,8 mM) de calcium (199). Le calcium intervient également dans le recrutement, la prolifération et l'activité de ostéoblastes, favorisant la synthèse de la MEC puis la minéralisation de celle-ci. Deux autres études *in vitro* (200,201) retrouvent des effets chimiotactiques attractants sur des ostéoblastes murins, stimulant leur prolifération sur les zones lésées (défect de calvaria) permettant une régénération osseuse et l'expression de marqueurs ostéogéniques. Ces effets passeraient notamment par la voie de signalisation de CaSR.

De plus, les voies de signalisations intracellulaires des ostéoblastes en aval du CaSR peuvent utiliser le calcium comme messenger secondaire (des protéines kinases jouant le rôle d'intermédiaires).

Le calcium extracellulaire est donc un élément essentiel à la signalisation pro-ostéogénique avec un rôle dans la coordination résorption-formation lors du remodelage osseux. Cet effet

est vraisemblablement dépendant de sa concentration. Un effet favorable sur la régénération osseuse est retrouvé dès 100 mg/L (2,5 mM).

L'activité des ostéoclastes est également régulée par le calcium. Lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes, du calcium est libéré dans le sang et pourra ainsi stimuler le recrutement, la prolifération et l'activité des ostéoblastes. Le calcium extra-cellulaire joue un rôle anti-résorption en inhibant l'activité des ostéoclastes dès que la calcémie dépasse 100 mg/L.

En condition pathologique, lorsque la calcémie est basse, les glandes parathyroïdes sécrètent la PTH, qui stimule les ostéoclastes à augmenter la résorption osseuse, libérant ainsi du calcium stocké dans les os dans le sang pour rétablir l'homéostasie calcique. En condition physiologique, une calcémie normale inhibe l'activité des ostéoclastes. Cela permet de protéger le tissu osseux d'une dégradation excessive en cas de maintien anormal des ostéoclastes dans une zone de résorption (202).

Le phosphore est un élément chimique essentiel. Près de 85% du phosphore est présent dans le tissu osseux, la part circulante représente moins de 1% et le reste se retrouve dans les autres tissus. Dans les milieux biologiques, on retrouve le phosphore principalement sous forme de phosphate inorganique (Pi), de phospholipides et d'ester de phosphites. Sa concentration sanguine varie entre 89 mg/L et 149 mg/L (2,87 mM à 4,81 mM). Il est essentiellement intracellulaire. Son homéostasie est finement régulée, sous le contrôle de plusieurs hormones : la Vitamine D (secrétée par les ostéoblastes) favorise son absorption par les intestins, la PTH et le facteur de croissance FGF-23 (secrété par les ostéocytes) favorisent son élimination par les reins (203).

Il joue plusieurs rôles cruciaux. Il est un constituant fondamental des acides nucléiques, tels que l'ADN et l'ARN, qui sont essentiels à la transmission et à l'expression des informations génétiques. Le phosphore est nécessaire à la formation de l'adénosine triphosphate (ATP), la principale source d'énergie cellulaire. L'ATP est utilisée par les cellules pour exécuter de nombreuses réactions biochimiques et maintenir les processus vitaux. De par ce rôle dans les échanges énergétiques, le phosphore est notamment fondamental pour le bon fonctionnement des muscles squelettiques et cardiaque. Le phosphore est un composant essentiel des phospholipides, qui constituent la double couche lipidique des membranes cellulaires. Ces membranes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans la régulation des échanges entre la cellule et son environnement. Le phosphore est impliqué dans de nombreuses réactions métaboliques, y compris la phosphorylation, où il est transféré entre différentes molécules pour réguler les voies métaboliques et la fonction cellulaire. Enfin, conjointement avec le calcium, il est un élément clé de la structure osseuse. Il est présent sous forme de phosphate de calcium dans l'hydroxyapatite, la principale substance minérale des os et des dents, qui confère résistance et rigidité à ces tissus.

Le Pi jouerait un rôle dans la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes en favorisant l'expression de DMP1 (204). Il pourrait également augmenter l'expression d'OPN chez les ostéoblastes pour des valeurs entre 4 mM et 10 mM (205).

Le Pi semble être principalement un inhibiteur de l'activité ostéoclastique : une concentration normale de Pi inhibe la différenciation des ostéoclastes en stimulant la production d'OPG et est capable d'induire directement l'apoptose d'ostéoclastes différenciés de lapin (206). La différenciation et l'activité de résorption de pré-ostéoclastes murins issus de monocytes de la moelle osseuse augmentent avec le ratio Ca/P (207). Elles sont maximales pour un ratio de 1,667 (correspondant à l'HA) et diminuent de manière dose-dépendante avec des quantités

croissantes de phosphates. Les auteurs de cette 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. Comme pour le calcium, l'inhibition par le phosphate permettrait de protéger la dégradation du tissu osseux en cas de dérégulation de la résorption.

L'HA, substitut osseux bioactif, permet la création de liaisons chimique ou biologique entre le biomatériau et l'environnement, favorisant son ostéointégration. Facilitée par l'adsorption des protéines de la MEC à la surface de la CPC, les cellules osseuses adhèrent puis se différencient, prolifèrent et synthétisent une matrice ostéoïde puis la minéralisent : c'est l'ostéointégration du biomatériau. Le calcium et le phosphore des CPC exercent des effets stimulants sur le recrutement, la différenciation, la prolifération et l'activité des ostéoblastes, et des effets inhibiteurs sur l'activité ostéoclastique.

### **I.4.3. La vascularisation des CPC**

#### **I.4.3.1. Le rôle essentiel de la vascularisation dans l'ostéointégration des CPC**

Les substituts osseux remplacent l'os endommagé d'un point de vue structurel et anatomique. Cependant, pour le remplacer d'un point de vue fonctionnel, ils doivent être ostéointégrés. Cette ostéointégration passe avant tout par une vascularisation de qualité. La plupart des biomatériaux osseux disponibles n'induisent souvent pas une vascularisation suffisante. Cela est dû en partie à la difficulté d'intégrer et de réguler plusieurs types de cellules dans les matériaux artificiels, ce qui peut limiter l'ostéointégration du biomatériau et ainsi sa tolérance à long terme (208). Il est donc important de comprendre l'anatomie et les mécanismes d'interaction sous-jacents des vaisseaux sanguins dans le tissu squelettique pour développer des biomatériaux capables de reproduire ce microenvironnement complexe.

Le biomatériau idéal doit être assez stable dans le temps pour permettre de créer un environnement 3D favorisant l'angiogenèse, notamment par recrutement de cellules endothéliales, de protéines et de facteurs pro-angiogéniques (209). Mais il doit être temporaire et résorbable pour permettre la formation et la croissance de nouveau tissu en son sein.

Un apport sanguin adéquat représente un élément essentiel de la croissance du tissu osseux dans les biomatériaux poreux. La vascularisation osseuse, qui fournit des nutriments, de l'oxygène, des cellules et des facteurs de croissance joue un rôle crucial dans la coordination de l'activité des cellules osseuses et de leur migration. Un manque de vascularisation conduit à l'ostéonécrose, qui n'est pas une entité pathologique spécifique, mais la combinaison de conditions résultant d'une altération de l'apport sanguin au tissu osseux (210). Elle est également appelée nécrose avasculaire. En effet, le comblement des défauts osseux par des substituts osseux stables est limité par la vascularisation, car l'angiogenèse doit précéder l'ostéogenèse (211,212). Le couplage de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse est déterminant dans l'environnement de la cicatrisation osseuse (213), et l'ostéogenèse, la vascularisation et la cinétique de résorption du biomatériau doivent être en équilibre pour permettre un processus de remodelage osseux harmonieux et une consolidation efficace (214,215). Les cellules ostéogéniques se développeront dans le site de comblement grâce à l'existence d'un système vasculaire (216), ce qui permet de comprendre pourquoi une mauvaise vascularisation peut entraver une ostéogenèse efficace. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ayant proliférés dans le biomatériau vont pouvoir à leur tour stimuler l'angiogenèse par sécrétion de différents facteurs de croissance pro-angiogéniques (VEGF, FGF, MMP).

En 1981, Albrektsson a suivi les changements vasculaires et le remodelage osseux *in vivo* lors de l'ostéointégration de greffons osseux durant un an et a retrouvé une ostéointégration complète à un an pour les greffons ayant bénéficié d'une revascularisation rapide (5-9 jours en post greffe) et par contre une vascularisation partielle et des îlots osseux nécrosés et donc non ostéointégrés pour les greffons ayant eu un retard de revascularisation (17-29 jours en post greffe) (217).

L'ingénierie de la vascularisation est un objectif essentiel de l'ingénierie tissulaire pour la médecine régénérative. Les cellules endothéliales jouent un rôle central dans la vascularisation avec deux spécificités importantes : les interfaces physiques entre le stroma vasculaire et le sang, et la spécificité phénotypique de l'organe. Des technologies d'échafaudage de biomatériaux qui tiennent compte de ces propriétés uniques des CE ont été mises au point pour promouvoir la vascularisation des biomatériaux de substitution (218). Des variations de propriétés physico-chimiques des matériaux en prenant en compte celles les plus favorables à l'angiogenèse sont étudiées. Une autre voie d'amélioration de la vascularisation serait d'ensemencer les implants avec des cellules endothéliales, de manière à promouvoir la vascularisation. Enfin, la fonctionnalisation des implants avec des facteurs de croissance pro-angiogéniques est également évoquée.

Toutes ces stratégies de promotion de la vascularisation dans les biomatériaux de substitution osseuse sont décrites dans le sous-chapitre 0. Stratégies d'optimisation des CPC de troisième génération.

La prise en compte de l'angiogenèse est essentielle dans la recherche, le développement et l'utilisation des céramiques phosphocalciques (216).

#### **I.4.3.2. Interface cellules endothéliales – biomatériau**

La capacité des cellules endothéliales à interagir efficacement avec les biomatériaux est cruciale pour le succès des applications biomédicales visant à promouvoir la régénération tissulaire osseuse. Les biomatériaux offrent une plateforme prometteuse pour la promotion de la néovascularisation, la régénération vasculaire et la réparation des vaisseaux endommagés.

Comprendre les interactions entre les cellules endothéliales et les CPC est crucial pour développer des stratégies efficaces en ingénierie tissulaire. Ces interactions peuvent influencer l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales, ainsi que leur capacité à former de nouveaux vaisseaux sanguins et à intégrer les biomatériaux dans les tissus environnants (219).

La surface des CPC favorise l'adhésion cellulaire. Les cellules endothéliales peuvent adhérer efficacement à ces surfaces, ce qui est essentiel pour leur colonisation et leur intégration dans les tissus environnants. Les interactions entre les cellules endothéliales et les CPC sont médiées par des interactions physico-chimiques telles que l'adhésion cellulaire aux protéines de la MEC adsorbées à la surface du matériau. Comme pour les cellules osseuses, les protéines d'adhésion cellulaire jouent un rôle essentiel dans la fixation des cellules endothéliales aux CPC. Ces protéines, telles que les intégrines et les cadhérines, se lient aux ligands présents à la surface des CPC (fibronectine ou collagène de la MEC qui ont adhéré à la surface des CPC). Cette interaction induit des signaux intra-cellulaires qui favorisent l'adhésion cellulaire et stabilisent les interactions cellule-matrice. Des voies de signalisation telles que les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase) et PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) sont activées en réponse à l'interaction des cellules endothéliales

avec les CPC. Ces voies de signalisation régulent l'organisation du cytosquelette cellulaire, la formation des jonctions cellulaires et l'expression des protéines d'adhésion cellulaire, contribuant ainsi à renforcer l'adhésion et la fixation des cellules endothéliales aux CPC. D'autres voies comme celle de NF- $\kappa$ B sont impliquées dans la régulation de l'inflammation, de l'apoptose et de la réponse immunitaire, et influent sur la réponse inflammatoire et la survie cellulaire des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales peuvent proliférer pour coloniser davantage le matériau. La prolifération cellulaire est un aspect crucial de la régénération tissulaire, car elle permet la formation de nouveaux tissus (tissu vasculaire et tissu osseux) et la restauration des fonctions biologiques. Les CPC peuvent influencer la prolifération cellulaire en libérant des ions calcium et phosphate dans leur microenvironnement. Ces ions agissent comme des signaux moléculaires pour réguler la prolifération cellulaire en activant des voies de signalisation spécifiques.

La migration cellulaire est un processus crucial dans la régénération tissulaire et vasculaire, car il permet aux cellules endothéliales de se déplacer vers des zones lésées ou des matériaux implantés pour contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et favoriser la formation de nouveau tissu osseux. Les CPC peuvent influencer la migration cellulaire en modulant la réponse des cellules endothéliales à leur microenvironnement. Par exemple, la libération d'ions calcium et phosphate peut activer des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la migration cellulaire.

La différenciation cellulaire des cellules endothéliales sur les CPC est un processus important pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la régénération vasculaire et osseuse. Les CPC peuvent réguler la différenciation des cellules endothéliales en influençant leur phénotype et leur fonctionnalité. Par exemple, ces biomatériaux peuvent induire l'expression de marqueurs spécifiques de l'endothélium vasculaire et la formation de jonctions cellulaires étroites caractéristiques des vaisseaux sanguins. Les CPC peuvent stimuler la différenciation des cellules endothéliales en fournissant des signaux moléculaires et en créant un environnement favorable à la maturation vasculaire. L'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, favorise la différenciation des cellules endothéliales en cellules endothéliales matures et fonctionnelles et la formation de nouveaux vaisseaux.

La modification de la topographie de surface des CPC peut influencer l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. De même, des variations de leur composition chimique font varier les réponses biologiques des cellules endothéliales. Tous ces éléments sont explicités dans le sous-chapitre 1.5 Stratégies d'optimisation des CPC de troisième génération.

Une meilleure compréhension de ces processus peut conduire au développement de matériaux plus efficaces pour la promotion de la néovascularisation et la réparation des tissus endommagés.

#### **1.4.3.3. L'effet des CPC sur les cellules endothéliales**

Comme pour les cellules osseuses, le calcium et le phosphore contenus dans les CPC va exercer des effets sur les cellules endothéliales.

Le calcium joue un rôle crucial dans le bon fonctionnement des cellules endothéliales, et ses fluctuations sont nécessaires à l'angiogenèse (220). Cependant, les effets des variations des concentrations extracellulaires de calcium restent peu explorés.

Une étude *in vitro* (221) a été menée en 2017 par Li sur des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en modifiant la concentration extracellulaire de calcium sous forme de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette concentration a un effet stimulant dose-dépendant (plage testée de 40 à 120 mg/L, soit 1 à 3 mM) sur l'expression de la protéine membranaire VCAM-1. Elle induit une réponse accrue au facteur TNF- $\alpha$ , augmentant ainsi la capacité d'adhésion des monocytes aux HUVECs. Une concentration extracellulaire de calcium plus élevée entraîne également une augmentation de la concentration intracellulaire, sans mobiliser le calcium stocké dans les organites cellulaires (réticulum endoplasmique). La concentration intracellulaire est surveillée à l'aide d'une sonde fluorescente au calcium et observée au microscope confocal. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium semble résulter d'une diffusion passive ou facilitée. Cependant, cette augmentation, caractéristique d'un état inflammatoire, n'affecte pas les niveaux de NO et de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Il est probable que ces deux systèmes soient principalement régulés par des variations rapides de concentration, capables de déplacer les équilibres chimiques, plutôt que par des niveaux prédéfinis, tant qu'ils ne deviennent pas cytotoxiques (221).

Pour rappel, les ROS sont des molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène, comprenant notamment le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) et d'autres molécules similaires. Ces espèces sont naturellement produites dans les cellules comme sous-produits du métabolisme cellulaire, mais elles peuvent également être générées en réponse à divers stimuli cellulaires tels que le stress oxydatif, l'inflammation ou l'exposition à certains produits chimiques ou radiations. Bien qu'essentielles à de nombreux processus cellulaires, des niveaux excessifs de ROS peuvent endommager les structures cellulaires et contribuer à diverses maladies, notamment le cancer ou les maladies cardiovasculaires.

Une autre étude *in vitro* (222) sur des cellules endothéliales murines SVEC4-10 montre qu'une diminution de la concentration en calcium à environ 52 mg/L (1,3 mM), par rapport à un milieu initial de 62 mg/L (1,55 mM), entraîne une réduction de près de 50% de la taille du réseau vasculaire dans une matrice de collagène. Cela suggère l'existence de concentrations extracellulaires de calcium plus favorables à l'angiogenèse (222).

De plus, le calcium influe sur la perméabilité des jonctions cellulaires, qui sont essentielles pour maintenir l'intégrité de la paroi vasculaire. Une concentration de calcium adéquate est nécessaire pour réguler la perméabilité endothéliale, ce qui affecte le passage des molécules et des cellules à travers la paroi des vaisseaux sanguins.

Le calcium est également impliqué dans la cascade de coagulation sanguine. Il participe à l'activation de différentes protéines impliquées dans la coagulation, contribuant ainsi à la formation de caillots sanguins en réponse à une lésion vasculaire.

Enfin, il joue un rôle dans la régulation de la contraction et de la relaxation des cellules musculaires lisses présentes dans les parois des vaisseaux sanguins. Cette régulation de la vasomotricité influence le diamètre des vaisseaux sanguins et donc la pression artérielle et le débit sanguin.

Le phosphate altère l'activité des cellules endothéliales, au-delà des doses physiologiques. À partir d'une concentration extracellulaire de 77 mg/L (2,5 mM) de  $\text{P}_i$ , il déclenche l'apoptose des cellules endothéliales en induisant une surproduction de ROS intracellulaires (223). Des concentrations dépassant 77 mg/L (2,5 mM) entraînent des défauts dans l'angiogenèse,

comme observé dans un modèle de membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM), avec un réseau vasculaire moins développé et plus rigide. Les cellules endothéliales E.Ahy926 exposées à une concentration de 77 mg/L (2,5 mM) ne parviennent pas à former des tubules dans un modèle de tubulogénèse sur Matrigel®. Cette concentration de Pi diminue également l'expression de la protéine annexine II, tant *in vitro* que *in vivo* chez les patients atteints d'hyperphosphatémie. L'annexine II est cruciale pour le bon fonctionnement des membranes plasmiques, influençant ainsi la mobilité cellulaire et, par extension, l'angiogénèse (224). Les effets néfastes résultent également de l'inhibition de la voie de signalisation de l'eNOS lorsque les concentrations de Pi s'éloignent trop des valeurs physiologiques, ce qui perturbe l'angiogénèse en réduisant la disponibilité de NO nécessaire à la formation de vaisseaux sanguins (225).

Une vascularisation efficace est une condition indispensable à l'ostéointégration des substituts osseux en CPC, gage de leur tolérance à long terme par l'organisme. Les CPC permettent l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Le calcium exerce un rôle essentiel au bon fonctionnement des cellules endothéliales, avec des actions essentiellement pro-angiogéniques. Le phosphore est également crucial pour les cellules endothéliales, mais des niveaux élevés de Pi dans le milieu extra-cellulaire peuvent avoir des effets néfastes. La régulation de la calcémie et de la phosphatémie s'avèrent nécessaires pour une angiogénèse efficiente.

Comme décrit précédemment, les vaisseaux sanguins transportent les cellules, les nutriments et l'oxygène nécessaires au remodelage physiologique et à la consolidation du tissu osseux après une lésion. Lorsque la perte de substance osseuse est trop grande ou sur des zones soumises à de trop fortes contraintes, la réparation ne peut pas se faire correctement, et l'intervention humaine est indispensable. Il est maintenant communément utilisé des biomatériaux de substitution pour combler les pertes de substance osseuse. La survie à long terme de ces implants est conditionnée par leur ostéointégration, nécessitant une vascularisation de qualité.

## **I.5. Stratégies d'optimisation des CPC de troisième génération**

Ce sous chapitre expose les problématiques de la reconstruction des pertes de substance osseuse de grande taille et les enjeux actuels dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, notamment dans la vascularisation des biomatériaux. Par la suite, deux méthodes d'optimisation des propriétés des CPC, qui seront évaluées dans les travaux expérimentaux, sont détaillées : le contrôle de la porosité et la modification de la composition chimique par le dopage au silicium.

### **I.5.1. Problématiques et enjeux**

Malgré des progrès significatifs dans le domaine de l'ingénierie des tissus osseux, la reconstruction des grands défauts osseux causés par des traumatismes, des conditions pathologiques dégénératives, des accidents vasculaires ou la résection d'une tumeur reste un défi.

Lorsque la taille du défaut est petite et dans une zone où l'autoréparation est possible, un processus de réparation tissulaire osseuse se produit jusqu'à cicatrisation complète, comme décrit dans le sous-chapitre I.3. Réparation tissulaire osseuse (226,227). Par conséquent, l'os nouvellement formé retrouve des propriétés physico-chimiques et mécaniques similaires à celles du tissu squelettique environnant.

Cependant, lorsque la taille du défaut osseux dépasse la taille critique, il ne peut pas cicatriser spontanément, et une chirurgie de remplacement osseux est nécessaire pour réparer les tissus squelettiques endommagés.

La technique de référence pour la réparation des pertes de substance osseuse importantes reste la greffe osseuse autologue. Actuellement, plus de deux millions de greffes osseuses sont pratiquées chaque année dans le monde pour combler les grandes lacunes osseuses (173). L'os est ainsi le deuxième tissu le plus fréquemment transplanté dans le monde, après le sang. Les autogreffes sont considérées comme la technique de référence car elles peuvent notamment préserver les vaisseaux sanguins et fournir les signaux ostéogéniques appropriés pour guider la nouvelle croissance osseuse (228). Les autogreffes apportent également un cocktail de facteurs de croissance et de cellules nécessaires pour permettre le processus de réparation osseuse.

Toutefois, l'autogreffe osseuse présente un certain nombre de limites, telles que la morbidité supplémentaire liée au prélèvement du greffon (douleur, saignement, infection, fracture, temps opératoire augmenté), la forme et la quantité limitées du greffon disponible, la résorption osseuse du greffon notamment par défaut de vascularisation (229–231). Une partie de ces limites est atténuée par l'utilisation d'allogreffe ou de xéno greffe, mais qui possèdent des propriétés mécaniques et ostéogéniques diminuées par les traitements subis, avec un taux d'infection et de complications élevé.

Dans ce contexte, la réparation des pertes de substance osseuse est souvent effectuée par des substituts osseux. Les substituts osseux sont définis comme des "matériaux synthétiques, inorganiques ou biologiquement organiques, qui peuvent être insérés pour le traitement d'un défaut osseux à la place de l'os autogène ou allogène" (232). Pour reproduire la fonction du tissu osseux, l'implant osseux idéal doit fournir une matrice ostéoconductrice permettant de guider l'ossification, ainsi que des facteurs ostéoinducteurs pour diriger la différenciation ostéogénique des cellules. Cela reste un défi médical majeur.

Les conditions essentielles à la cicatrisation osseuse consistent en un environnement mécaniquement stable (matrice) associé à la présence de cellules ostéogéniques (précurseurs ou MSC), d'une matrice ostéoconductive (à la surface de laquelle les cellules osseuses peuvent adhérer, proliférer et se différencier) et d'un stimulus ostéoinducteur (233,234). Par conséquent, le matériau implanté devrait idéalement être biocompatible, ostéoconducteur et ostéoinducteur (c'est-à-dire stimuler le recrutement et la différenciation des précurseurs en cellules osseuses matures).

Dans les années 1980, les biomatériaux de deuxième génération ont réussi à reproduire les caractéristiques structurelles macroscopiques et les propriétés mécaniques des tissus osseux, mais ils ne sont toujours pas suffisants pour générer une vascularisation, et présentent souvent des problèmes de cicatrisation. Cette limitation est due au fait que ces biomatériaux sont limités à un seul type de tissu et qu'ils se concentrent principalement sur les minéraux osseux inorganiques. Ils ignorent donc d'autres tissus importants du système organique squelettique, et notamment le tissu vasculaire.

Depuis les années 2000, les biomatériaux ont été développés dans l'idée de servir de support et de guide pour la régénération osseuse. Ils sont capables d'accueillir des facteurs de croissance, de fournir une surface pour l'attachement des cellules et de développer une condition 3D pour la communication de cellule à cellule (209). Pour la régénération osseuse, une combinaison d'éléments est nécessaire, impliquant le biomatériau (échafaudage poreux), les cellules et les agents bioactifs (235). Pour obtenir une régénération osseuse satisfaisante, il est nécessaire d'avoir une vascularisation sous-jacente adéquate, qui est le point fondamental d'une régénération osseuse réussie. Cette combinaison d'éléments guidera et favorisera donc la régénération osseuse, mais soutiendra principalement l'angiogenèse et la vascularisation. Le principal défi dans le traitement des grands défauts osseux consiste à combler cette perte de substance et à permettre à la vascularisation de se relier aux tissus environnants pour fournir de l'oxygène, des nutriments et des cellules.

L'angiogenèse est régie par des mécanismes moléculaires et cellulaires et correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la structure sanguine existante, nécessitant la prolifération et la migration des cellules endothéliales constitutives, à la suite d'un stimulus angiogénique (134). L'état de l'angiogenèse est déterminé par l'équilibre entre les facteurs et cytokines pro- et anti-angiogenèse (209). Le biomatériau doit pouvoir soutenir cette angiogenèse sans la ralentir, cette propriété d'angioconduction est essentielle. Un compromis doit être trouvé entre l'angioconductivité et les propriétés mécaniques du biomatériau (236).

Cependant, si l'angiogenèse sur un biomatériau angioconducteur est indispensable à la régénération osseuse, elle est spontanément lente et ne suffit pas à assurer une vascularisation adéquate notamment au cœur des grandes pertes de substance (8). La mauvaise ostéointégration et la perte de l'implant sont généralement liées au manque de vascularisation. C'est pourquoi celle-ci doit être renforcée et favorisée par divers facteurs physiques et biochimiques. L'augmentation de l'angiogenèse peut soulager les symptômes de l'ischémie et faciliter le transport des nutriments, ce qui est essentiel pour la réparation/régénération osseuse (9).

L'enjeu actuel en ingénierie tissulaire osseuse est le développement d'une nouvelle génération de biomatériau, facilitant l'ostéoconduction et la vascularisation, pour permettre une ostéoinduction en offrant la possibilité de formation de tissu osseux sur des larges pertes de

substance sans contact direct avec l'os natif, favorisant ainsi l'ostéointégration des implants et leur bonne tolérance à long terme.

Plusieurs grandes stratégies d'amélioration de la bioactivité des substituts osseux (biocompatibilité, ostéoconduction, vasculogénèse-angiogénèse, ostéoinduction, ostéointégration) se dégagent (255) :

- tout d'abord, la conception d'implant « sur mesure » par des techniques de fabrication additive permet d'obtenir des pièces de la taille et de la forme exacte de la perte de substance. Cette géométrie sur mesure entraîne un contact intime entre les berges osseuses et l'implant. De plus, les paramètres micro- macro-structuraux (porosité) peuvent être précisément contrôlés.

- L'optimisation des propriétés physiques de l'implant est également envisagée. Par interaction avec ses protéines d'adhérence, certains paramètres physiques des biomatériaux sont capables de modifier le comportement des cellules à leur surface, c'est notamment le cas de la rigidité, la surface spécifique, la rugosité. L'architecture micro-macroporeuse de l'implant va faire varier ces paramètres. L'optimisation de la microstructure de l'implant modifie ainsi l'interface biomatériau-fluide biologique.

- La modification de la composition chimique par dopage ionique est largement étudiée. Le silicium (Si) est par exemple décrit comme ayant un effet positif sur les cellules endothéliales et sur les cellules ostéoformatrices (17).

- La modification des paramètres extrinsèques est aussi décrite. L'ajout (par adsorption, fonctionnalisation, thérapie génique) dans le biomatériau de facteurs de croissance osseuse (notamment les BMP) qui permettent la différenciation des cellules souches en cellules précurseurs osseuses et donc une possible ostéoinduction est très étudiée (237–239).

- L'implantation de biomatériaux pré-cellularisés avec des cellules souches mésenchymateuses (MSC) et / ou des cellules progénitrices endothéliales (EPC) est également exploré. Cela stimulerait l'angiogénèse et l'ostéogénèse dans le matériau, non seulement par la multipotence de ces cellules souches, mais surtout par leurs fonctions paracrines (sécrétion de facteurs bioactifs).

Le travail présenté dans ce mémoire s'est focalisé sur l'étude et l'évaluation de l'angiogénèse et de l'ostéogénèse sur des CPC en HA avec variation de deux propriétés : la microporosité et le dopage au silicium. L'objectif est de développer une architecture, communément appelée « scaffold », dont le design chimique (composition) et physique (architecture) serait optimisé pour répondre à sa fonction : favoriser la réparation tissulaire osseuse.

Pour rétablir une fonction osseuse, un substitut osseux doit être complètement ostéointégré. Actuellement, l'ostéointégration des biomatériaux osseux est souvent limitée par un défaut de vascularisation de ceux-ci. L'obtention d'un biomatériau de troisième génération capable de stimuler à la fois l'ostéogénèse et l'angiogénèse de manière à favoriser son ostéointégration nécessite l'optimisation de nombreux paramètres. La conception sur mesure, permettant notamment le contrôle du taux de porosité, et le dopage au silicium sont largement évoqués et étudiés.

### **I.5.2. Des implants « sur mesure »**

Les performances de l'implant peuvent être augmentées en adaptant sa géométrie au site receveur (le contact entre l'implant et la berge osseuse doit être parfait) et en contrôlant

précisément ses paramètres macro- et micro-structuraux. En effet, le succès de son ostéointégration repose essentiellement sur sa capacité à être colonisé par le tissu osseux néoformé, les vaisseaux sanguins, les cellules et les biomolécules actives. Ces deux paramètres (contrôle de la géométrie et de la macro-microstructure) peuvent être maîtrisés par une conception de l'implant « sur mesure ».

Les phosphates de calcium sont le plus souvent utilisés en pratique sous forme de poudre ou de granules. Cependant, pour combler des pertes de substance de plus grande taille, il est possible de fabriquer des implants en 3D sur mesure ayant exactement la taille et la forme de la perte de substance osseuse à combler. Cela permet un rapport intime entre les berges de la perte de substance osseuse et l'implant et facilite ainsi son ostéointégration.

Les procédés de fabrication additive faisant appel à la conception et à la fabrication assistées par ordinateur (CAO/FAO) permettent de contrôler l'architecture interne de l'implant, ainsi que sa forme (taille et géométrie). Il est ainsi possible d'obtenir un implant « sur mesure » (de géométrie complexe et adaptée à chaque patient) ayant un contact intime avec les berges osseuses. La fabrication additive regroupe les procédés permettant de fabriquer des pièces, par ajout successif de couches de matière, à partir d'un modèle numérique, sans recourir à un quelconque outillage. Elle permet une personnalisation complète de l'implant (liberté de formes, de tailles et de géométries), avec une économie de matière et un gain de temps.

Cela correspond à un processus d'impression 3D, à partir d'un fichier informatique modélisant exactement la forme de l'os à imprimer. Ces architectures 3D sont notamment obtenues par photopolymérisation en cuve ou stéréolithographie (SLA). La SLA est une des techniques qui permet de fabriquer des objets solides à partir d'un modèle numérique. L'objet est obtenu par superposition de tranches fines de matière (fabrication additive). Le processus débute avec un modèle de l'objet à fabriquer. Ce modèle est obtenu grâce à un logiciel de CAO ou par acquisition numérique d'un objet existant qu'on veut reproduire. Le modèle une fois dessiné doit être exporté dans un format standard, le format STL (Standard Tessellation Language), décrivant le modèle sous forme de surfaces triangulaires contiguës. Le fichier STL est transmis à l'appareil de SLA. Le modèle (en 3D) est découpé en tranches (2D) d'épaisseur fixe. Cette épaisseur est choisie par l'opérateur et détermine la résolution de la restitution. Ce paramètre détermine donc la précision de l'objet qui va être produit. Puis l'objet est ensuite produit par FAO. Une suspension photosensible de monomères chargée de poudre céramique est sélectivement polymérisée par un faisceau laser ou une lumière ultraviolette (UV). La pièce consolidée, élaborée couche par couche, est ensuite nettoyée pour éliminer l'excès de suspension non polymérisée puis déliantée pour évacuer le polymère et frittée pour obtenir une pièce céramique dense.

En 2013, Brie et al. (240) ont introduit un nouveau concept pour la reconstruction des défauts osseux craniofaciaux de grande taille et de forme complexe. Ils ont développé des implants en hydroxyapatite avec des pores périphériques, fabriqués par SLA et personnalisés à partir de scanners du crâne du patient. Leurs résultats montrent que ces implants céramiques peuvent reconstruire avec succès de vastes défauts osseux craniofaciaux, offrant à la fois des propriétés mécaniques et ostéoconductrices supérieures. Ces nouveaux implants sont particulièrement adaptés pour la reconstruction de zones larges (supérieures à 25 cm<sup>2</sup>) et complexes, telles que les zones frontales. Ils présentent des qualités mécaniques et biologiques qui dépassent celles des implants actuellement disponibles sur le marché. Le processus commence par la reconstruction en 3D du crâne du patient à partir d'images scanner. Ensuite, un implant sur mesure est conçu et simulé en 3D selon les dimensions et la forme exactes de la zone d'implantation (**Figure 23 A**). La fabrication de l'implant se fait par SLA. Dans ce processus, une couche de pâte photosensible contenant un mélange de poudre céramique et de monomères photopolymérisables est déposée. Ensuite, une source de lumière sélective, comme un laser, solidifie chaque couche successivement, formant ainsi l'implant couche par couche avec une épaisseur de couches d'environ 1/10<sup>ème</sup> de millimètre. Une fois l'implant fabriqué, il subit un processus de frittage à haute température, généralement entre 1200 et 1300°C pour les biocéramiques phosphocalciques. Ce processus de frittage consolide l'implant et lui confère ses propriétés finales, assurant sa solidité et sa durabilité (**Figure 23 B et C**). La zone périphérique macroporeuse vient surchapper les berges osseuses, permettant un contact intime avec l'os natif et la colonisation des macropores. La zone centrale, non colonisable, dense et épaisse, offre une certaine résistance mécanique. Au total, ce processus aboutit à la création d'un implant céramique personnalisé, reproduisant fidèlement la simulation en 3D, et offrant ainsi une solution adaptée et précise pour le patient.

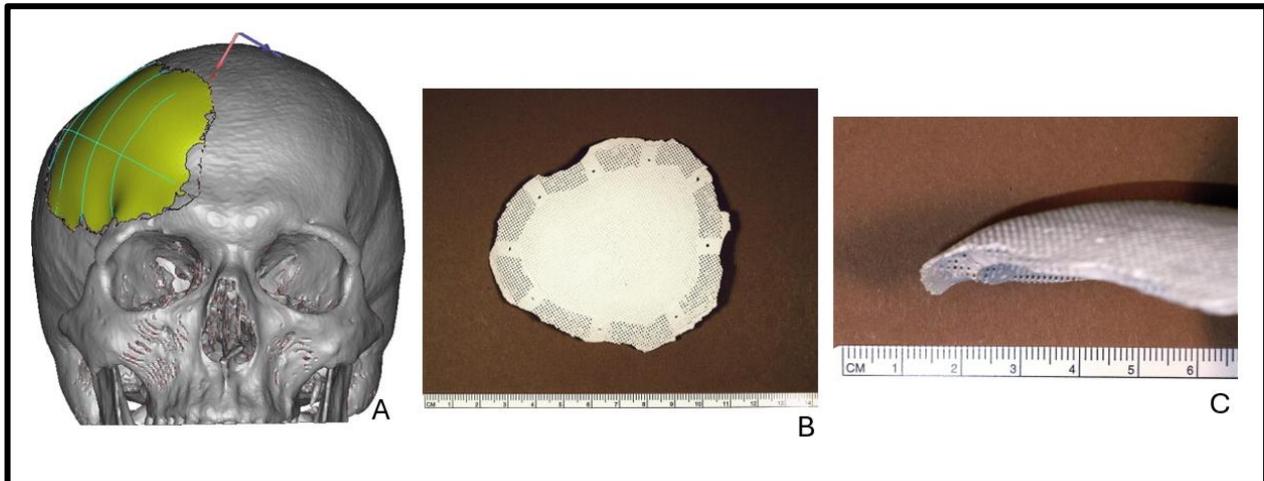


Figure 23 : De la modélisation à la fabrication par stéréolithographie d'un implant crânien « sur mesure » en HA, d'après Brie (240)

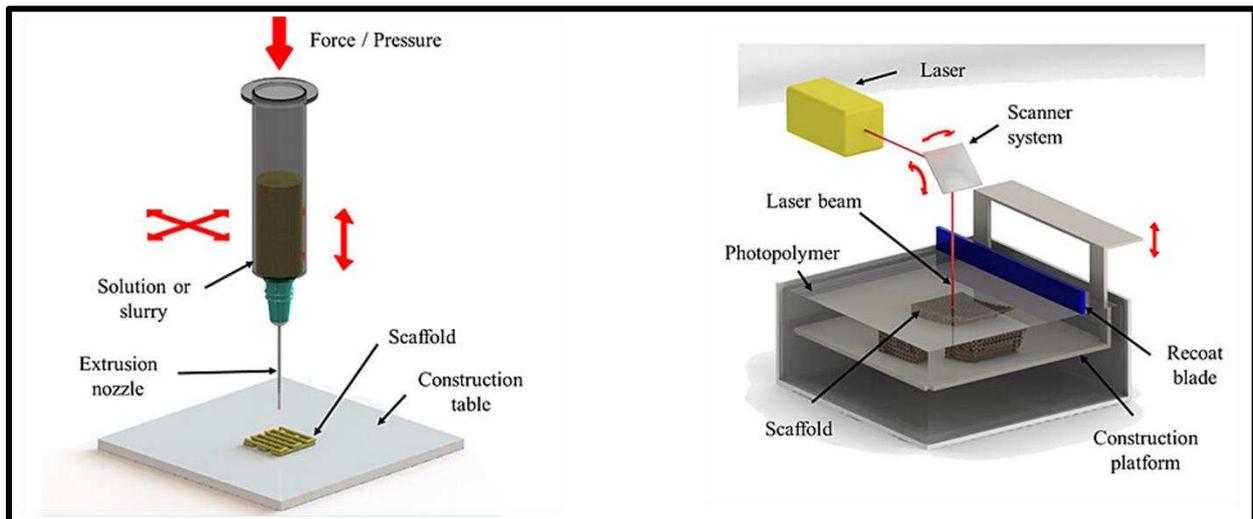
Actuellement, les recherches se tournent vers la bioimpression, c'est à dire l'impression 3D de tissu avec une encre contenant des cellules permettant ainsi de créer des objets hybrides vivants-matériaux. Par exemple, il est maintenant possible d'imprimer en 3D une oreille à partir d'un hydrogel de collagène contenant les cellules cartilagineuses du patient, organe qui pourra être greffé (241).

Les méthodes de fabrication additive, et plus précisément la stéréolithographie, permettent le contrôle de la géométrie et de l'architecture macro-microporeuse de l'implant, favorisant ainsi son ostéointégration. La modification de l'architecture change l'interface entre le biomatériau et les fluides biologiques, et influence donc les réponses cellulaires.

### I.5.3. Une architecture poreuse contrôlée

#### I.5.3.1. Les méthodes de fabrication additive

L'amélioration des performances des biomatériaux osseux nécessite un contrôle précis de leur architecture multi-échelle. Une architecture poreuse contrôlée et adaptée, à l'échelle des cellules, apparaît en effet nécessaire pour obtenir une intégration biologique optimale de l'implant. L'élaboration de scaffolds à architecture poreuse complexe multi-échelle contrôlée requiert l'utilisation de techniques de mise en forme par prototypage en utilisant des technologies de fabrication additive à partir d'un modèle numérique CAO/FAO et une bonne maîtrise du frittage des céramiques (242). La **Figure 24** schématise les deux principales technologies de fabrication additive utilisées pour la mise en forme de céramiques macroporeuses par addition de matière : la (micro)stéréolithographie ( $\mu$ SLA) et la micro-extrusion (243).



De façon similaire à la SLA, mise en œuvre avec succès pour fabriquer des implants d'architecture macroscopique sur mesure à l'échelle du patient, la microstéréolithographie est développée pour fabriquer des pièces comportant des pores de géométrie complexe et contrôlée avec une grande précision (de l'ordre de 20  $\mu$ m) à l'échelle des cellules, précision jusqu'à 10 fois plus élevée que celle de la SLA. Le principe repose sur l'illumination par une lumière UV de la couche de suspension à polymériser, par le biais d'un masque dynamique généré par un dispositif numérique à micromiroirs (244). L'utilisation d'une technique aussi précise exige une formulation optimale de la suspension durcissable aux UV, combinée à un contrôle total des paramètres de traitement. Une étude a été menée au laboratoire proposant une méthode empirique de traitement des scaffolds d'hydroxyapatite dopée au silicium prenant en compte les phénomènes de surdurcissement (ou surpoymérisation), qui se produisent en raison de la diffusion de la lumière sur les particules céramiques, pendant la photopolymérisation, et le retrait pendant le frittage, pour une production fiable de matériaux

céramiques poreux (245). La  $\mu$ SLA permet le contrôle fiable de la forme et de la taille des pores, indispensable dans la conception des scaffolds.

La micro-extrusion, également appelée robocasting est basée sur le dépôt robotisé d'une pâte céramique visqueuse par extrusion continue au moyen d'une buse sur une plate-forme de construction. Cette technologie, brevetée et développée par Cesarano pour des applications céramiques, exige un contrôle total des propriétés rhéologiques du filament de pâte (246). En effet, la suspension céramique doit subir une transformation d'un comportement pseudoplastique à un comportement dilatant au cours de l'extrusion, afin d'éviter la déformation de la pièce en céramique après l'extrusion et l'affaissement des filaments, en particulier pour les échafaudages les plus poreux. Cette technique permet l'obtention d'échafaudages poreux dans lesquels des cavités sont ménagées pour y inclure par exemple des gels chargés en molécules biologiques. Ces architectures sont étudiées afin d'aboutir à un design qui permette après implantation la libération progressive et contrôlée des molécules dans l'environnement biologique local ciblé pour une activité optimale.

Le réseau de pores semble être un acteur essentiel à la rapidité et à la qualité de la régénération osseuse. Les paramètres architecturaux à contrôler sont :

- La macroporosité interconnectée : taux de porosité ou volume de porosité, taille moyenne des pores, distribution et voies d'interconnexion, géométrie des pores, interconnexions entre pores. Un macropore est un pore dont le diamètre est supérieur à 10  $\mu$ m. Il correspond à une macro-cavité obtenue pendant la mise en forme de la céramique (247).
- La microporosité ouverte interconnectée. Elle traverse le matériau et débouche en sa surface, modifiant ainsi les propriétés de surface de ce dernier, spécifiquement la rugosité, la microtopographie de surface et la surface spécifique. Un micropore est un pore dont le diamètre moyen est inférieur ou égal à 10  $\mu$ m. Il représente l'espace vide entre les grains. Cette microporosité peut être contrôlée lors du frittage de la pièce céramique.

La **Figure 25** montre les pâtes céramiques et des exemples de pièces ou de réseaux de pores obtenus par microstéréolithographie (sous-figures 1,3 et 5) et par micro-extrusion (sous-figures 2,4 et 6).

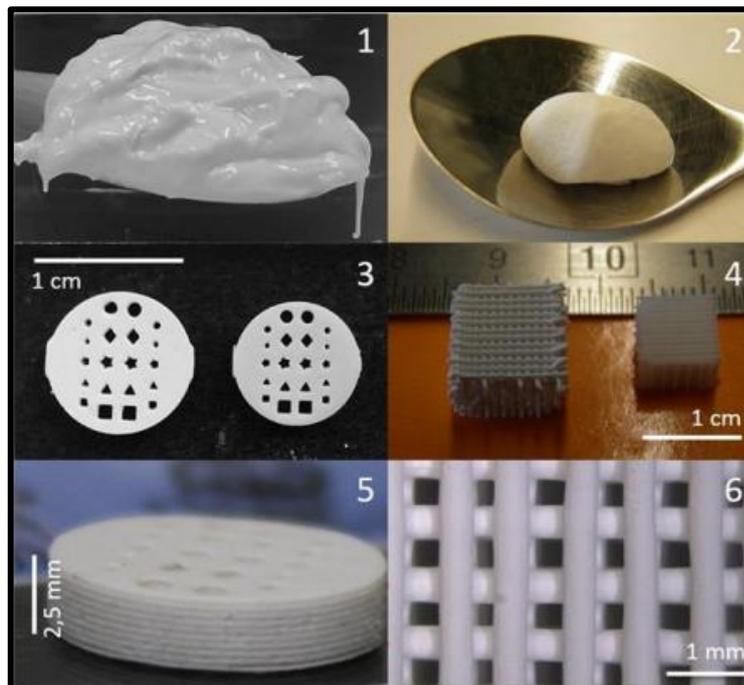


Figure 25 : Pâtes céramiques et pièces obtenues par microstéréolithographie (1,3,5) et micro-extrusion (2,4,6), d'après Champion (248)

### I.5.3.2. Macroporosité – Macrostructure (taux de porosité, taille des pores, voies d'interconnexion, géométrie)

Comme évoqué plus haut, l'architecture de l'implant joue un rôle crucial dans la modulation de la réponse biologique en affectant des propriétés telles que le comportement de dégradation, la perfusion de nutriments, l'invasion cellulaire, l'attachement et la différenciation des cellules (249). L'adaptation de cette architecture est donc essentielle. Les paramètres suivants peuvent être modulés pour améliorer les propriétés des biomatériaux : le taux ou le volume de porosité, la taille des pores, la distribution et les voies d'interconnexion des pores, et enfin leur géométrie (250).

L'ostéoconduction est proportionnelle à la porosité et s'améliore en présence d'un degré plus élevé. Le taux de porosité optimal d'un implant se situe entre 40 et 80%. En effet, il doit être assez poreux (> 40 %) pour permettre la colonisation des cellules (et notamment des cellules osseuses ostéogéniques et des cellules endothéliales), mais ne doit pas l'être trop (< 80 %) pour assurer un maintien mécanique suffisant de l'implant, notamment durant la première phase d'intégration (251).

La taille des pores aurait cependant un impact plus important sur la colonisation osseuse que le taux de porosité (252). La taille des cellules et leur condition de migration sont à prendre en compte pour optimiser la conception du matériau et spécifiquement la taille des pores. La plupart des cellules impliquées dans la recolonisation osseuse mesurent quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ , les plus volumineuses étant les ostéoclastes (comme défini dans le chapitre I.1.1.1.2.4. Les ostéoclastes) qui mesurent environ 100  $\mu\text{m}$ . Ainsi, des pores de 50-100  $\mu\text{m}$  permettent d'observer une colonisation osseuse (253–255), mais l'ostéoconduction semble meilleure

avec des pores de taille supérieure (300  $\mu\text{m}$ ) (256). Il en est de même pour la distribution de la vascularisation dans le biomatériau. Une taille de pore de 50-100  $\mu\text{m}$  permet la formation et le développement de vaisseaux sanguins (permet la migration cellulaire et le transport). Cependant, la vascularisation *in vitro* et *in vivo* est facilitée par des pores de grande taille (>300  $\mu\text{m}$ ) permettant une répartition plus efficace de l'oxygène, des nutriments et de l'apport de cellules (257,258). Une taille de pore inférieure entraînerait une concentration en oxygène insuffisante pour la survie des cellules osseuses et une chondrogenèse favorisée par rapport à l'ostéogenèse (253). La macroporosité facilite la migration des cellules endothéliales et le transport des ions et des nutriments (259). Une taille de pore comprise entre 300 et 600  $\mu\text{m}$  semble favorable à l'attachement, à la migration, à la prolifération des cellules osseuses et au développement d'un réseau vasculaire. La taille des pores joue ainsi un rôle important dans la croissance des tissus dans les architectures de biomatériaux. La quantité de tissu fibreux qui se développe augmente avec la diminution de la taille des pores, et la présence de ce tissu fibreux bloque l'ostéointégration de l'implant. La grande taille des pores est bénéfique pour la croissance des vaisseaux sanguins, et le diamètre des pores inférieur à 400  $\mu\text{m}$  limite la croissance des vaisseaux sanguins et entraîne un diamètre de vaisseau sanguin plus petit pour la même taille d'interconnexion 120  $\mu\text{m}$  (260).

La porosité et les voies d'interconnexion jouent un rôle important dans l'invasion des vaisseaux sanguins dans l'échafaudage. Elles permettent la migration et la prolifération des cellules endothéliales et des vaisseaux sanguins. Les biocéramiques ayant une porosité élevée et des voies d'interconnexion appropriées devraient permettre au tissu d'infiltrer et de remplir l'architecture, en laissant suffisamment d'espace pour la formation et la croissance de nouveaux tissus (particulièrement osseux) avec une organisation cellulaire et structurelle similaire à celle observée *in vivo* (258,261). La taille des voies d'interconnexion influence non seulement la taille des vaisseaux sanguins qui se développent dans la structure poreuse, mais aussi le nombre de vaisseaux sanguins formés dans les pores de la biocéramique *in vivo* (262). L'augmentation de la taille des pores n'entraîne qu'une augmentation de la taille des vaisseaux sanguins qui se développent dans la structure macroporeuse de la biocéramique. Cependant, avec l'augmentation de la taille de l'interconnexion, la taille et le nombre des vaisseaux sanguins formés dans les biomatériaux augmentent. Il semble donc que la taille des interconnexions soit plus importante pour la vascularisation dans l'échafaudage que la taille des pores. Le macropore fournit principalement l'espace pour les vaisseaux sanguins nouvellement formés, et l'interconnexion fonctionne comme une porte pour la croissance des vaisseaux sanguins ; ainsi, leurs tailles déterminent le diamètre des vaisseaux sanguins infiltrés à travers les macropores dans l'échafaudage. L'interconnexion des macropores facilite ainsi la croissance osseuse en fournissant l'espace suffisant à la vascularisation et à l'évacuation des déchets cellulaire. Mastrogiacomo et al. (250) ont montré que l'interconnexion de la porosité d'architectures ostéoconductrices peut influencer le modèle d'invasion des vaisseaux sanguins et finalement la cinétique du processus de néoformation osseuse. Alors que la taille des pores fournit la surface et l'espace pour l'adhésion cellulaire, l'interconnexion des pores fournit la voie pour la distribution/migration des cellules et permet une formation efficace de vaisseaux sanguins *in vivo* adaptée au soutien de la néoformation du tissu osseux. La voie d'interconnexion pourrait donc limiter la vascularisation (au moins en termes de diamètre maximal des vaisseaux) des biocéramiques, ce qui constituerait un goulot d'étranglement pour l'invasion des vaisseaux sanguins. La taille de ces interconnexions doit être supérieure à 50  $\mu\text{m}$  pour permettre la formation d'os minéral. Une taille d'interconnexion d'environ 100  $\mu\text{m}$  semble idéale pour favoriser l'infiltration des nutriments et de l'oxygène à

l'intérieur des implants (263). Une autre étude montre que les échafaudages avec une taille d'interconnexion de 150  $\mu\text{m}$  améliorent la fonction des cellules endothéliales en favorisant l'adhésion et la migration des cellules, en augmentant la prolifération et en renforçant l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales-plaquettes et du VEGF *in vitro* et *in vivo*. L'échafaudage avec une taille d'interconnexion de 150  $\mu\text{m}$  améliore la néovascularisation via la voie PI3K/Akt et fournit une cible pour la modification de la structure interne du biomatériau afin d'atteindre de meilleures performances cliniques dans la vascularisation de l'implant (264).

Bien entendu, l'optimisation de la taille des macropores de l'échafaudage et de la taille des interconnexions ne suffit pas à garantir une néovascularisation suffisante pour un défaut osseux de grande taille traité à l'aide de l'échafaudage. D'autres facteurs supplémentaires, tels que des cellules ou des protéines, sont nécessaires pour assurer une néovascularisation suffisante (262).

La géométrie des pores a également son influence. Les principaux résultats de la littérature sont présentés dans le **Tableau 1**. Notre équipe a étudié la colonisation par des cellules pré-ostéoblastiques de souris (MC3T3-E1 sous-clone 14) de macropores de taille et de géométrie différentes sur des architectures en HA dopée au silicium fabriquées par  $\mu\text{SLA}$ . Les MC3T3-E1 sc14 sont une lignée de cellules pré-ostéoblastiques issues de la calvaria de souris. Fréquemment utilisées pour étudier l'interface cellules / matériaux, elles peuvent se différencier en ostéoblastes et en ostéocytes. Lasgorceix a montré que les MC3T3-E1 sc14 se répartissent de manière homogène sur les contours des macropores à section circulaire, tandis qu'elles recouvrent préférentiellement l'intérieur des angles sur des géométries présentant des angles aigus (242). Rüdrieh et al. ont démontré que la colonisation des macropores par les MC3T3-E1 sc14 est proportionnelle à leur taille et fortement influencée par leur forme (18). Les bords droits et les surfaces convexes sont préjudiciables. L'absence d'angles rentrants et la présence d'angles aigus, en créant des concavités et en minimisant les surfaces planes, facilitent la colonisation cellulaire. Les géométries en losange et en triangle sont donc particulièrement favorables, tandis que celles carrées et en étoile (avec des angles rentrants) sont les moins avantageuses. Des effets similaires ont été retrouvés sur la colonisation vasculaire comme le montre de précédents travaux de l'équipe auxquels j'ai contribué qui présentent une analyse de la vascularisation de biocéramiques poreuses d'HA dopées au silicium et des effets de la forme des pores sur le guidage vasculaire à l'aide d'un modèle *ex ovo* sur la CAM (257). La CAM est une membrane extra-embryonnaire présente chez les embryons d'oiseaux, y compris le poulet. Elle se forme par la fusion du chorion et de l'allantoïde et sert à la respiration et à l'excrétion pour l'embryon en développement. La CAM est hautement vascularisée, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude de processus biologiques tels que l'angiogenèse. La présence de pores n'a pas influencé les paramètres liés à l'angiogenèse (organisation de l'arborisation (dimensions fractales), nombre d'embranchements), mais la géométrie des pores a affecté le guidage des vaisseaux sanguins et le potentiel angio-conducteur (diamètre et nombre de vaisseaux sanguins convergeant vers les pores). Les géométries angulaires concaves (triangles) semblent particulièrement intéressantes.

La **Figure 26** présente ces résultats de l'équipe sur l'étude de la colonisation de pastilles d'HA dopée au silicium à architecture macroporeuse avec des pores de géométries différentes obtenues par  $\mu\text{SLA}$ . La **Figure 26A** représente la colonisation des pores par des pré-ostéoblastes murins de la lignée MC3T3-E1 sc14 (l'actine est marquée en vert et les noyaux en bleu), qui est proportionnelle à la taille des macropores, et fortement influencée par la

géométrie. Les pores de forme triangulaire et losange ont un taux de colonisation plus élevé. La **Figure 26B** montre des pastilles juste explantées de la CAM avec un nombre et un diamètre des vaisseaux influencés par la géométrie des pores.

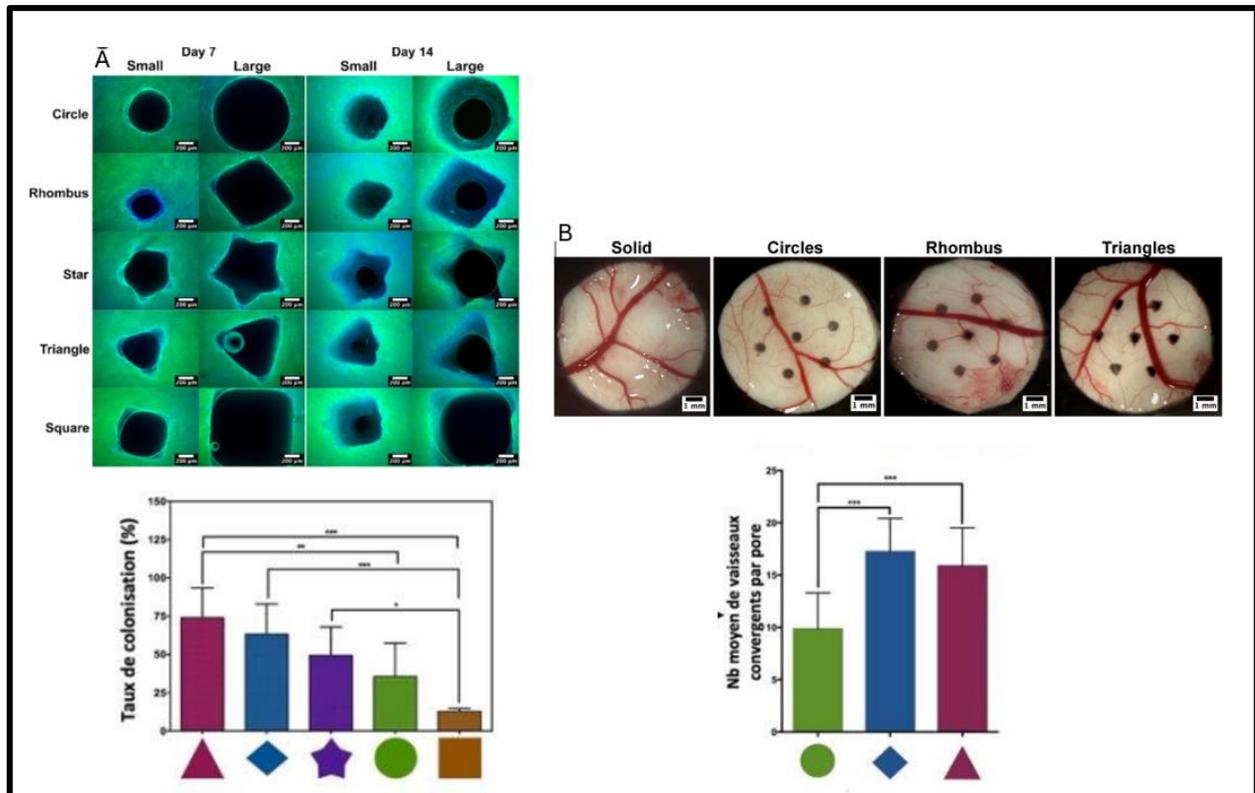


Figure 26 : Colonisation de pastilles de SiHA fabriquées par  $\mu$ SLA. A : Colonisation des macropores par les MC3T3-E1 sc14 après 7 et 14 jours, d'après Rüdrieh (18) B : Invasion vasculaire après explantation de la CAM, d'après Magnaudeix (257)

De nombreux autres travaux ont été menés sur l'influence de la géométrie des macropores sur le comportement des cellules osseuses. Rumpler et al. (265) ont démontré que le taux de croissance locale des tissus formés par les ostéoblastes est fortement influencé *in vitro* par les caractéristiques géométriques des canaux dans une matrice artificielle tridimensionnelle d'HA contenant des pores de différentes géométries. Les effets de courbure et les forces mécaniques à l'intérieur du tissu peuvent expliquer les modèles de croissance. Cela implique que les cellules à la surface du tissu sont capables de percevoir et de réagir à des rayons de courbure beaucoup plus grands que la taille des cellules elles-mêmes. Les cellules prolifèrent et produisent une matrice extracellulaire en réponse à des stimuli biochimiques et mécaniques. Dunlop et al. ont démontré une contribution des contraintes mécaniques produites pendant la croissance des tissus sur le taux de croissance lui-même dans un modèle de pore circulaire (266). Cette même équipe a poursuivi ses travaux pour prouver expérimentalement un comportement asymétrique entre la croissance des MC3T3-E1 à partir de surfaces convexes et concaves (267). La croissance tissulaire est plus élevée sur les surfaces concaves que sur les surfaces convexes en utilisant des substrats d'HA. Ils démontrent que les contraintes de surface peuvent inhiber la croissance sur des substrats convexes.

L'influence de la géométrie des pores sur la vascularisation a également été largement étudiée. Scarano et al. (268) ont démontré dans un modèle de tibia de lapin que la formation de vaisseaux sanguins était stimulée par la présence de concavités dans un implant TCP/HA, qui peut fournir un environnement approprié dans lequel les forces mécaniques, les

concentrations et les gradients de molécules chimiotactiques ainsi que la rétention de caillots sanguins peuvent stimuler la migration des cellules vasculaires, et par la suite osseuses.

Gariboldi et al. (249) ont montré que l'architecture de la biocéramique (largeur, périodicité et profondeur des rainures et des crêtes) affecte de manière significative l'emplacement et l'orientation des structures de type microcapillaire à l'échelle de centaines de microns dans la coculture de cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines et d'ostéoblastes humains. Les structures de type microcapillaire se forment principalement dans les sillons ou entre les convexités.

Le contrôle de ces éléments structurels de macroporosité sont essentiels à maîtriser pour optimiser les propriétés de l'implant. Cependant, les effets de la porosité doivent être pris en compte à plusieurs échelles (macro- et micro-porosité) (269).

Tableau 1 (page suivante) : Étude bibliographique de l'influence de la géométrie et de la taille des macropores de CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé) et vasculaire (gris clair)

Réf	Cellules-Tissus	Matériaux	Résultats	Conclusion des auteurs
Rumpler et al., 2008 (265)	MC3T3-E1 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris)	Plaques d'HA de 2mm d'épaisseur fabriquées par moulage 4 géométries de canaux : carré, cercle, hexagone, triangle 3 tailles de canaux : périmètre P=3,14, 4,71 et 6,28 mm	Le taux de croissance locale des tissus formés par les ostéoblastes (MEC de collagène) est fortement influencé par les caractéristiques géométriques des canaux (préférentiellement dans les coins).	Les effets de courbure et les forces mécaniques à l'intérieur du tissu peuvent expliquer les modèles de croissance. Cela implique que les cellules à la surface du tissu sont capables de percevoir et de réagir à des rayons de courbure beaucoup plus grands que la taille des cellules elles-mêmes.
Lasgorceix, 2014 (242)	MC3T3-E1 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris)	Architectures en SiHA fabriquées par $\mu$ SLA 5 géométries de macropores : carré, cercle, losange, étoile, triangle 2 tailles de macropores: petite et grande	-Colonisation plus rapide des géométries en triangle et en losange -Colonisation plus rapide des pores de petites tailles	La colonisation des macropores par les cellules osseuses semble être favorisée, à court terme, par la présence de concavités dans la géométrie des macropores et défavorisée par la présence de convexités.
Rüdrich et al., 2019 (18)	MC3T3-E1 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris)	Architectures en SiHA fabriquées par $\mu$ SLA 5 géométries de macropores : carré, cercle, losange, étoile, triangle 2 tailles de macropores: petite et grande	-Géométries en losange et en triangle favorables -Géométries en carré et en étoile défavorables -Rapidité de colonisation proportionnelle à la taille des macropores	Les bords droits et les surfaces convexes sont préjudiciables. L'absence d'angles rentrants et la présence d'angles aigus, en créant des concavités et en minimisant les surfaces planes, facilitent la colonisation cellulaire.
Scarano et al., 2014 (268)	Implantation <i>in vivo</i> dans des tibias de lapin	32 implants TCP/HA ont été implantés dans 8 lapins. Chaque lapin a reçu 4 implants, 2 dans le tibia droit et 2 dans le tibia gauche. Les implants ont été retirés après 1, 2, 4 et 8 semaines.	Le nombre de vaisseaux formés est statistiquement plus important dans les concavités par rapport aux convexités après 1 et 2 semaines.	La formation de vaisseaux sanguins a été stimulée par la présence de concavités, qui peuvent fournir un environnement approprié dans lequel les forces mécaniques, les concentrations et les gradients de molécules chimiotactiques, et la rétention des caillots sanguins peuvent entraîner la migration des cellules vasculaires et osseuses.
Magnaudeix et al., 2016 (257)	CAM (Chick embryo chorioAllantoic Membrane) <i>Ex ovo</i>	Architectures en SiHA fabriquées par $\mu$ SLA 5 géométries de macropores : carré, cercle, losange, étoile, triangle	La présence de pores n'a pas influencé les paramètres liés à l'angiogenèse (arborisation, dimension fractale, ...) mais la géométrie des pores a affecté le guidage des vaisseaux sanguins et le potentiel angioconducteur (diamètre et nombre de vaisseaux sanguins convergeant vers les pores). La géométrie des pores module le nombre et le diamètre des vaisseaux sanguins convergeant vers les pores.	SiHA est un matériau biocompatible qui permet la conduction des vaisseaux sanguins à sa surface. La CAM est un bon moyen d'étude de la colonisation vasculaire des CPC. Les pores à section triangulaire semblent particulièrement intéressants.
Gariboldi et al., 2019 (249)	Co-cultures de cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines (HDMEC) et d'ostéoblastes humains (hOB)	Architectures 3D biphasées (HA- $\alpha$ TCP) fabriquées par moulage. 6 architectures possédant des rainures concaves et des crêtes convexes avec variation des rayons de courbure et de la profondeur.	Les structures de type microcapillaire se forment principalement dans les rainures ou entre les convexités. Le signal CD31 (marqueur des cellules endothéliales) est au moins 2,5 fois plus élevé le long des rainures que perpendiculairement aux rainures.	L'architecture de la biocéramique affecte de manière significative l'emplacement et l'orientation des structures de type microcapillaire. Les structures convexes empêchent la continuité du réseau vasculaire.

### I.5.3.3. Microporosité - Microstructure

La colonisation cellulaire des biomatériaux est également influencée par les propriétés de surface de ces derniers. Parmi elles, la microporosité ouverte est fréquemment étudiée (257).

La microstructure des biomatériaux en céramique peut être définie par la taille, la forme et la distribution des grains, paramètres physiques auxquels il faut ajouter la rugosité de surface et la surface spécifique. Ces deux dernières propriétés dépendent notamment de la microporosité ouverte que peut présenter le matériau. En effet, la microporosité ouverte est interconnectée, c'est-à-dire qu'elle traverse le matériau (avec une certaine tortuosité) et débouche en sa surface, modifiant ainsi les propriétés de surface de ce dernier. Il a été montré, dans de nombreuses études, que les propriétés de surface avaient une influence sur le phénomène d'ostéoconduction. Ainsi, il est possible de modifier le comportement cellulaire en introduisant, en plus de la macroporosité qui demeure toujours essentielle pour supporter la colonisation osseuse (comme décrit au paragraphe précédent), une microporosité contrôlée. La présence et le taux de microporosité ouverte est dépendant du temps et de la température de chauffe subis par le matériau lors de l'étape de frittage, indispensable à la fabrication d'une CPC.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'influence de la microporosité sur l'ostéoconduction et l'ostéoinduction :

- phénomène de dissolution-re-précipitation : la dissolution des phosphates de calcium conduit à la libération d'ions calcium et phosphate qui, en forte concentration à proximité du biomatériau, peuvent précipiter pour former une couche d'apatite biologique. Cette dernière, par sa ressemblance avec l'environnement osseux, stimule la différenciation cellulaire des MSC vers une lignée ostéogénique (270). La microporosité, en augmentant la surface spécifique<sup>11</sup> de l'implant, augmente la surface réactive d'échanges avec le milieu biologique environnant et ainsi le phénomène de dissolution (271). Elle joue également un rôle lors de l'étape de re-précipitation. Les micropores peuvent servir de supports aux ions calcium et phosphate, leur permettant ainsi de précipiter. Dans des échantillons d'apatite carbonatée à forte microporosité, des tissus de type endoste, tels que les sinusoides, se forment dans les zones de résorption du matériau et de forte concentration locale de calcium (272). Cependant, ce phénomène a des limites et il y aurait donc une valeur minimale de taux de microporosité en-dessous de laquelle la formation osseuse ne peut pas être engendrée sans contact initial avec l'os (ostéoinduction) et une valeur maximale au-dessus de laquelle la dissolution du matériau est trop rapide. La microporosité, par augmentation de la surface spécifique, modifie la solubilité de la CPC, et par conséquent le taux de libération des espèces chimiques dans les fluides environnants (273).
- Adsorption de matériel endogène : l'adsorption d'éléments organiques (protéines) à la surface de l'implant peut expliquer les différences de cinétique de l'ostéoconduction et de l'ostéoinduction du matériau (274). Rouahi et al. ont étudié l'influence des caractéristiques physico-chimiques d'une poudre d'HA et d'une céramique en HA sur l'adsorption protéique et par la suite sur la réponse cellulaire (adhésion et prolifération des cellules osseuses). Leur potentiel d'adsorption protéique a été testé après immersion dans un milieu de culture contenant 15 % de sérum de veau fœtal (SVF). Il

---

<sup>11</sup> Quantité de surface par unité de poids ou de volume du matériau.

a été démontré une relation directe entre la surface spécifique et la capacité d'adsorption des protéines des poudres et des céramiques en HA. Plus la surface spécifique des particules d'HA est élevée (25,4 m<sup>2</sup>/g), plus leur adsorption de protéines est élevée (78 ± 2,3 µg/ml). Lors du traitement thermique des CPC, le taux de densification augmente et la surface spécifique diminue (0,9 m<sup>2</sup> /g). Plus la microporosité des céramiques est basse, plus l'adsorption de protéines est basse (65,7 ± 2,5 µg/ml) et l'adhésion des cellules réduite (275). D'autres travaux de cette équipe ont montré qu'une hydroxyapatite microporeuse (12,5 % de porosité) présente une adsorption de protéines (fibronectine et albumine de sérum bovin) meilleure qu'une hydroxyapatite dense (2,5 % de porosité), les quantités de protéines adsorbées étaient respectivement de 66,02 µg/m<sup>2</sup> contre 17,20 µg/m<sup>2</sup> (276). El-Ghannam et al. ont examiné les protéines adsorbées à la surface d'un verre bioactif traité par une solution d'électrolyte tamponnée au Tris (génération d'une couche superficielle riche en phosphates), d'un verre bioactif non traité et sur une céramique poreuse en HA (188). Tous les substrats ont été immergés dans un milieu de culture tissulaire contenant 10% de SVF. La céramique poreuse en HA (surface spécifique : 4 m<sup>2</sup> /g, volume de pores : 50-60 %) fixait une quantité de protéine totale supérieure à celle des autres substrats denses montrant l'affinité des protéines pour ce matériau. Cheng et al. ont comparé l'ostéoinduction intrinsèque d'un échantillon HA/β-TCP poreux implanté chez de souris présentant une fracture du péroné gauche (277). Les résultats ont montré que les implants en HA/β-TCP placés dans les muscles des pattes fracturées (gauches) à proximité du péroné présentaient une induction osseuse significativement plus élevée que ceux implantés dans les muscles des pattes ayant des péronés intacts (droites). Les implantations sous-cutanées n'ont pas montré d'ostéoinduction. Les différences observées ont été reliées à la localisation des implants et à la proximité d'un environnement ostéogénique. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'ostéoinduction par les CPC est le résultat de l'adsorption des biomolécules ostéogéniques sur leur surface. L'architecture micro-macroporeuse influence le comportement cellulaire mais globalement, l'adhésion de la cellule au matériau est dépendante de la reconnaissance des protéines de la MEC adsorbées en surface et donc du caractère mouillant du substitut. Le rôle exact des micropores sur ce phénomène d'adsorption n'est pas encore réellement explicité. Il est possible que les molécules soient piégées au sein des micropores, mais aucune étude expérimentale n'a permis, à ce jour, de valider cette hypothèse.

- Vascularisation : la microporosité pourrait également avoir un impact sur la pénétration de l'implant par les vaisseaux sanguins, comme le suggère Hing et al. qui retrouvent des taux de pénétration capillaires différents en fonction de la microporosité (278). La microporosité a un effet positif sur l'ostéointégration, en rapport avec une meilleure vascularisation des CPC poreuses *in vivo*.
- Adhésion, prolifération et différenciation cellulaires : la microporosité, en augmentant la surface spécifique de l'implant, augmente sa mouillabilité (capacité à se laisser mouiller par les liquides). Ainsi, les interactions entre cellules et matériau sont facilitées (279). De nombreuses études *in vitro* ont démontré le rôle de la microporosité sur le comportement cellulaire. Annaz et al. ont démontré le rôle de la microporosité sur l'ancrage initial des ostéoblastes sur des échantillons d'HA (280). L'adhésion cellulaire est une étape essentielle de l'interaction entre le biomatériau et les cellules et la qualité de cette étape impacte sur le développement et la prolifération ultérieurs des cellules

osseuses au contact de l'implant. Des études plus récentes sont venues nuancer l'influence de la microporosité sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, Isaac et al. ont suivi le comportement de cellules stromales de moelle osseuse humaine sur des échantillons de  $\beta$ -TCP microporeux et non microporeux : la microporosité entraînait une diminution de la viabilité des cellules (proportionnellement au temps d'incubation) et une inhibition de la différenciation ostéoblastique (281). Les modifications de la topographie, et notamment de la rugosité de surface, modulent le comportement cellulaire (282–284) mais pas dans la même mesure ni de la même manière selon le type de CPC, ni selon le type cellulaire (285). Les cellules endothéliales sont particulièrement sensibles aux signaux mécaniques (14).

Concernant les matériaux micro-macroporeux, il semble également intéressant d'étudier la microporosité dans les parois des macropores. Dans l'équipe, nous avons examiné la colonisation et la croissance des MC3T3-E1 sc 14 au contact de scaffolds macro-microporeux en hydroxyapatite dopée au silicium ; la microporosité entrave fortement la croissance cellulaire dans les macropores (18). D'autres travaux retrouvent plutôt un effet bénéfique des micropores au sein des macropores. Ainsi, Bignon et al retrouvent un meilleur attachement et une invasion cellulaire plus marquée (fibroblastes, ostéoblastes) sur les parois microporeuses des macropores (286). Les travaux de Habibovic et al. ont porté sur l'étude de l'influence de la surface spécifique sur les propriétés ostéoinductrices de deux types de CPC (HA et BCP) (287). Ils ont démontré qu'une quantité minimale de micropores sur les parois des macropores était nécessaire pour que le matériau soit ostéoinducteur. Yuan et al. ont comparé les propriétés ostéoinductrices de deux types de céramiques en HA poreuses implantées dans les muscles dorsaux de chiens (288) : un implant macroporeux dont les parois présentaient un fort taux de micropores ; et un implant macroporeux ayant des macropores à paroi dense. Les résultats obtenus ont confirmé que, dans certaines conditions, la céramique pouvait induire la formation d'os dans le tissu mou des chiens, la présence des micropores ayant favorisé l'induction osseuse. La microporosité augmente localement la surface spécifique du matériau ce qui améliore la croissance osseuse en fournissant des points d'ancrage aux protéines et aux cellules osseuses (288). Les travaux de Wei et al. ont porté sur l'étude des propriétés biologiques de CPC dopées au magnésium (289). Trois types d'implants ont été étudiés : un implant contenant des micro et des macropores, un implant contenant seulement des macropores et un implant non poreux. Il a été montré que l'attachement, la prolifération et la migration cellulaire d'une lignée immortalisée de cellules ostéoblastiques humaines (MG63) étaient nettement supérieures pour l'implant micro-macro poreux du fait de la présence de la microporosité. Les examens histologiques ont confirmé que ces implants amélioraient la régénération osseuse et présentaient une ostéogenèse *in vivo* plus importante.

Les paramètres macro- et micro-topographiques des échafaudages doivent être considérés collectivement avec des interactions corrélées pour comprendre le comportement des cellules (18). La détection de la topographie par les cellules au cours de l'étape initiale de l'adhésion et de la prolifération cellulaires semble primordiale, d'où la nécessité d'une conception optimisée des scaffolds.

Ces résultats sont regroupés dans le **Tableau 2**

Tableau 2 : Étude bibliographique de l'influence de la microporosité de CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé) et vasculaire (gris clair).

Réf	Cellules-Tissus	Matériaux	Résultats	Conclusion des auteurs
<i>Annaz et al.</i> , 2004 (280)	Cellules osseuses humaines	4 types différents d'HA poreuse	-Affinité des cellules pour les micropores par le biais d'extension de filopodes -Amélioration du stade initial de l'attachement	La microporosité semble jouer un rôle dans l'ancrage et l'attachement cellulaire initiaux.
<i>Rouahi et al.</i> , 2006 (275,276)	SaOs-2 (cellules osseuse humaines)	HA dense (pHA) et HA microporeux (mHA) à 12% de porosité ouverte	-SDS-PAGE : davantage de protéines sont absorbées sur le mHA. -Analyse TPD ( Désorption programmée en température ) : 10 fois plus de protéines sont absorbées sur le mHA. -Fibronectine et albumine (marquage) plus absorbées sur le mHA. -Adhésion et prolifération des SaOs -2 meilleure sur le mHA	La microporosité module l'absorption des protéines et favorise l'adhésion et la prolifération des cellules osseuses humaines.
<i>Wei et al.</i> , 2010 (289)	Cellules MG63 (cellules ostéoblastiques humaines)	Architecture micro-macroporeuse en HA dopée au magnésium Microporosité variant de 52 à 78%	-Attachement et prolifération des MG63 meilleurs sur micro-macroporeux -Activité ALP des MG63 plus élevée sur micromacroporeux	L'ostéogenèse est plus rapide et plus efficace sur les échafaudages micro-macroporeux par rapport aux échafaudages macroporeux.
<i>Rüdrich et al.</i> , 2019 (18)	MC3T3-E1sc14 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris)	Architectures en SiHA fabriquées par $\mu$ SLA 5 géométries de macropores : carré, cercle, losange, étoile, triangle 2 tailles de macropores : petite et grande 3 taux de porosité ouverte : 0,5. 23. 37%	Une augmentation de la teneur en microporosité entrave fortement la croissance des cellules dans les macropores.	Les paramètres micro- macrotopographiques des échafaudages doivent être considérés collectivement avec des interactions corrélées pour comprendre le comportement des cellules.
<i>Hing et al.</i> , 2005 (278)	Implantation <i>in vivo</i> dans des condyles fémoraux de lapin	-Échantillons de HA poreux à 10% et à 20% -Échantillons cylindriques de 4,5 mm de diamètre x 6,5 mm de longueur -Analyse histologique, histomorphométrique et mécanique après 1, 3, 12 et 24 semaines	Augmentation du degré de pénétration vasculaire en fonction de la microporosité.	La microporosité améliore l'invasion capillaire et par la suite augmente le volume osseux.

Les méthodes de fabrication additive, et notamment la microstéréolithographie, permettent l'élaboration de scaffolds présentant une géométrie (taille, forme, épaisseur) et une architecture contrôlées.

Le premier élément à maîtriser est la macroporosité. Un taux de porosité entre 40 et 80 %, une taille de pore entre 300 et 600  $\mu\text{m}$  (idéalement 400  $\mu\text{m}$ ), une taille d'interconnexion de 100-150  $\mu\text{m}$ , et des pores avec des géométries à angles aigus concaves (triangulaire ou losangique) semblent favoriser l'invasion du matériau à la fois par les cellules endothéliales et par les cellules osseuses.

Un autre élément essentiel à contrôler est la microporosité ouverte. En augmentant la surface spécifique, la microporosité modifie plusieurs propriétés de surface des CPC (solubilité, points d'ancrage, mouillabilité). Ces modifications favorisent la libération d'espèces chimiques dans l'environnement, l'adsorption de protéines à la surface de la céramique, la vascularisation et l'adhésion, prolifération et différenciation cellulaire. Ces effets peuvent être variables selon le type de CPC et selon le type cellulaire. Il semble donc essentiel de prendre en compte non seulement la lignée ostéoblastique, mais également les autres lignées cellulaires et plus particulièrement la lignée endothéliale, dans l'optimisation des céramiques poreuses.

L'optimisation de l'architecture macro-microporeuse des scaffolds est primordiale pour stimuler l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules, puis l'initiation et le maintien de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse, à l'échelle de l'ensemble de la structure ; et permettre ainsi la colonisation osseuse du biomatériau.

#### I.5.4. Modifications de la composition chimique : dopage ionique

L'hydroxyapatite phosphocalcique synthétique stœchiométrique de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  est une référence pour les biomatériaux phosphocalciques implantables. Elle est, sur le plan chimique, le phosphate de calcium qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os. La **Figure 27** représente le squelette de la structure apatite, défini par un empilement des tétraèdres ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) qui ne peuvent pas présenter de lacune, contrairement aux sites calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ). Deux tunnels sont formés, perpendiculaires au plan (001). Le premier tunnel est centré sur les axes ternaires de la structure et occupé par des ions calcium qui sont au nombre de quatre par maille (cote : 0,  $\frac{1}{2}$ , 0). Le second tunnel est délimité par six ions calcium et centré sur un groupement hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ).

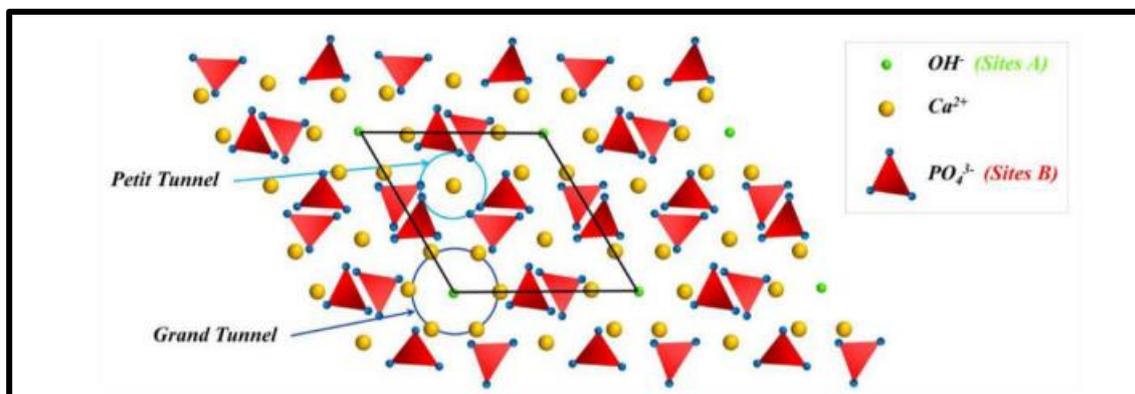


Figure 27 : Structure cristalline de l'HA stœchiométrique, d'après El-Felss (290)

Comme décrit précédemment, l'HA possède de multiples propriétés biologiques : biocompatibilité, bioactivité, ostéoconduction (175,291,292). De nombreuses espèces chimiques, sous forme ionique, favorisent la formation de tissu osseux et la vascularisation en agissant comme cofacteurs pour les enzymes, en participant à la minéralisation, ou en servant de messenger secondaire des cellules. Sa structure en tunnel permet à l'HA d'admettre différentes substitutions ioniques. Ainsi, l'amélioration des propriétés biologiques des CPC peut passer par leur dopage avec des éléments chimiques d'intérêt, modifiant la réponse biologique du matériau (293). Les effets du dopage ionique sur la réponse biologique et la stimulation de l'ostéogenèse et de la vascularisation semblent provenir de plusieurs voies :

- les ions substitués, libérés au niveau du défaut osseux, influencent le moment et la durée de la sécrétion de facteurs de croissance endogènes (pro-ostéogéniques et pro-angiogéniques) par les cellules environnantes, ce qui modulera la réponse biologique (294).
- La substitution ionique modifie également les propriétés physico-chimiques du biomatériau (taille des grains, solubilité, mouillabilité, énergie de surface,...) (15,295). Chacun de ces paramètres peut également influencer les propriétés biologiques (296).

#### **I.5.4.1. HA dopée au silicium (SiHA)**

##### **I.5.4.1.1. Le rôle biologique du silicium**

Le silicium (Si) est un élément chimique de symbole Si et de numéro atomique 14. Il s'agit d'un métalloïde présent dans la nature sous forme de dioxyde de silicium (aussi appelé silice), un composant majeur du sable, du quartz et de divers minéraux. Le silicium est essentiel dans de nombreuses industries, notamment l'électronique, en raison de ses propriétés semi-conductrices. Il est largement utilisé dans la fabrication de puces électroniques, de panneaux solaires, de cellules photovoltaïques et d'autres composants électroniques. Le silicium est également utilisé dans la production de verre, d'alliages métalliques, de polymères et de céramiques. Sa grande abondance dans la croûte terrestre en fait un élément fondamental pour de nombreuses applications industrielles et technologiques.

Bien que le silicium soit considéré comme un oligo-élément dans le règne animal, sa fonction précise n'est pas entièrement élucidée. Chez certains animaux, comme les mammifères, le silicium peut être présent en faibles quantités dans les tissus, en particulier dans les tissus conjonctifs comme le tissu osseux. Il est suggéré que le Si pourrait jouer un rôle dans le maintien de la santé des tissus conjonctifs, en contribuant à la formation et à la stabilité du collagène et d'autres protéines structurales. Des études sur les suppléments de silicium chez l'homme ont suggéré des effets positifs sur la santé osseuse, la santé des articulations et de la peau, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour confirmer ces effets et comprendre pleinement les mécanismes impliqués (297–299).

Dans le tissu osseux, le silicium est retrouvé dans la MEC et sur les sites actifs de calcification (300,301). Sa concentration serait de 100 mg/L dans l'os. Il semble être un facteur impliqué dans la croissance osseuse et la minéralisation (300). Son rôle a été démontré pour la première fois *in vivo* en 1972 par Carlisle chez le poussin (302,303), qui retrouvait un développement squelettique et cartilagineux plus faible lors d'une carence en silicium. Simultanément, Schwarz et Milne prouvaient une croissance osseuse stimulée chez les rats ayant une alimentation riche en silicium (304). Depuis cette date, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à l'effet du silicium sur le métabolisme osseux. Dans une revue plus

récente (305), Zhou montre qu'une carence en silicium entraîne l'augmentation de la sécrétion d'OPN et donc la stimulation de la résorption osseuse. Il retrouve également une influence positive du silicium sur la densité minérale osseuse avec un écart de 10% entre les individus avec l'apport alimentaire le plus riche en silicium et ceux avec l'apport le plus faible. Dans l'alimentation, l'absorbabilité du silicium est essentiellement de la forme  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (306).

#### **I.5.4.1.2. L'effet du silicium sur les cellules**

Le silicium est décrit comme ayant un effet positif sur les cellules endothéliales et sur les cellules ostéoformatrices (17,307–309).

##### Le silicium semble promouvoir l'angiogenèse.

Le silicium semble favoriser le processus d'angiogenèse, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore peu compris. Le silicium est décrit comme ayant un effet positif sur le métabolisme des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (307,308,310). Li et Chang ont confirmé que les ions silicium jouent un rôle important pendant l'angiogenèse induite par la céramique silicatée (309). Ils retrouvent une stimulation de la production des HUVEC, une augmentation de l'expression du VEGF, du FGF et de leurs récepteurs, un renforcement de l'expression du NO par les HUVEC. L'angiogenèse au contact d'une biocéramique silicatée est stimulée par rapport aux biomatériaux sans silicium (308).

Dans une co-culture de cellules endothéliales (HUVEC) et de fibroblastes (HDF : Human Dermal Fibroblast), les CPC silicatées stimulent l'expression du VEGF par les HDF et augmentent ensuite l'expression du VEGFR-2 sur les co-HUVEC. La synthèse de NO et la production de NO par les co-HUVEC augmentent alors pour finalement initier l'angiogenèse. Au cours de ce processus, l'expression de la VE-cadhérine des HUVEC est régulée à la hausse, et la cadhérine est concentrée aux jonctions cellulaires pour faciliter la formation des tubes. Des concentrations efficaces d'ions de silicium sont proposées : 0,7-1,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (309).

##### Le silicium semble promouvoir l'ostéogenèse.

De nombreux travaux *in vitro*, par ajout de silicium dans les milieux de culture, ont permis de démontrer son influence positive sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (311–314), sur la minéralisation (312,315), ainsi que sur la synthèse de collagène de type I dans la matrice ostéoïde (311). Le silicium en solution est considéré comme un élément favorisant l'ostéogenèse en stimulant la prolifération, la différenciation, l'activité de l'ALP et les capacités de minéralisation des ostéoblastes, indépendamment de facteurs ostéogéniques tels que l'acide ascorbique ou la dexaméthasone. Une étude *in vitro* sur des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 a montré que le silicium soluble avait un effet stimulateur sur la minéralisation de manière dose-dépendante (315). L'environnement minéralisé a été accru avec des doses croissantes de silicium, allant de 0,028 à 2,8  $\text{mg}/\text{L}$  (1-100  $\mu\text{M}$ ). Cet effet stimulateur pourrait résulter d'une augmentation de la capacité de minéralisation des ostéoblastes, bien que l'activité de l'ALP n'ait été augmentée que pour des concentrations de silicium allant de 0,14 à 0,28  $\text{mg}/\text{L}$ . Cela suggère que le silicium améliore la minéralisation de manière dose-dépendante, indépendamment des ostéoblastes.

Le mécanisme précis de ces effets reste encore à élucider, bien que l'élément déclencheur puisse être une stimulation de la production de collagène de type 1. Il semble que l'acide orthosilicique  $\text{Si}(\text{OH})_4$  soit suffisant pour augmenter sa synthèse, avec des résultats optimaux observés dans une plage de concentration allant de 0,28 à 0,56  $\text{mg}/\text{L}$  (10-20  $\mu\text{M}$ ). Dans cette même plage de concentration, une augmentation de l'expression de l'ALP et de l'OCN est

observée, ce qui indique simultanément une augmentation de la différenciation en ostéoblastes matures (311). Une autre étude révèle que  $\text{Si(OH)}_4$  stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes en inhibant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B via une surexpression du micro-ARN miR-146a. Cette inhibition de NF- $\kappa$ B entraîne l'activation de la voie Runx2, qu'il inhibe normalement, favorisant ainsi la différenciation et la maturation des ostéoblastes (316).

#### I.5.4.1.3. Le silicium dans les céramiques

Les hydroxyapatites silicatées (SiHA) sont très étudiées (317). Les principaux résultats cités dans ce paragraphe sont synthétisés dans le **Tableau 3**. On parle indifféremment d'HA silicatées, d'HA dopées au silicium ou d'HA substituées au silicium. L'incorporation de silicium impose la substitution d'un groupement phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  par un groupement silicate  $\text{SiO}_4^{4-}$  (318,319) :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ . Généralement, les substitutions ioniques peuvent entraîner l'apparition de lacunes en sites cationiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et/ou hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) pour préserver l'électro-neutralité du composé. L'apatite devient ainsi non-stœchiométrique, avec comme conséquence une modification de sa cristallinité et/ou une diminution de sa stabilité thermique.

L'effet biologique du silicium substitué dans l'HA reste encore à préciser. L'incorporation du silicium dans l'HA change sa composition chimique, mais également sa microstructure en réduisant notamment la taille des grains lors du frittage (320) ; ceci pourrait favoriser sa dissolution et permettre ainsi son action biologique. En effet, des études ont permis de mettre en évidence un accroissement de la solubilité de l'HA lors de l'incorporation du silicium dans sa structure et une re-précipitation plus importante et plus rapide d'hydroxyapatite biologique dans le cas de SiHA que dans le cas d'HA pure (321,322). La présence du silicium au sein de la maille apatitique est donc supposée favoriser le phénomène de dissolution-re-précipitation. Il s'agirait d'un effet indirect du silicium qui provoque des modifications microstructurales du matériau (323), avec en particulier une modification de la topographie de surface et une réduction de la taille des grains. Ceci favoriserait sa dissolution. L'effet biologique positif des SiHA proviendrait donc de la libération de silicium lors de la dégradation des implants dans l'organisme.

Cependant, cette hypothèse de relargage du silicium lors de la dégradation de l'implant est remise en question. En effet, la réduction de taille de grains dans le SiHA ne permettrait pas d'expliquer à elle seule l'augmentation de la dégradation du matériau, car comme nous l'avons décrit précédemment la solubilité et la résorbabilité de l'HA demeurent extrêmement faibles, contrairement au TCP par exemple (324). Bohner dans sa revue de 2009 (325) et Gasquères (326) ont noté un effet positif de la substitution du silicium sur le comportement biologique, mais sans preuve d'une action directe du silicium. Ils ont ainsi observé que le silicium ne serait en fait que partiellement incorporé dans les mailles de l'HA et donc principalement présent de manière superficielle sur le matériau, et ainsi rapidement relargué et disponible.

De plus, profondément incorporé, ou simplement présent superficiellement, le silicium permettrait également une fonctionnalisation de surface de l'implant par immobilisation covalente de molécules favorisant l'adhésion des cellules impliquées dans la croissance osseuse (327,328).

Plusieurs études retrouvent un effet bénéfique du silicium pour l'ostéointégration des biomatériaux CPC dopés. Hing et al. montrent notamment une augmentation du dépôt de minéraux à la surface d'un implant d'hydroxyapatite dopé au silicium suivi par une stimulation

de l'ostéogénèse (329). Cette étude prouve également une activité de résorption des ostéoclastes variable en présence d'hydroxyapatite dopée au silicium. Cette activité apparaît dépendante de la concentration en silicium et serait inhibée en cas de fortes concentrations de silicium.

On ne retrouve par contre que peu d'études s'intéressant à l'effet de biomatériaux CPC silicatés sur l'angiogénèse. Dans leurs travaux, Fu et al. (330), comparent les propriétés biologiques *in vitro* de disques de titane recouverts d'une couche de SiHA ou d'HA pure par culture à leur surface de MC3T3-E1 et d'HUVEC. La présence de 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'angiogénèse comme VEGF et eNOS. L'effet de la substitution au silicium sur l'angiogénèse des biomatériaux CPC doit continuer d'être évalué.

Les biomatériaux silicatés stimulent ainsi l'ostéogénèse et la vascularisation. En effet, les scaffolds silicatés stimulent les interactions cellules vasculaires (HUVEC) - cellules stromales mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (HBMSC – Human Bone Marrow Stromal Cells) en co-cultures, permettant ainsi une régénération osseuse associée à une croissance vasculaire dans les matériaux (307). Le silicium favoriserait ainsi la vascularisation et l'ostéogénèse dans un modèle de co-culture HUVEC - HBMSC en augmentant les effets paracrines et stimulant ainsi entre les interactions cellule-cellule. Le silicium augmente la libération endogène de facteurs de croissance pro-angiogéniques (VEGF) par les cellules hôtes qui ont migré dans le matériau à la suite des modifications chimiques.

Le silicium a un effet positif sur l'ostéogénèse et l'angiogénèse, par action directe par relargage dans le milieu ; ou par action indirecte par modifications de propriétés physico-chimiques du biomatériau. Il favorise l'interaction cellules endothéliales – cellules osseuses en stimulant les effets paracrines. Il est totalement biocompatible.

La biocompatibilité et la bioactivité du SiHA, permettant la stimulation conjointe de la différenciation ostéogénique et de la vascularisation, lui confère un intérêt majeur comme biomatériau de substitution osseuse.

Tableau 3 : Étude bibliographique de l'influence du dopage au silicium des CPC sur l'activité cellulaire osseuse (gris foncé), vasculaire (gris clair), osseuse et vasculaire (noir)

Réf	Cellules-Tissus	Matériaux	Résultats	Conclusion des auteurs
Hing et al., 2006 (329)	Implantation <i>in vivo</i> dans des condyles fémoraux de lapin	-Échantillons de SiHA poreux -5 %tage de Si : 0,2, 0,4, 0,8 et 1,5% en poids de Si -Échantillons cylindriques de 4,6 mm de diamètre -Analyse histologique et histomorphométrique après 1, 3, 6 et 12 semaines	-Croissance osseuse et taux d'apposition minérale augmentées -Remodelage adaptatif avec croissance et résorption osseuse	Une substitution de 0,8% en poids de Si semble idéale pour favoriser l'ajustement formation résorption osseuse.
Aminian et al., 2011 (331)	Incubation en SBF (Simulated body fluid) SaOs2 (cellules ostéoblastiques humaines)	-SiHA avec une teneur en Si allant de 0 à 1,8% synthétisé par système hydrothermal	Les résultats du test MTT indiquent une augmentation de la prolifération et une augmentation du nombre de cellules viables de type ostéoblastes humains cultivés sur SiHA 0,8% par rapport à HA	-La bioactivité de SiHA est meilleur que celle de HA pure. -Si réduit la cristallinité et augmente la solubilité de la poudre. -SiHA à 0,8% a la meilleure bioactivité.
Honda et al., 2012 (332)	MC3T3-E1 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris)	-SiHA poreux préparé par technique de pyrolyse de pulvérisation ultrasonique -Différentes quantités d'HA : 0, 0,8, 1,6% en masse	-Production ALP et OC supérieures pour SiHAp en comparaison à HAp -SiHAp à 0,8% régule positivement l'expression de RUNX2	-L'incorporation de Si provoque le changement de la structure cristalline de l'HA -Amélioration de l'activité biologique des ostéoblastes
Li and Chang, 2013 (309)	HUVEC	Silicate de calcium	-Augmentation expression du VEGF -Augmentation expression FGF et ses R	Les ions silicium stimulent l'angiogenèse.
Li and Chang, 2013 (308)	Cocultures de fibroblastes dermiques humains (HDF) et d'HUVEC	Silicate de calcium	-Augmentation expression du VEGF par les HDF -Augmentation expression du VEGFR-2 sur les HUVEC -Augmentation de production de NO et de VE-cadhérine par les HUVEC	Les ions silicium jouent un rôle important dans l'angiogenèse, et notamment dans l'initiation de celle-ci. La concentration critique de Si semble être 0,7-1,8 µg/mL.
Li, 2014 (307)	Coculture HUVEC et HBMSC	Silicate de calcium	-Augmentation expression VEGF par HBMSC -Augmentation expression VEGFR-2, BMP-2 et NO par les HUVEC	Les ions silicium améliorent la vascularisation et la différenciation ostéogénique par effet paracrine stimulant ainsi les interactions cellule-cellule.

#### **I.5.4.2. Les autres dopages**

Il existe de nombreux autres ions et substitutions ioniques des CPC possibles, dont l'intérêt biologique a été largement examiné. Par exemple les ions carbonates augmentent la résorbabilité du matériau, l'argent lui confère des propriétés antibactériennes, le strontium stimule la minéralisation et la vascularisation (333), les ions fluorures contribuent à la croissance osseuse, le zinc a un effet inhibiteur sur l'activité des ostéoclastes *in vitro* (334), le cuivre favorise les stades précoces de l'angiogenèse (335).

N'ayant pas été retenus pour nos travaux expérimentaux, nous ne les développerons ici pas davantage.

#### **I.6. Conclusion**

Le tissu osseux est un tissu en perpétuel renouvellement (remodelage osseux) par action conjointe et finement régulée des ostéoclastes (dégradation) puis des ostéoblastes (formation). Il est l'un des rares tissus de l'organisme à présenter des facultés d'autoréparation qui peuvent être qualifiées de régénération car le tissu cicatriciel résultant de sa cicatrisation est identique au tissu initial. La réparation tissulaire osseuse permet ainsi à un os fracturé de retrouver sa structure et ses fonctions : c'est la consolidation osseuse (ou guérison osseuse). Lorsque le défaut osseux aussi est trop important ou au niveau de zones soumises à des fortes contraintes mécaniques, la réparation osseuse physiologique est insuffisante pour combler totalement la perte de substance osseuse et aboutir à la consolidation. La reconstruction de ces pertes osseuses de grande taille présente un défi pour la médecine. La technique de référence reste la greffe osseuse autologue, mais celle-ci n'est pas toujours possible et entraîne une comorbidité importante. C'est dans ce contexte que les substituts osseux se sont développés. Par extension, le processus d'autoréparation osseuse est également impliqué lors de l'ostéointégration des substituts osseux. Ce procédé est complexe, finement régulé et influencé par de nombreux facteurs locaux ou généraux, et notamment par la vascularisation. Un bon approvisionnement vasculaire favorise un processus de consolidation osseuse efficace et complet permettant l'ostéointégration des implants, gage de leur tolérance à long terme par l'organisme.

Les nombreuses propriétés des CPC en font un substitut osseux de choix pour la reconstruction des pertes de substance osseuse. En dehors de leur parfaite biocompatibilité, elles permettent l'adhésion et la prolifération cellulaire à leur surface (ostéoconduction). Elles favorisent l'invasion au cœur de leur structure poreuse, s'intégrant au tissu vivant de manière intime assurant leur ostéointégration. L'invasion du biomatériau par la vascularisation est essentielle, soutenant l'ostéogenèse et à terme l'ostéoinduction. L'ostéointégration des biomatériaux actuellement utilisés est souvent limitée par un défaut de vascularisation de ceux-ci.

De nombreuses stratégies visant à améliorer la vascularisation des CPC sont donc développées et étudiées et particulièrement la conception sur mesure, permettant notamment le contrôle du taux de porosité, et le dopage au silicium. La microporosité ouverte modifie les propriétés de surface des CPC et ainsi le comportement cellulaire à leur contact. Le dopage au silicium permet la stimulation conjointe de la différenciation ostéogénique et de la vascularisation, par action directe par relargage dans le milieu ; ou par action indirecte par modifications de propriétés physico-chimiques du biomatériau. Il favorise l'interaction cellules endothéliales – cellules osseuses en stimulant les effets paracrines.

Dans le cadre de notre travail d'optimisation des propriétés des CPC en vue d'améliorer leur capacité à être vascularisées et ainsi ostéointégrées, deux grandes lignes se sont dégagées.

Tout d'abord, il s'agissait d'étudier les réponses de cellules endothéliales aux variations physico-chimiques de CPC et notamment d'élucider quelle modification entraîne quel changement de comportement sur les cellules endothéliales. Il nous a paru également primordial d'élaborer un modèle d'étude de tubulogenèse *in vitro* sur les CPC. L'objectif était de développer une méthode efficace pour évaluer les capacités de vascularisation de la surface de CPC par des cellules endothéliales et leur capacité à former des tubules en fonction de la composition et de la microstructure de la céramique.

Puis, notre second objectif consistait à établir et valider un modèle biologique de co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques *in vitro* permettant l'évaluation pertinente de propriétés biologiques des matériaux. Par le biais du modèle de tubulogenèse élaboré précédemment, les réponses cellulaires de co-cultures de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques *in vitro* ont été évaluées, ce qui a conduit à dégager un ratio cellules endothéliales / cellules ostéogéniques efficace pour promouvoir au mieux l'angiogenèse et l'ostéogenèse *in vitro*. L'objectif était d'établir *in vitro* un modèle cellulaire caractéristique du microenvironnement osseux défini par l'identification de structures tissulaires spécifiques, principalement une matrice extracellulaire minéralisée et des cellules endothéliales organisées en tubules.

## Chapitre II. Compréhension du comportement des cellules endothéliales aux variations physico-chimiques des CPC

---

Cette partie de notre travail consistait à étudier les réponses de cellules endothéliales aux variations physico-chimiques de CPC et notamment d'élucider quelle modification entraîne quel changement de comportement sur les cellules endothéliales. Il nous a paru également primordial d'élaborer un modèle d'étude de tubulogenèse *in vitro* sur les CPC. L'objectif était de développer une méthode efficace pour évaluer les capacités de vascularisation de la surface de CPC par des cellules endothéliales et leur capacité à former des tubules en fonction de la composition et de la microstructure de la céramique.

### II.1. Hypothèses et Objectifs de travail

La promotion de la vascularisation dans les biomatériaux poreux destinés à devenir des substituts osseux, et notamment au cœur de ceux-ci, reste un grand défi pour l'application clinique.

L'angiogenèse implique la synchronisation et l'interaction entre de nombreux acteurs : cellules, MEC, facteurs de croissance et de régulation. La croissance et la formation des tissus dépendent également de l'environnement cellulaire (à l'échelle subcellulaire et à l'échelle d'une seule cellule) (257). En raison de leurs propriétés physiques et chimiques uniques, les architectures céramiques ont la capacité de générer un microenvironnement sur mesure capable de guider le comportement des cellules en fonction des interactions cellule-matériau (336). La compréhension des variations des réponses des cellules endothéliales aux modifications physico-chimiques des CPC semble essentielle pour optimiser la conception des biomatériaux destinés à devenir des substituts osseux. Or, l'angiogenèse sur les CPC n'a été que peu étudiée *in vitro*.

Dans la littérature, il existe très peu de données sur les relations directes entre les paramètres physico-chimiques des biomatériaux et les cellules endothéliales. Deux études ont montré *in vitro* que les cellules endothéliales et les cellules progénitrices endothéliales (EPC) sont sensibles mais répondent différemment à la rugosité de la surface du titane (337,338). De nombreuses études *in vivo* ont évalué la capacité des biomatériaux à être revascularisés, mais la réponse spécifique des cellules endothéliales à la surface de la biocéramique n'a été que peu explorée (339,340). Dans de précédents travaux, nous avons mis en place une méthode permettant d'évaluer l'influence des propriétés physico-chimiques sur la capacité des CPC à être vascularisées *ex ovo*, à partir du modèle de la CAM (257), mais il existe peu de protocoles d'évaluation de la vascularisation *in vitro*. Ces protocoles *in vitro* utilisent des procédés courants pour l'étude de la biologie des cellules endothéliales, mais sont le plus souvent appliqués de manière indirecte et ne prennent pas en compte les propriétés de surface du matériau. En effet, ils sont réalisés à partir d'extraits consistant en des milieux biologiques dans lesquels des céramiques ont été immergées pendant une durée déterminée et contenant donc les produits issus de la dissolution de ces matériaux ou sur des matériaux denses (308,341,342). Il est donc difficile de tirer des conclusions certaines concernant l'impact de la variation des paramètres physico-chimiques des CPC sur le comportement des cellules endothéliales ; ce qui rend plus compliqué l'ajustement de la conception de l'architecture afin d'améliorer ses propriétés angiogéniques. Il semble ainsi primordial de caractériser l'angiogenèse directement sur le biomatériau *in vitro*. Comme nous l'avons souligné dans les rappels bibliographiques, la tubulogenèse reprend les événements qui se produisent pendant

l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants) au niveau des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont activées à la suite d'un stimulus pro-angiogénique dans un environnement 3D (137), puis vont s'assembler autour d'une lumière centrale pour former des tubules, qui vont ensuite s'organiser en réseau (134,135). Cette partie de notre travail consistait donc à étudier les réponses des cellules endothéliales aux variations physicochimiques des CPC, et à élaborer un modèle d'étude tubulogénèse *in vitro*. Cela permettra de réaliser une évaluation biologique des biomatériaux et de valider leur capacité à être efficacement revascularisé et/ou à promouvoir la vascularisation.

## **II.2. Article**

Les résultats de ce travail ont été publiés en Septembre 2023 dans la revue « *Journal of Functional Biomaterials* » 5;14(9):460. doi: 10.3390/jfb14090460. PMID: 37754874.

Article

# Microporous Hydroxyapatite-Based Ceramics Alter the Physiology of Endothelial Cells through Physical and Chemical Cues

Julie Usseglio <sup>†</sup>, Adeline Dumur <sup>†</sup>, Esther Pagès, Émeline Renaudie, Alice Abélanet <sup>ORCID</sup>, Joël Brie, Éric Champion <sup>ORCID</sup> and Amandine Magnaudeix <sup>\*ORCID</sup>

Université de Limoges, CNRS, Institut de Recherche sur les Céramiques, UMR 7315, F-87000 Limoges, France; julie.usseglio-grosso@unilim.fr (J.U.); adeline.dumur@etu.unilim.fr (A.D.); esther.pages@unilim.fr (E.P.); emeline.renaudie@unilim.fr (É.R.); alice.grenier-abelanet@unilim.fr (A.A.); joel.brie@unilim.fr (J.B.); eric.champion@unilim.fr (É.C.)

\* Correspondence: amandine.magnaudeix@unilim.fr; Tel.: +33-5-87-50-24-43

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Incorporation of silicate ions in calcium phosphate ceramics (CPC) and modification of their multiscale architecture are two strategies for improving the vascularization of scaffolds for bone regenerative medicine. The response of endothelial cells, actors for vascularization, to the chemical and physical cues of biomaterial surfaces is little documented, although essential. We aimed to characterize in vitro the response of an endothelial cell line, C166, cultivated on the surface CPCs varying either in terms of their chemistry (pure versus silicon-doped HA) or their microstructure (dense versus microporous). Adhesion, metabolic activity, and proliferation were significantly altered on microporous ceramics, but the secretion of the pro-angiogenic VEGF-A increased from 262 to 386 pg/mL on porous compared to dense silicon-doped HA ceramics after 168 h. A tubulogenesis assay was set up directly on the ceramics. Two configurations were designed for discriminating the influence of the chemistry from that of the surface physical properties. The formation of tubule-like structures was qualitatively more frequent on dense ceramics. Microporous ceramics induced calcium depletion in the culture medium (from 2 down to 0.5 mmol/L), which is deleterious for C166. Importantly, this effect might be associated with the in vitro static cell culture. No influence of silicon doping of HA on C166 behavior was detected.

**Keywords:** hydroxyapatite ceramics; chemical substitution; microporosity; endothelial cells; vascularization; tubulogenesis



**Citation:** Usseglio, J.; Dumur, A.; Pagès, E.; Renaudie, É.; Abélanet, A.; Brie, J.; Champion, É.; Magnaudeix, A. Microporous Hydroxyapatite-Based Ceramics Alter the Physiology of Endothelial Cells through Physical and Chemical Cues. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14*, 460. <https://doi.org/10.3390/jfb14090460>

Academic Editor: Elisa Boanini

Received: 20 July 2023

Revised: 15 August 2023

Accepted: 22 August 2023

Published: 5 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Biomaterials are used daily in medicine to reconstruct bone losses. Hydroxyapatite-based ceramics (HA-Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) are biocompatible and osteoconductive. They have been widely implanted as porous scaffolds in bone regenerative medicine since the 1980s [1,2], but an improvement of their ability to be vascularized is required to extend their application.

Indeed, osteointegration of the scaffold is the most important condition for its long-term tolerance by living tissues. A lack of vascularization limits the in-depth colonization of scaffolds by newly formed tissues. Vascular endothelial cells play an active role in tissue repair through molecular communication with resident cells in the injured tissue [3–5]. Because cells are sensitive to the chemical–physical properties of their environment, tuning the chemical and/or micro-architectural designs of the scaffolds may improve endothelial cell growth at the ceramic surface [6,7].

For the first strategy, which consists of tuning the chemical design, of the various species to have been studied, silicon has been described as acting positively on endothelial and bone-forming cell activity [8–11]. Therefore, silicon-doped hydroxyapatite (SiHA) Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6–x</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>x</sub>(OH)<sub>2–x</sub> has been widely investigated [12]. For example, in an in vivo

study in sheep, SiHA ceramics were employed in association with the vascular endothelial growth factor, VEGF, in order to increase their biological properties, notably with respect to vascularization [13]. However, this chemical substitution in the HA lattice changes not only the chemical properties of the ceramic, but also its mechanical and physico-chemical properties (grain size, surface energy, wettability, solubility, etc.) [7,14]. Any of these parameters may also influence the biological properties [15]. In the case of silicon, in a review published in 2009, M. Bohner noted a positive effect of silicon substitution on the biological behavior, but without evidence of a direct action of silicon [16]. Silicon was also found to stimulate angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [8,9,17].

A second strategy is to modify the microstructural design of the scaffold in order to change the biomaterial–biological fluid interface. For example, the presence of open microporosity (i.e., pore sizes of about 1 to 10  $\mu\text{m}$ ), by increasing the specific surface area, leads to the modification of several properties, notably the solubility of the ceramic, and consequently the release rate of chemical species into the surrounding fluids [18]. Similarly, surface microporosity increases protein absorption from the biological fluids, which facilitates the adhesion of bone cells [19]. Microporosity also has a positive effect on osteointegration, and it has been found to be associated with an enhanced vascularization of bioceramics *in vivo* [20]. The introduction of microporosity also affects surface topography and roughness, which are known to modulate cell behavior [21–23], but not to the same extent or in same way depending on the cell type [24]. Thus, not only osteoblastic lineages, but also cells from other systems and tissues, and more particularly endothelial cells, have to be considered in order to design optimized bioceramics. Moreover, endothelial cells are particularly sensitive to mechanical cues [6].

To the best of our knowledge, very few data are available about direct relationships between biomaterial chemical–physical parameters and endothelial cells. Two studies have shown *in vitro* that endothelial cells and endothelial precursor cells are sensitive but respond differently to titanium surface roughness [25,26].

Currently, the ability of bioceramics to be vascularized has been extensively studied *in vivo*, but this does not allow specifically exploring the response of endothelial cells to the biomaterial surface (e.g., [13,27]). There are protocols for assessing the influence of ceramic scaffold properties on its vascularization ability *ex ovo* [28], but very few *in vitro*. These *in vitro* methods, common for studying endothelial cell biology, are mostly applied indirectly and do not take account of the material surface properties. Indeed, they are carried out on dissolved extracts of ceramics or on dense materials [9,29,30]. It is then difficult to draw conclusions regarding the impact of the physical parameters of ceramics on endothelial cells *in vitro*, making it difficult to tune the architectural design in order to enhance endothelial cell activity. Angiogenesis is the growth of new blood vessels from pre-existing ones. Its characterization directly on/in the biomaterial is therefore essential. Tubulogenesis is performed by activated endothelial cells following a pro-angiogenic stimulus in a 3D environment [31], and it recapitulates events that occur during angiogenesis at the endothelial cell level. It corresponds to the formation of tubules (assembly of cells around a central lumen) that will organize themselves into a network [32,33].

The present study was performed in order to understand the biological response of the murine C166 embryonic endothelial cells, which are able to perform physiological tubulogenesis, at the surface of four HA-based ceramics [34]. The HA ceramics varied in terms of their chemical and physical parameters: pure HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [35], or silicon-doped HA (SiHA),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$  [36], in the form of either dense or microporous (25% open microporosity) parts. Dense HA (dHA) ceramics were considered as the reference control, as they have been used extensively in clinical applications for more than 40 years. Metabolic activity, adhesion and proliferation were studied as well as the expression of protein associated with the endothelial cells' angiogenic status.

An experimental method was developed to assess tubulogenesis *in vitro* that allowed the discrimination of the influence of chemical composition from that of the micro-architectural design of the scaffold. To this end, a protocol using a fibrin-based gel layer

deposited on the ceramic surface was set up. Two different assays were carried out: (i) a configuration where the cells were seeded directly in contact with the bioceramic surface (under the fibrin gel) to study the influence of the chemical and micro-architectural designs of the ceramic surface; and (ii) a configuration in which the cells were seeded on the fibrin gel to study the influence of dissolution products of the ceramic in culture medium.

The four HA-based ceramics used in this study allowed us to study the accuracy of the method and evaluate the influence of the chemistry and the microstructure on the endothelial cells. Dissolution products were determined, and their effect on the cells was also assessed by an indirect wound healing assay.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ceramic Processing and Characterization

HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) and SiHA (Si molar ratio: 0.4;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5.6}(\text{SiHO}_4)_{0.4}(\text{OH})_{1.6}$ ) powders were synthesized by aqueous precipitation. Detailed protocols can be found in previous works [35,37]. The raw powders thus obtained were calcined at 650 °C for 30 min for HA and 700 °C for 2 h for SiHA, under air atmosphere (LH30/13, Nabertherm, Lilienthal, Germany), to reach a specific surface area of around 30 m<sup>2</sup>/g, which facilitated the compaction of the powders. The specific surface area of the powders was checked according to the eight-point Brunauer-Emmett-Teller method (BET-Micromeritics ASAP 2000, Micromeritics, Norcross, GA, USA) using adsorption of N<sub>2</sub> after degassing under vacuum at 200 °C for 1 h. Afterwards, pellets were shaped by uniaxial pressing at 125 MPa in a 10 mm diameter cylindrical die (Specac, London, UK).

The sintering cycles were adjusted to obtain a similar microstructure for dense HA and SiHA ceramics (referred as dHA and dSiHA), on the one hand, and for porous ones (referred as pHA and pSiHA), on the other hand. The sintering parameters were 1200 °C for 30 min for dHA and 1240 °C for 30 min for dSiHA (LHT04/17 furnace, Nabertherm, Lilienthal, Germany), and 1000 °C for 30 min and 1160 °C for 30 min (LH30/13 furnace, Nabertherm, Lilienthal, Germany) for pHA and pSiHA, respectively. Sintering was performed under air atmosphere.

The phase purity of the sintered ceramics was checked by X-ray diffraction (XRD) using CuK $\alpha$  radiation (D8 Advance, Bruker, Saarbrücken, Germany). Crystalline phase identification was performed by comparing the experimental diagrams with the powder diffraction files (PDF) of the International Centre for Diffraction Data (ICDD). The chemical nature of ionic groups was controlled by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) using a Perkin Elmer Spectrum One spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Powdered samples of sintered pellets were mixed with KBr, and the absorbance spectra were recorded over the 4000–400 cm<sup>-1</sup> region for 32 scans with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

Open porosity of pellets (*P*, expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of measurements made on eight pellets) was determined using Archimedes' method by weighing dried, wet and immersed pellets in ultrapure water. The specific surface area of pellets was determined by the BET method (Micromeritics ASAP 2000) using adsorption of Kr (for dHA and dSiHA) or N<sub>2</sub> (for pHA and pSiHA) after degassing pellets under vacuum at 200 °C for 1 h. The microstructure of the ceramics was examined by scanning electron microscopy (SEM) using a Quanta 450 FEG (FEI, Hillsboro, OR, USA). The grain size distribution and average grain size ( $\Phi_G$ ) of pellets were determined by SEM image analysis. Pore size distribution and average pore size ( $\Phi_P$ ) were also determined by SEM image analysis. Prior to in vitro assays, the pellets were sterilized in an oven that delivered a dry air heat of 200 °C for 2 h (Memmert GmbH, Schwabach, Germany).

### 2.2. In Vitro Assays

#### 2.2.1. Cell Culture

C166 (CRL-2581, ATCC), immortalized endothelial cells of murine origin were routinely cultured in high-glucose (4.5 g/L D-glucose) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, New York, NY, USA), supplemented by 10% fetal calf serum (FCS) (Ther-

moFisher, Carlsbad, CA, USA), penicillin ( $50 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and streptomycin ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Gibco—complete culture medium), at  $37^\circ\text{C}$ , under 5%  $\text{CO}_2$  wet atmosphere. The medium was changed every 3 days and the cells split when the confluence reached 60 at 80%.

In order to establish a chemical equilibrium between the ceramic surface and the culture medium, the samples were immersed in complete culture medium for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , which was discarded before cell seeding. Cell seeding was performed dropwise on the top of ceramic pellets placed into 24-well culture plates (Hildesheim, Germany) at different cell densities depending on the experimental requirements. When experimental culture was continued for 7 days, the culture medium was renewed after 3 days.

### 2.2.2. Tubulogenesis

Fibrin-based gels were prepared by mixing  $300 \mu\text{L}$  of bovine fibrinogen (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) solution at  $6 \text{ mg}/\text{mL}$  in PBS 1X (Gibco) with  $300 \mu\text{L}$  of high-glucose DMEM in the culture wells. Then,  $300 \mu\text{L}$  of a  $25 \text{ UI}/\text{mL}$  thrombin solution (Merck, Rahway, NJ, USA) in pure  $\text{H}_2\text{O}$  was added for polymerization. The fibrin-based gel was left to solidify for 45 min at  $37^\circ\text{C}$ .

In configuration (i), the cells were directly seeded on the ceramic pellet at  $20,000 \text{ cells}/\text{cm}^2$  and incubated for 1 h. Afterwards, the pellets were transferred to another well, and the fibrin gel was layered onto the cell-seeded ceramic surface. After solidification, 1 mL DMEM was added in the well for cell cultivation. In configuration (ii), fibrin-based gels were directly poured on the pellets. After solidification, the C166 cells were seeded on the gel at  $20,000 \text{ cells}/\text{cm}^2$  in 1 mL of complete culture medium.

The cells were cultured for 7 days, and the culture medium was renewed after 3 days. After 7 days, cells were fixed with 4% PFA for 10 min at RT.

### 2.2.3. Viability, Cell Density and Proliferation

C166 were seeded at a density of  $2500 \text{ cells}/\text{cm}^2$  on the 4 ceramic conditions. Four hours before the end of the experiment, a volume equivalent to 10%  $v/v$  of the culture well volume of  $0.2 \text{ mg}/\text{mL}$  solution of resazurin (Acros Organics, Geel, Belgium, Verona, Italy) freshly prepared PBS 1X (Gibco) was added, and the cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$ . After 4 h, the culture supernatant was harvested, and fresh complete medium was added to the wells. Then,  $100 \mu\text{L}$  of supernatant was transferred into black 96-well plates (Corning, New York, NY, USA) for fluorescence intensity measurement at 544 nm in a fluorimeter (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtec, Offenburg, Germany). The cell viability assay was performed after 1, 2, 4 and 7 days of culture.

For density and proliferation assessments of the C166 cells,  $20 \mu\text{M}$  of EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine-, ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA) was added to the culture wells and incubated for 1 h until the end of the experiment. Then, the cells were fixed in a 4% paraformaldehyde solution (PFA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 15 min at RT (room temperature), rinsed 3 times in PBS 1X (Gibco), incubated in 100 mM Tris solution pH 7.6 (Acros Organics) for 10 min, and permeabilized in 0.1%  $v/v$  Triton-X100 (ThermoFisher) in PBS 1X for 15 min at RT. Cells were then incubated for 30 min at RT in the dark in a click-chemistry reaction buffer composed of 2 mM  $\text{CuSO}_4$  (Sigma Aldrich), 8.3 mM bright photostable AzideFluor<sup>®</sup> 488 (Sigma Aldrich) and 20 mg/mL ascorbic acid (Acros Organics) subsequently added in 1X PBS. A counterstaining of nuclear DNA was carried out with  $20 \mu\text{M}$  Hoescht 33342 in PBS 1X for 5 min at RT in the dark. At least 10 images were taken for each condition at X100 magnification with an epifluorescence microscope (AxioImager M2, Carl Zeiss, Jena, Germany) for further image analysis in order to determine cell density and proliferation rate.

### 2.2.4. Dosage of VEGF-A Secretion by ELISA

C166 were seeded at  $2500 \text{ cells}/\text{cm}^2$  on the 4 materials. The negative control was C166 seeded without material (plastic of culture dishes). After 24 h, 72 h and 168 h of culture, the culture supernatant was harvested for VEGF-A dosage by ELISA (splicing variants

VEGF<sub>164</sub> and VEGF<sub>120</sub>). ELISA was performed on the culture supernatants according to the manufacturer's instructions (DuoSet ELISA Development System, Mouse VEGF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### 2.2.5. Western Blot

After 7 days of culture, C166 cells were rinsed three times in PBS 1× and lysed in Laemmli buffer 1× without bromophenol blue and beta-mercaptoethanol (2% *w/v* sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich), 10% *v/v* glycerol (Sigma-Aldrich), 60 mM Tris (ThermoFisher Scientific), pH 6.8). The lysates were then passed through a 28G syringe needle and centrifuged at 17,000× *g* for 10 min at RT. The protein content was dosed with a UV-vis spectrophotometer (QuickDrop, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Then, 5% beta-mercaptoethanol (Acros Organics) and 0.002% of bromophenol blue (Sigma Aldrich) were added to the lysates, which were then heated at 95 °C for 10 min, for protein denaturation. For each condition, 15 µg of heat-denaturated proteins were loaded on 4–15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-rad, Hercules, CA, USA) and separated by electrophoresis. Then, the proteins were transferred on 0.45 µm polyvinylidene fluoride membranes (Bio-rad). After the saturation of the specific antigenic sites with 5% skimmed milk (Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) in TBS-0.5% Tween-20 for 1 h at RT, the membranes were first hybridized with primary antibody overnight at 4 °C (rabbit anti-MMP9 or mouse anti-actin, Sigma-Aldrich), and then with the appropriate secondary antibody conjugated to HRP (goat anti-rabbit; goat anti-mouse, ThermoFisher) for 1 h at RT. The proteins of interest were detected by chemiluminescence using a luminol-based reagent (Amersham, Chicaigo, IL, United States), the signal was detected and acquired using a Fusion FX system (Vilber-Lourmat, Marne-La-Vallée, France). The results were analyzed using the ImageJ software (version 1.54f, NIH, Bethesda, MD, USA) and the densities of the signals of interest were normalized according to those of actin. The same membranes were used to analyze MMP-9 and actin expression. A stripping procedure was performed after MMP-9 signal revelation by immersing membranes for 10 min at RT in a stripping buffer (2% *w/v* glycine (Sigma-Aldrich), 1% *w/v* SDS, 10% *w/v* Tween-20, pH 2.2). Then, the Western blot procedure was restarted from the saturation step.

#### 2.2.6. In Situ Expression of Angiogenesis Markers

Staining of the actin cytoskeleton or immunolabeling of angiogenesis-related proteins was performed either on C166 cells directly cultured at the surface of the ceramics (seeded at 20,000 cells/cm<sup>2</sup> on the 4 materials and cultured for 7 days, then fixed with 4% PFA for 10 min at RT) or on cells used for the tubulogenesis assays. Though not systematically specified, the cells were rinsed three times in PBS 1× between each step of the procedure. The cells were permeabilized in PBS/Triton X-100 (ThermoFisher) 0.1% *v/v* for 15 min at RT. Aspecific antigenic sites were saturated with 3% *m/v* BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) in PBS 1× solution for 30 min at RT. Actin cytoskeleton was stained by incubation with phalloidin conjugated to a fluorochrome (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 1 h at RT according to the manufacturer recommendations. VEGFR-2 and MMP-9 were labeled using monoclonal mouse-anti-VEGFR-2 (clone A-3, Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200) and polyclonal rabbit anti-MMP9 (Sigma Aldrich, dilution 1:250), respectively, for 2 h at RT.

Secondary antibody (goat anti-mouse conjugated to AlexaFluor 488 and goat anti-rabbit conjugated to AlexaFluor 594, ThermoFisher) was hybridized for 1 h at RT in the dark. Counterstaining of the nuclei was performed with Hoechst 33342 (ThermoFisher), 10 µM in PBS 1× for 5 min at RT in the dark.

Images were acquired using an epifluorescence microscope (AxioImager M2, Carl Zeiss, Jena, Germany). For tubulogenesis assay, the images were acquired with a AZ100 wide-field confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan) coupled to a Andor DU-897 camera (Oxford Instruments, England, UK).

### 2.2.7. Dosage of Chemical Elements in the Culture Medium

During cell culture experiments, the culture medium was collected after 3 days (medium renewal) and 7 days (end of experiments). Additionally, ceramic pellets were immersed in the complete culture medium in the same conditions but without cells. The medium was collected after 3 and 7 days, pooled by condition, and diluted in pure water in order to obtain a final volume of 10 mL. Then, 2% of nitric acid (VWR) was added. Calcium and silicon contents were dosed into the collected medium by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP/OES, Optima DV 8300, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Pellet surfaces without cells seeded were examined after 7 days of immersion by scanning electron microscopy (Quanta 450 FEG, FEI, Hillsboro, OR, USA).

### 2.2.8. Wound Healing Assay in Ceramics Dissolution Media

C166 were seeded at 25,000 cells/cm<sup>2</sup> in 96-well culture plates (Sarstedt, Germany) for 48 h to obtain a confluent cell layer. A wound was realized with a Wound Maker (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) in the center of cell layers. Cells were rinsed in complete culture medium and 100 µL of a test medium was added. In a first set of experiments, the test medium consisted either of complete culture medium (as described in Section 2.2.1) or of conditioned culture medium resulting from the immersion of ceramic pellets alone (without seeded cells) for 3 days at 37 °C in a cell culture incubator. In a second set of experiments, the test medium was either complete culture medium or high-glucose DMEM without calcium (Gibco), supplemented with 10% FCS, penicillin and streptomycin, and different concentrations of CaCl<sub>2</sub> (0.5, 0.75, 1 and 1.5 mM, Sigma-Aldrich). The cells were then cultured for 48 h in an Incucyte system (Sartorius, Göttingen, Germany) equipped with a camera taking two images per well each hour. The wound area was measured for all of the resulting pictures using ImageJ software, and the percentage of wound closure was calculated as follows:

$$100 - \frac{100 \times \text{wound area}_t}{\text{wound area}_{t=0}} \quad (1)$$

Wound closure speed was calculated by linear regression (slope) from the curve of the percentage of the wound versus time during the first 24 h of the experiment.

### 2.3. Statistical Analysis

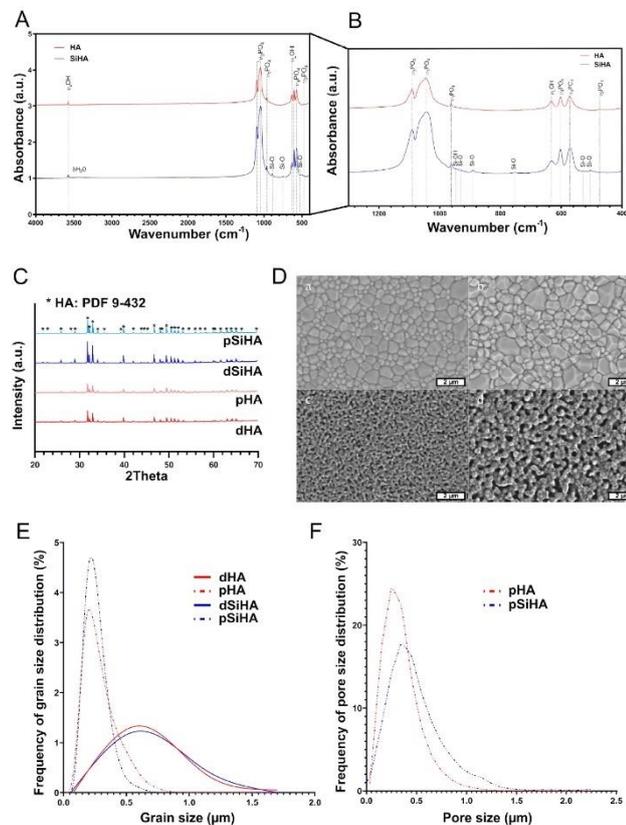
A minimum of 3 independent *in vitro* experiments were conducted for each biological evaluation. Data were assayed for normality using the Shapiro–Wilk test using GraphPad Prism 9 (version 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). According to the data set and normality test results, the Kruskal–Wallis test was followed by a Dunn’s post hoc test, or one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed and followed by Tukey’s multiple comparison test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All of the results with error bars are presented as mean ± standard deviation. The values given for the analysis of metabolic activity were normalized on the absorbance measured for dHA at 24 h. The results of image analysis obtained for the quantifications of the Western blots were normalized to the dHA ceramic as a reference before statistical evaluation.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of Hydroxyapatite-Based Ceramics

The chemical–physical characterizations of sintered ceramic pellets are summarized in Figure 1. The XRD patterns (Figure 1C) displayed only peaks matching those of ICDD-PDF card n°9-432, assigned to the apatite crystalline phase. No other crystalline phase was detected. FTIR spectra (Figure 1B) confirmed the phase purity of the HA and SiHA ceramics with the vibrational bands of phosphate (at 474, 600, 963, 1040 and 1090 cm<sup>-1</sup>) and hydroxyl (at 3572 and 630 cm<sup>-1</sup>) groups for HA ceramics, and additional bands of low intensities in the domain 500 to 960 cm<sup>-1</sup> (Figure 1B) that were assigned to silicate vibrations in the apatite lattice of SiHA ceramics [38]. The typical microstructures of the four

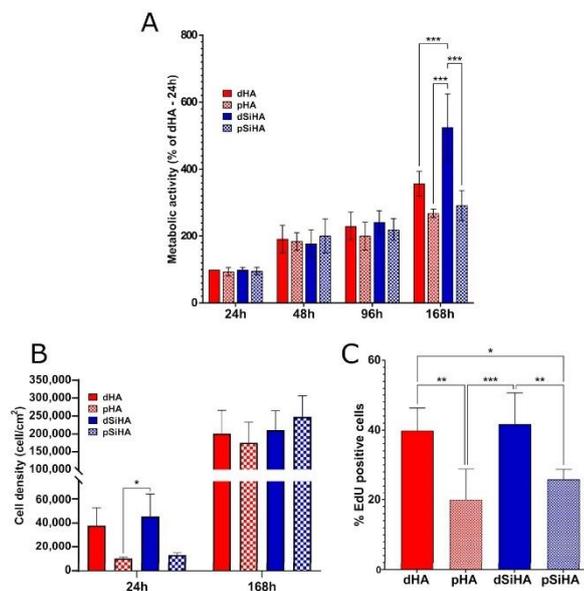
ceramics are given in Figure 1D. dHA and dSiHA had very similar microstructures, with monomodal grain and pore size distributions. Average grain size was  $\Phi_G = 0.55 \mu\text{m}$  for both dHA and dSiHA. In the same way, pHA and pSiHA also had similar microstructures, with monomodal grain and pore size distributions. Average grain and pore size values were  $\Phi_G = 0.22 \mu\text{m}$  and  $\Phi_P = 0.30 \mu\text{m}$ , respectively, for pHA, and  $\Phi_G = 0.19 \mu\text{m}$  and  $\Phi_P = 0.45 \mu\text{m}$ , respectively, for pSiHA. The total microporosity rate was 22% for pHA and 24% for pSiHA. The specific surface area was  $0.003 \text{ m}^2/\text{g}$  and  $0.009 \text{ m}^2/\text{g}$  for dHA and dSiHA, respectively, and it reached  $4.0 \text{ m}^2/\text{g}$  and  $2.0 \text{ m}^2/\text{g}$  for pHA and pSiHA, respectively. As both the chemistry and the microstructure of bioceramics may affect their biological behavior, it was of prime importance to be able to discriminate between their respective effects. Thus, sintering conditions for each ceramic were chosen in order to be able to evaluate (i) the influence of the microstructure, by comparing dense versus porous ceramics of the same composition, and (ii) the influence of the chemistry, by comparing HA versus SiHA ceramics having the same microstructure.



**Figure 1.** Chemical–physical characterization of HA-based ceramics. (A) FTIR analysis of the HA powders. (B) Inset of FTIR spectra of the HA powders from  $400$  to  $1250 \text{ cm}^{-1}$ . (C) XRD diffractograms of the sintered ceramic pellets indexed according to ICDD-PDF card n°9-432 (\*). Microstructure of HA-based ceramics. (D) Scanning electron microscopy micrograph of the surface of the ceramic pellets: (a). dense HA; (b). dense SiHA; (c). porous HA; and (d). porous SiHA. Scale bar (white):  $2 \mu\text{m}$ . (E) Distribution frequency of the grain size. (F) Distribution frequency of the pore size.

### 3.2. Ceramics' Biocompatibility towards C166 Endothelial Cells

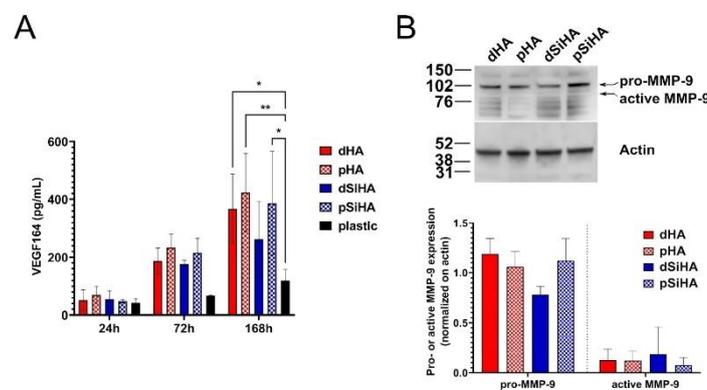
The metabolic activity of the C166 endothelial cells was first evaluated with time from 1 to 7 days (Figure 2A). Dense HA ceramics were used as a biocompatible control, and consequently, the results were normalized as a function of the absorbance measured for dHA at 24 h. From seeding until the seventh day (168 h) of culture, the overall metabolic activity increased, implying a growth of the cell population at the ceramic surface. More precisely, between 24 h and 48 h, the metabolic activity of the cell population growing at the ceramic surface increased significantly for all conditions, which was no more the case between 48 h and 96 h. Then, at 7 days, the metabolic activity was significantly higher than that at 96 h for the dense ceramics (dHA 96 h vs. dHA 168 h:  $p = 0.007$ , and dSiHA 96 h vs. dSiHA 168 h:  $p < 0.001$ ), but not for the porous ones (pHA 96 h vs. pHA 168 h:  $p = 0.621$ , and pSiHA 96 h vs. pSiHA 168 h:  $p = 0.545$ ). At this culture time, the metabolic activity was also significantly higher when cells were cultivated on the surface of dSiHA ceramics compared to that of other ceramic materials. While not statistically significant, a trend towards a lower metabolic activity on porous ceramics compared to dense ones could be observed. The metabolic activity was notably dependent on the number of cells. Therefore, the cell density at the surface of the material was evaluated by image analysis at 24 h and 7 days (Figure 2B). The cell density trended to be higher on dense ceramics compared to on porous ones. After 7 days, all of the cells were confluent. Whatever the time point, very few condensed nuclei or nuclei with altered morphologies were seen, suggesting a low cell mortality, comparable to that observed in routine cultures of C166 cells. The proliferation ability of the cells was evaluated at 24 h, before confluency (Figure 2C). At this time, the number of cells positive for EdU was significantly reduced (by around half) at the surface of the microporous samples compared to at the surface of their dense counterparts. There were no significant differences with respect to the chemical composition of the ceramics.



**Figure 2.** Evaluation of biocompatibility of HA ceramics towards C166 endothelial cells. (A) Metabolic activity evaluated by resazurin assay. (B) Cell density after 24 h and 168 h on HA-based ceramics, on the basis of nuclei count after pellet imaging. (C) Cell proliferation evaluated by EdU incorporation. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ . n = 3.

### 3.3. Expression of Angiogenesis Markers by C166 Cells Cultured on Ceramics

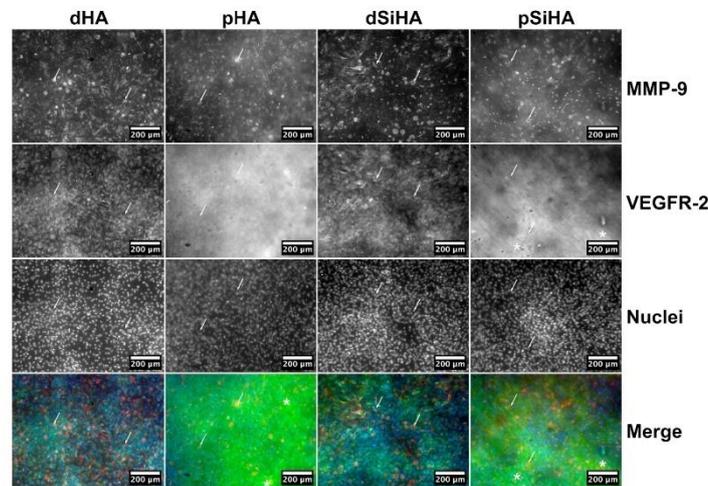
To assess the angiogenic status of the C166 cells cultivated onto the different ceramic surfaces, the secretion of the key angiogenic growth factor VEGF-A isoform 164 was dosed by ELISA at three time points: 24 h, 72 h and 168 h (Figure 3A). At 24 h, about 50 pg/mL of VEGF-A was detected in the culture supernatant of the C166 cells, regardless of the culture support (ceramics or culture plastic). After 72 h, there were no significant difference between the conditions, while a trend towards higher secretion of VEGF-A by C166 cells cultured onto ceramic surfaces compared to C166 cells cultured in the bottom of plastic culture dishes was observed. This trend was confirmed after 7 days of culture (168 h) with a significantly higher concentration of VEGF-A detected in the culture supernatant of C166 cells grown at the surface of ceramics than in that of cells grown directly on plastic. In all of the experiments, neither the chemical composition nor the microstructure of the ceramic pellets influenced VEGF-A secretion.



**Figure 3.** Expression of angiogenesis-related markers. (A) Dosage of VEGF-A secreted by C166 cells cultured at the surface of HA-based ceramics or plastic culture wells evaluated by ELISA.  $n = 3$  independent experiments. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.005$ . (B) Evaluation of expression of MMP-9 in C166 cells cultured at the surface of HA-based ceramic pellets by western-blot. Upper panel: representative MMP-9-related and actin-related signals. Lower panel: quantification by densitometry of pro- and active MMP-9 signals normalized on the signal detected for actin as housekeeping protein.  $N = 3$  independent experiments. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. No significant differences were detected between any of the conditions ( $p > 0.05$ ).

To explore the physiological state of the C166 cells as a function of the ceramic surface onto which they were cultivated in more depth, MMP-9 expression in C166 was assayed by Western blot after 7 days of culture (Figure 3B). A major signal was detected at about 102 kDa corresponding to the pro-enzyme. The signal detected around 80 kDa should correspond to the active form of the enzyme resulting from a proteolytic cleavage. Whatever the considered form, pro- or active MMP-9, no significant differences were observed between any of the conditions (Figure 3B, lower panel).

The expressions of MMP-9 and the VEGF-A main receptor, VEGFR-2, were then studied in situ after immunostaining, at two magnifications (Figures 4 and S1–S3). On all ceramics, the cell population was homogeneously distributed throughout the available surface. MMP-9 expression was detected on all of the samples, but not all of the cells expressed this protein or expressed it with the same intensity. The staining was mostly intracytoplasmic in MMP-9-expressing cells (arrows, Figures 4 and S2). The global intensity of the signal did not differ markedly between the conditions, which is consistent with the Western blot results (Figures 3B and S1).



**Figure 4.** In situ expression of MMP-9 (red) and VEGFR-2 (green) as angiogenesis-related markers in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets after immunofluorescence staining. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ . Arrows point out example of cells where the intracytoplasmic staining of MMP-9 is particularly visible. Asterisks show zones with high background. For the same figure with individual staining depicted in color (addition of false colors by post-processing), see Figure S2.

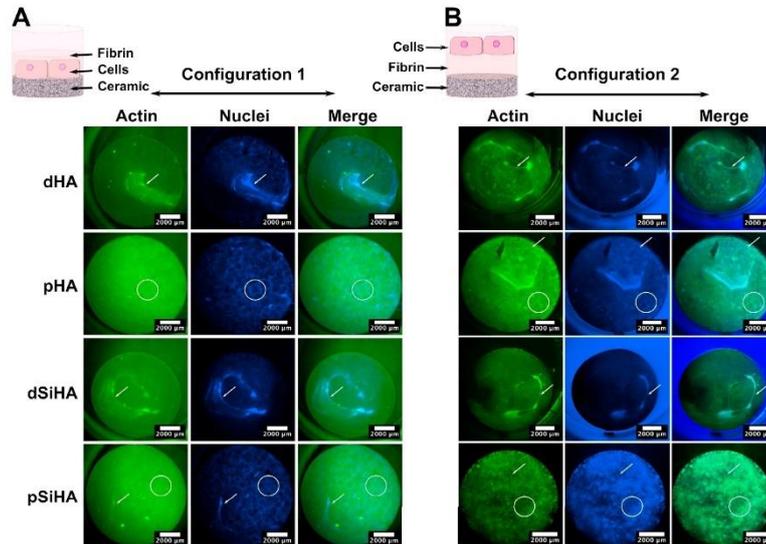
Regarding VEGFR-2 (Figures 4, S2 and S3), the staining was difficult to analyze on porous ceramics because of a reflection phenomenon, due to the microscopy modality (epifluorescence), which produced a high background (examples of zones of high background are highlighted with stars on Figures 4 and S2). VEGFR-2 was detected in the cytoplasm of all of the cells (Figures 4 and S1), with no differences being observed, regard less of the chemistry or architecture of the ceramics.

Taken together, these results highlight that the ceramics exert a positive influence on the secretion of VEGF-A in comparison with the plastic dishes. This secretion was not altered by either the ceramic chemical composition or the surface microstructure. The analysis of angiogenesis markers downstream of VEGF-induced angiogenic pathways, VEGFR-2 and MMP9 confirmed that the changes in ceramic microstructure or composition did not influence the angiogenic status of the C166 cells.

#### 3.4. Tubulogenesis

In vitro tubulogenesis recapitulates the events occurring during angiogenesis at the endothelial cell level, when they are cultivated in a 3D environment mimicking an ECM, generally obtained using basement membrane-like hydrogels (e.g., Matrigel, collagen matrix, etc.). Therefore, to explore the potential angiogenic behavior of the C166 endothelial cells according to the HA-based ceramic composition or microstructure, a tubulogenesis assay adapted to the use of ceramic scaffolds was developed. To this end, two experimental setups (depicted in the diagrams on the upper part of Figure 5) were implemented in order to discriminate the influence of the microstructure from that of the chemical elements, in this case, the incorporation of silicon into the HA lattice of the SiHA ceramics. In the first setup, named “Configuration 1”, the cells were seeded directly onto the ceramic pellet surfaces, and a fibrin gel was generated on top. Configuration 1 was designed to make it possible to study the influence of the microstructure and chemical composition of the ceramic on the cell behavior. The second setup, called “Configuration 2”, was designed to assess the potential effects of chemical elements that are released from the ceramics

(dissolution products) into the culture medium. To this end, the fibrin gel was poured directly onto the ceramic surface, and the cells were seeded on top, so that they were not in contact with the material surface.



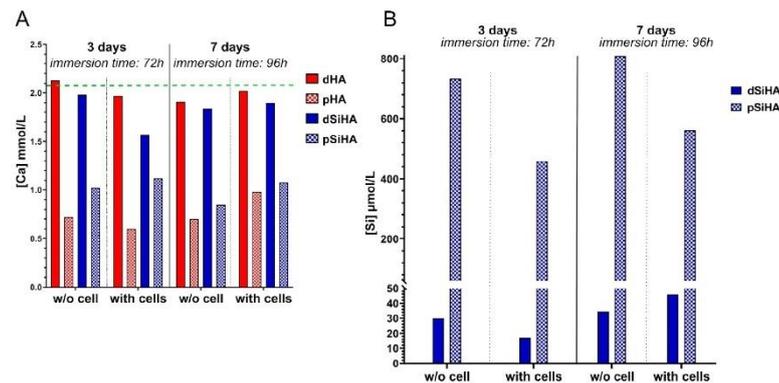
**Figure 5.** Wide-field confocal microscopy images of C166 cell layer organization on whole ceramic pellets after tubulogenesis assay using a fibrin gel and imaged with a widefield confocal microscope. (A) Configuration 1: Cells were seeded directly onto the ceramic surface and the fibrin gel poured on top. (B) Configuration 2: Cells were seeded on the top of the fibrin gel directly poured on the ceramic surface. Green: Actin stained with phalloidin conjugated to DyLight 488. Blue: Nuclei stained with Hoechst 33432. Scale bar: 2000  $\mu\text{m}$ . Arrows point to tubule-like structures. Circles delimit examples of alveolar pattern of the cell tissue.

After 7 days of culture in Configuration 1 (Figure 5A), some tubule-like structures were present, mainly on the dense ceramics. These tubule-like structures were positive for VEGFR-2 and MMP-9, which was consistent with the occurrence of tubulogenesis. Some cells with a “tip-cell”-like structure were observed (Figure S4). The whole cell tissue organization differed depending on the ceramics’ microstructures, but not on their chemical compositions. On the one hand, the tubule-like network appeared more developed on dense ceramics. On the other hand, the cells that were not involved in the tubule-like structures made a layer with an alveolar pattern at the surface of microporous ceramics. There was no perceptible effect due to the presence of silicon in SiHA, with the cell repartition being similar for comparable microstructures (i.e., dHA vs. dSiHA or pHA vs. pSiHA). These results indicate a strong influence of the microstructure upon the organization of the C166 endothelial cells and their ability to perform tubulogenesis at the ceramic surface.

Unexpectedly, the results obtained with Configuration 2 (Figure 5B) were very close to those described for Configuration 1. On dense ceramics, tubule-like structures were more frequently seen than on the porous ones. At the surface of pHA and pSiHA, the cell layer acquired an alveolar pattern. Consequently, the mechanism by which the ceramics affected the cell behavior stemmed from the surface physical parameters associated with the microstructure, but the final cue is chemical in nature.

### 3.5. Dissolution of HA-Based Ceramics

In order to examine the hypothesis arising from the results of the tubulogenesis assay, the elementary chemical compositions of the dissolution products of the ceramics were evaluated. Ca and Si were dosed by ICP-OES into the complete culture medium in which the ceramic pellets were immersed in the presence of or without C166 endothelial cells (Figure 6). To reproduce the cell culture conditions, the culture medium was renewed after 3 days at 37 °C.



**Figure 6.** Release of chemical elements (Ca and Si) from HA-based ceramics in the C166 cell culture medium with or without cells, dosed by ICP-OES. The ceramics were immersed for 7 days in the culture medium with a total replacement of the culture medium after 3 days. (A) Calcium concentration. The green line materializes the concentration of calcium measured in the complete culture medium alone. (B) Cumulative silicon release with time. The measure was performed on pooled samples from 3 independent experiments.

DMEM high-glucose is formulated with a calcium concentration of 1.8 mmol/L. The addition of 10% of FCS, characterized by a calcium concentration ranging between 2.1 and 2.6 mmol/L (physiological bovine calcemia), led theoretically to a final calcium concentration in the complete culture medium of around 2 mmol/L. The dosage confirmed this value, with a calcium concentration of 2.04 mmol/L measured in the complete culture medium alone. This is represented by the green dotted line in Figure 6A. The results differed depending on the ceramic microstructure. For dense materials (dHA and dSiHA), the deviation from the complete culture medium, taken as a reference, was very small. Only a slight decrease in Ca concentration was measured. It always remained above 1.8 mmol/L, whether cells were present or not. The results did not change after culture medium renewal suggesting the establishment of a chemical equilibrium.

In the case of the porous ceramics (pHA and pSiHA), the calcium concentration in the medium in which the ceramics were immersed was drastically diminished (by at least half) in comparison with their dense counterparts or the complete culture medium. Phosphorus dosage, represented by the presence of orthophosphate ions in the culture medium, returned similar trends regarding the difference between dense and microporous ceramics after 3 days of immersion (Figure S5A), with a decrease in phosphorus concentration when microporous ceramics were used. The decrease in calcium and phosphate ion concentrations in the liquid medium can be explained by the adsorption of these ions at the ceramic surface in a poorly organized non-apatitic hydrated layer, as described elsewhere [39]. This phenomenon was all the more important when using porous samples, as their surface area was much greater than that of the dense samples. With the zeta potential of the HA-based ceramic surface being negative, ranging from  $-21$  mV to  $-25$  mV (determined on the basis of powder from crushed sintered pellets using a Zetasizer (Malvern Panalytical)), a

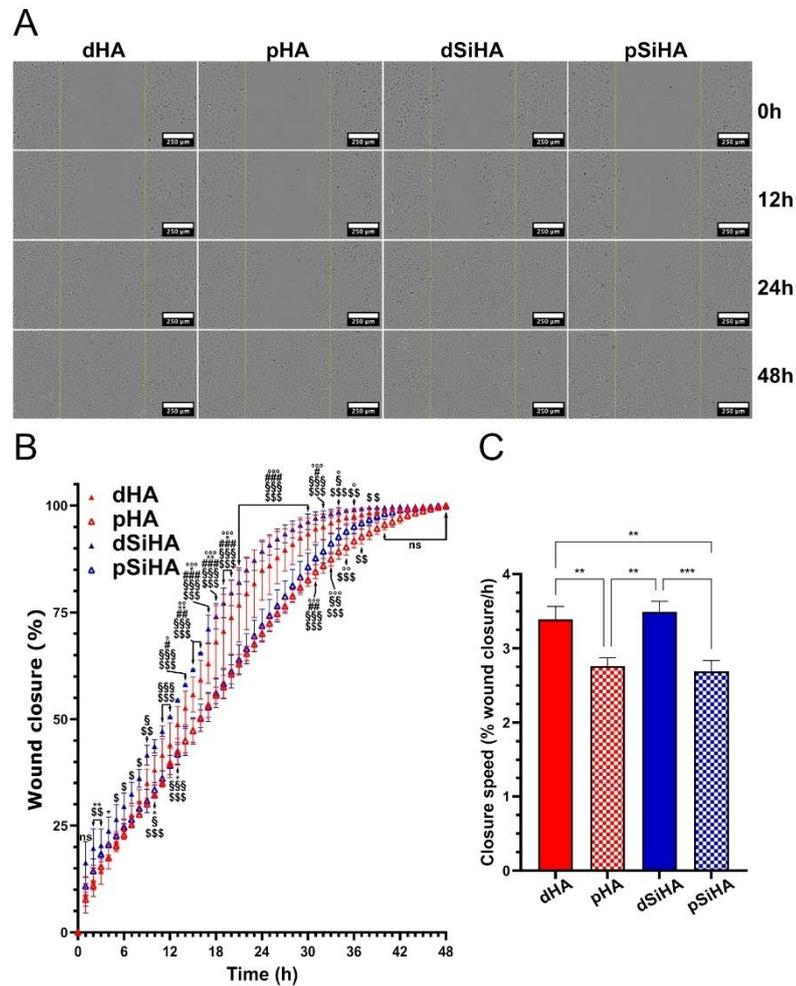
preferred adsorption of  $\text{Ca}^{2+}$  ions compared to phosphate ions could logically be expected. Such a phenomenon was not detectable by scanning electron microscopy (Figure S5B), as it did not lead to the formation of new biological apatitic crystals at the surface of the ceramic as a result of the dissolution/precipitation process (with a solubility constant  $K_s \approx 10^{-117}$  for  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  at  $37^\circ\text{C}$  [40]), as is usually observed when, for instance, HA ceramics are immersed in simulated body fluids.

Neither the complete culture medium nor the pure HA ceramics contained silicon. Thus, the silicon released from the ceramics immersed into the culture medium was only dosed for dense and porous silicon-doped HA conditions (Figure 6B). As silicon is not expected to precipitate in the biological apatites that could form from the dissolution/precipitation of HA-based ceramics in solution, the results after 7 days are reported as cumulative release (i.e., the silicon content measured in the culture medium after 3 days is added to that measured in the renewed medium after 7 days). A continuous release of silicon into the culture medium, with or without cells, was measured over time. The silicon quantity released by the porous SiHA ceramics was at least 25 times greater than that released by dense ceramics without cells. This result can also be explained by the increase in specific surface area of the ceramic due to microporosity. With cells, this difference in silicon release between dense and porous ceramics persisted, but it was reduced to around 12 times.

Taken together, these results show that the presence of microporosity caused a depletion of the calcium (and, to a lesser extent, of phosphorus) in the culture medium, regardless of the ceramic composition, and an important increase in silicon concentration for SiHA ceramics, likely due to the higher specific surface area of the microporous samples.

### 3.6. Effect of Ceramic Extracts on C166 Activation

In order to assess the effect on C166 cell behavior of the chemical changes in the culture medium due to the microporosity of the ceramics, an indirect wound healing assay using the dissolution products resulting from the immersion of the ceramic pellets was realized (Figure 7). A wound was created on the confluent cell layer. Its recolonization was recorded for 48 h, as all of the wounds were closed after 48 h of incubation. It could be observed visually (Figure 7A) that the cells cultured in the dissolution products from dense SiHA ceramics closed the wound the fastest. The wound closures were the slowest with the dissolution products from microporous ceramics (pHA and pSiHA). The observations were confirmed by measurements made using computer-assisted image analysis (Figure 7B,C). The Figure 7B depicts the wound closure according to time. During the first 24 h, the kinetics of the closure was almost linear. Then, the final phase of the closure proceeded at a slower rate. The average wound closure was above 99% after 36 h for cells cultured in culture medium conditioned by dSiHA, 41 h for dHA, 43 h for pSiHA and 46 h for pHA. The dSiHA condition presented the highest wound closure rate at all time points. This was statistically different from dHA at nine time points between 2 and 20 h (stars on Figure 7B). Conversely, pHA did not differ from pSiHA. Notably, it could be observed that an inflexion arose 6 h after the lesion with the microporous-ceramic-derived culture media, causing a shift between the curves corresponding to the culture medium from dense ceramics and those from porous ones. This time point corresponded to the beginning of the occurrence of visible effects due to microporosity of the ceramics. Figure 7C presents the slopes of the wound closure curves calculated for each condition during the first 24 h (linear part of the curves). The wound closure speed was significantly higher when the cells were cultured in the conditioned medium resulting from immersion of dense ceramics, and there were no significant differences between dHA and dSiHA. These results confirm that microporosity had a negative influence on C166 endothelial cell activity via a chemical-based mechanism.

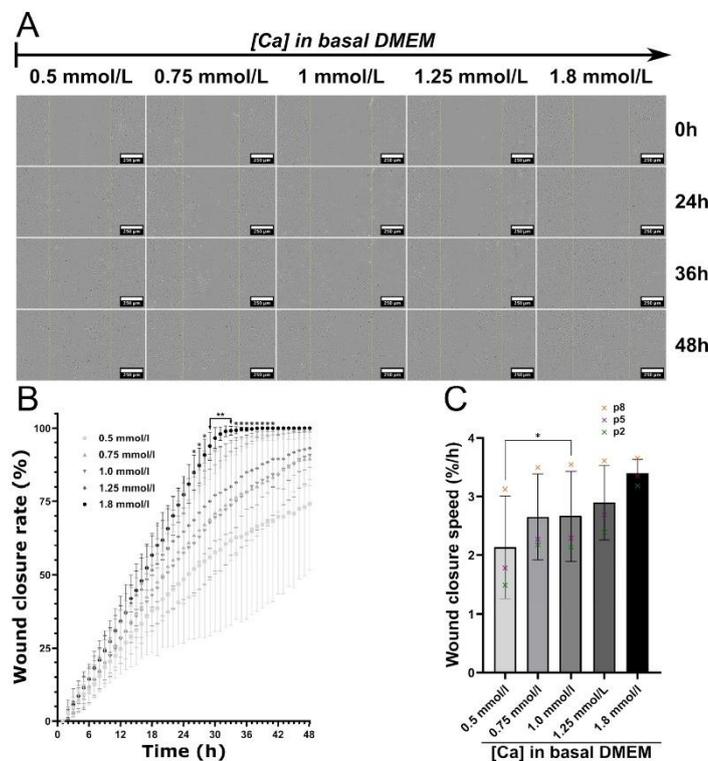


**Figure 7.** Wound healing assay performed during 48 h on C166 cell layer cultured in culture medium containing dissolution products of HA-based ceramics. (A) Images taken during WHA experiment. Scale bar: 250  $\mu$ m. (B) Quantification of wound closure with time by image analysis (for details, see Section 2.2.8). Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test. ns: non-significant,  $p > 0.05$ . one symbol:  $p \leq 0.05$ , two symbols:  $p \leq 0.005$ , three symbols:  $p \leq 0.001$ .  $\circ$ : dHA vs. pHA,  $*$ : dHA vs. dSiHA,  $\#$ : dHA vs. pSiHA,  $\$$ : dSiHA vs. pHA,  $\S$ : dSiHA vs. pSiHA. (C) Wound closure speed, calculated during the first 24 h. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test.  $**$ :  $p \leq 0.005$ ,  $***$ :  $p \leq 0.001$ .  $n = 3$ .

### 3.7. Impact of Calcium Deficiency in the Culture Medium on C166 Activation

Calcium is an essential element for cell biology, and its ionic concentration in the culture medium was strongly altered by the presence of microporous ceramics. To test whether the calcium deficiency was the cause of the negative impact of the culture media conditioned by microporous ceramics on C166 activity, a complete culture medium containing calcium concentrations in the range of those measured by ICP-OES was also

tested on cells in a wound healing assay experiment (Figure 8). The basal high-glucose DMEM routinely used for C166 culture contains 1.8 mmol/L of calcium as CaCl<sub>2</sub>. To reproduce the reduction of the calcium concentration, a high-glucose DMEM without calcium supplemented with 0.5, 0.75, 1 and 1.25 mmol/L of CaCl<sub>2</sub> was used to prepare the complete culture media. As depicted in Figure 8A, the lower the calcium concentration, the slower the wound closure. Moreover, when there was less than 1.25 mmol/L of calcium in the basal medium (which corresponds to about 1.35 mmol/L of calcium in the complete culture medium), the cells did not close the wound after 48 h. These observations were confirmed by image quantification. Here, three independent experiments were performed with C166 at different passages: p2, p5 and p8, respectively. A similar trend was observed for all conditions, but the cells with the highest passage numbers seemed to better resist calcium deprivation (Figure 8C, where crosses represent each independent experiment, and Figure S6A).



**Figure 8.** Wound healing assay performed for 48 h on C166 cell layers cultured in complete culture medium with various concentrations of calcium. (A) Images taken during WHA experiment. Scale bar: 250  $\mu$ m. (B) Quantification of the wound closure with time by image analysis (for details, see Section 2.2.8). Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test. \*: 1.8 mmol/L vs. 0.5 mmol/L,  $p \leq 0.05$ ; \*\*: 1.8 mmol/L vs. 0.5 mmol/L,  $p \leq 0.005$ . (C) Wound closure speed, calculated during the first 24 h. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test. \*:  $p \leq 0.05$ . n = 3.

Due to the high standard deviation, only a significant difference at  $p \leq 0.05$  was observed between the standard complete culture medium (1.8 mmol/L of calcium) and the

lowest calcium concentration of 0.5 mmol/L. Considering the wound closure speed, the cell migration and proliferation were significantly lowered for cells cultured with DMEM containing 0.5 mmol/L of calcium in comparison with those containing 1.0 mmol/L. The Ca concentrations of 0.75 and 1.0 mmol/L in basal medium (or, respectively, around 0.86 and 1.12 mmol/L, when taking account of the FCS supplementation) were very close to those measured for pHA and pSiHA (Figure 6A). It is worth noting that the healing rates measured with culture media conditioned by microporous ceramics and those in their counterparts in terms of calcium concentrations were highly comparable (Figure S5B). Thus, the reduction in the amount of calcium in the solution is most likely at the origin of the impairment of endothelial cell activity caused by the microporosity of HA ceramics.

#### 4. Discussion

The vascularization of scaffolds made of calcium phosphate ceramics is crucial for the success of their implantation and further osteointegration [6]. The vascularization extent and quality condition the penetration, survival and activity of bone tissue cells in porous scaffolds at depths beyond 1 cm from the surface [41]. Among the strategies able to stimulate the biological performances of ceramics, chemical design and the adjustment of the micro- and macro-architecture of the porous scaffold appear highly promising [6,24]. However, whatever the strategy followed, several chemical–physical parameters will inevitably be modified, making it difficult to elucidate the underlying mechanism affecting cell or tissue behavior [24]. In other words, it is still a challenge to associate a given chemical or physical parameter with a particular cell response. In addition, for a given parameter, such as surface topography, different cell types do not react in the same way. For example, osteoblasts and osteoclasts are not stimulated by the same level of roughness: at a micrometric scale, roughness is favorable for osteoblasts and deleterious for osteoclasts [42]. The specific relationships between the chemical–physical properties of bioceramics and the endothelial cells at the interface are still little explored. The prime motivation of this study was to develop an *in vitro* model that would make it possible to perform tubulogenesis assays on the ceramic surface in order to study endothelial cell colonization. In order to be efficient, the experimental procedure had to distinguish between the physical and chemical parameters at the material/cell interface in order to understand how changes in the chemical composition and/or the microstructure of the material can influence biological behavior. To validate the experimental setup, four different HA-based ceramics, varying either in terms of their chemical composition or in terms of their microstructure, were used to perform two-by-two comparison.

The second objective of this work was to evaluate (i) the influence of silicon as a doping element in HA and (ii) the influence of surface micropores on the biological response. While numerous works devoted to the *in vitro* characterization of such ceramics using bone or mesenchymal stromal cells have been published, controversy still exists as to the real role of each of these chemical or physical parameters. Moreover, as mentioned above, the specific relationships between HA-based ceramic properties and endothelial cells have been little explored to date.

Thus, to study chemical design, HA-based ceramics were compared to silicon-doped HA. Silicon was chosen because of its potential pro-angiogenic activity, which has been documented in the literature both *in vitro* and *in vivo* [7,11,27,43–46]. The majority of *in vitro* studies have been performed using dissolution products from silicon-containing materials such as calcium silicate [10,11,27]. Stimulation of the expression of VEGFR-2 was hence described in HUVEC cells exposed to calcium silicate extracts [44]. With the aim of assessing the impact of the microarchitecture, HA and SiHA ceramics were differentially sintered to obtain either dense materials or comparable microporous ones, in terms of chemical–physical surface characteristics. By increasing the specific surface area and modifying other ceramic surface characteristics such as roughness and topography, microporosity interferes with cell adhesion [47], proliferation [48,49] and fate [21].

In order to specifically answer the question about the response of endothelial cells to the bioceramic surface, a mono-culture model was necessary. Because of its ability to exhibit physiological endothelial cell behavior and to form tubules in 3D environments [34], the murine C166 endothelial cell line was chosen as the biological model. The C166 cells originated from the yolk sac—the first site of vasculogenesis and hematopoiesis during the embryonic development [50]—of mouse embryos issued from hypervascular transgenic mouse. The C166 clone has the ability to support embryonic hematopoiesis, unlike other clones derived from the same mouse embryos [34,51], suggesting specific properties close to those of endothelial precursor cells (EPC). Maes et al. used the term of hemangio-endothelial to describe the C166 cells [52]. This feature is interesting, because EPCs are cells present in the bone marrow, and are of great interest in the vascularization of engineered tissues and biomaterials [25,53,54] for their ability to perform vasculogenesis (de novo formation of blood vessels) and for their pro-angiogenic properties. Nevertheless, C166 are mostly regarded as vascular endothelial cells and used as such [55,56], e.g., in the context of biomaterial vascularization [57], with the advantages and the known biases of an established endothelial cell line [46].

The first step in our study consisted of checking the physiology of the C166 cells seeded at the surface of the four HA-based ceramics. At 24 h, the cell populations at the surface of the different materials were comparable. A constant increase in cell population was observed over time on all of the ceramic surfaces. The C166 cells presented a high proliferation rate overall, although it was lower on the microporous ceramic surfaces. Thus, all of the ceramic conditions can be considered to be biocompatible toward endothelial cells, which is consistent with the data in the literature [58,59]. From the results for cell density, proliferation and expression of angiogenesis-related markers, the most influential parameter with respect to cell response was the microstructure. The incorporation of silicon into the crystal HA lattice did not affect these cell properties. Considering that microporosity increased the surface roughness, this result appears consistent with those found with primary EPC cultured on the surface of titanium disks varying in terms of their surface properties, thus highlighting the stronger effect of roughness compared to other surface properties such as wettability [25]. In this study, the EPC exhibited a lower proliferation rate on rougher substrates. An et al. showed that human vascular endothelial cells (HUVEC) had a better viability and proliferation on smooth and hydrophilic titanium surfaces [26]. However, the orders of magnitude of the roughness of the titanium substrates (around 1.2  $\mu\text{m}$  for the rougher ones) and the HA-based ceramics (average roughness Ra:  $4.0 \pm 0.3$  and  $8.1 \pm 0.6$   $\mu\text{m}$  for dHA and dSiHA, respectively) were not the same in the present work. HA, while slightly hydrophobic, has a strong affinity to proteins in the culture medium, which encourages cell adhesion, meaning that this material is not strictly comparable with titanium. Several works conducted either *in vitro* with co-cultures [58], *ex ovo* [28], or *in vivo* [58] have shown calcium phosphate ceramics to have good biocompatibility with endothelial cells, but to the best of our knowledge, none has studied the impact of microporosity. Microporosity, by mechanically increasing the specific surface area, should enhance the amounts of proteins adsorbed from the culture medium *in vitro*. Microporosity has been shown to increase bone cell adhesion via this phenomenon [19]. Microporosity also enhanced the release of silicon in the culture medium, which reached around 800  $\mu\text{mol/L}$  (22.73  $\text{mg/L}$ ) after 7 days without cells. The dosage method employed here did not allow the identification of the chemical form of the silicon released from the Si-doped HA ceramics. Silicon is incorporated as a silicate ion, so it should be released as silicate ions or as metabolizable silicic acid [60], as was modeled in a recent study by Chappell et al. [60]. Silicon is bioavailable as orthosilicic acid and has a positive role in bone metabolism [61] and bone mineralization [60], where its absence is deleterious for bone homeostasis. The daily dietary silicon intake is estimated to be from 20 to 50  $\text{mg}$  [60,62]. No toxicity of dietary silicon was detected at a dose higher than 50,000  $\text{mg}$  in rats [63]. Silicon is tightly regulated in the organism, and cell-specific transporters have recently been identified [64,65]. It has been shown that silicic acid produced by

the degradation of silicon quantum dots is eliminated through urine [66]. In the context of the implantation of silicon-containing ceramics as bone graft substitutes, a potential toxicity due to silicon can be reasonably ruled out, especially as micro-/macroporous silicon-substituted calcium phosphate scaffolds are currently used in clinic [12,67,68].

We have previously demonstrated an excellent biocompatibility of 23% open microporosity in silicon-doped HA toward blood vessels in an *ex ovo* context [28]. Nevertheless, in the present study, there was no positive influence of ceramic surface microporosity on C166 cell attachment or adhesion at short culture times. A comparable density was observed at the end of the experiment for the different ceramics due to a continuous growth of the cells until confluence. This highly proliferative status is related to their nature as an established cell line, and should not be taken into account when judging their activation state. The initial proliferation rate (24 h post seeding) was, however, negatively affected by the presence of open porosity, and the overall metabolic activity of the cell population was also altered. With cell density being unmodified, the latter observation might be attributable to differences in cell activity resulting from the microstructure of the ceramic surfaces. The second step was then to study the angiogenic status of the C166 cells directly cultured on the ceramics. The C166 cells expressed angiogenesis-related markers such as VEGFR-2 or MMP-9 with no differences depending on the microstructure or chemistry of the ceramics on which they grew. Some differences were observed regarding the expression of the master angiogenic and vasculogenic growth factor VEGF-A. Interestingly, starting from 72 h, a trend towards a higher secretion of VEGF-A was detected on all of the ceramics in comparison with the culture dish polystyrene. The increase in VEGF-A secretion on ceramics became significant after 168 h, indicating a pro-angiogenic potential for calcium phosphate ceramics through an auto and paracrine effect, as observed by Chen et al. for different calcium phosphate ceramics, including HA [58]. Although there were no statistically significant differences between the test conditions, we noticed a trend towards a greater production of VEGF-A by cells growing on microporous ceramic surfaces. A parallel with the results obtained by Ziebart et al. with EPC on rough titanium surfaces is therefore seductive [25]. However, HUVEC exhibited a contrasting secretion behavior on the same titanium substrates [26]. Keeping in mind that the surfaces of titanium and HA ceramics are not similar, the modulation of VEGF secretion by C166 is more likely to be due to the nature of the substrate (HA-based ceramics). An explanation for the light incidence of microporosity on VEGF-A secretion by C166 cells may reside in the higher adsorptive capacity of microporous ceramics towards proteins present in the culture medium originating from FCS supplementation, thereby increasing the probability of interaction with cells. FCS, as an extracellular matrix from the blood of mammal fetuses in development, contains adhesive proteins and growth factors, among them pro-angiogenic ones. Incidentally, tubulogenesis can be influenced by the FCS batch for the same endothelial cells.

To explain how the microporosity affects the C166 physiology, the setup of our dual tubulogenesis assay at the bioceramic surface was particularly relevant. This assay enabled the formation of tubule-like structures, mainly on dense ceramics, while the C166 cell tissue rather took on an alveolar morphology on the microporous surfaces. The presence of some cells with a morphology close to that of tip cells suggests that the process is close to angiogenesis. However, vasculogenesis cannot be totally excluded, because in this *in vitro* context, no “pre-existing vessel” exists, and it is possible to reproduce vasculogenesis with endothelial cells in fibrin gels [69]. Here again, the most influential parameter was the microstructure. The pattern of cell repartition differed drastically, with the cell layer on the microporous ceramics having an “alveolar” pattern. On dense microstructures, the cell layer was more homogeneous and the tubule-like structures more frequent. Dense materials therefore seem to be more favorable to the tubulogenesis process. However, the “alveolar” pattern suggests cell rearrangement, and does not mean that cells were inactive when cultured on microporous ceramics. Very similar results were observed in both configurations devoted to distinguishing the impact of chemical parameters from those linked to physical characteristics. The first explanation is that the procedure was

not efficient, and did not enable the initial aim to be completed. The second possibility is that the results from the tubulogenesis assay argue in favor of a “chemical effect” of the microstructure. To determine which was the case, a comparison of the conditioned media was performed that showed a dramatical decrease in calcium concentration with microporous ceramic substrates. The subsequent results from the indirect wound healing assays using dissolution media proved that the impact of microstructure on C166 endothelial cell behavior was definitely due to a chemical mechanism. Indeed, the wound healing assay, which reflected endothelial cell activation characterized by an elevated capacity to proliferate and migrate, demonstrated that the dissolution products from microporous substrates slowed down the wound closure. The presence of silicon appeared favorable to wound closure on dense materials (significant difference between dHA and dSiHA) but not on porous ones (pHA vs. pSiHA). This significant difference was not perceived when the closure speeds were compared. Therefore, under these conditions, it is not possible to conclude a stimulative effect of silicon on C166 endothelial cells.

The reproduction of calcium concentrations using additions of  $\text{CaCl}_2$  in the culture medium returned the same results. Consequently, the modification of calcium availability is most likely the causative element explaining how the microstructure affects the C166 cell physiology. Intracellular ionized calcium is a crucial second messenger for the accomplishment of angiogenesis driven by endothelial cells exposed to pro-angiogenic cues like VEGF-A [70]. The entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the vascular endothelial cells is also stimulated by angiogenic stimuli. Targeting calcium entry in endothelial cells is a strategy for preventing tumoral angiogenesis [71], and several transient calcium channels are involved in VEGF-induced angiogenesis [72]. Such a situation could not be reasonably imagined *in vivo*, due to the permanent flow of interstitial body fluids and blood circulation. Thus, it can be hypothesized that the results obtained in our study are consequences of the 2D static culture. This observation is particularly important, because 2D culture is a convenient and simple means for conducting preliminary experiments to characterize the biological properties of biomaterials, including bioactive ceramics. Despite medium renewal after 3 days, the calcium concentration remained low at the end of the experiment. Consequently, with such microporous bioceramics, the calcium concentration during *in vitro* experiments should be documented and should be taken into account before reaching conclusions.

## 5. Conclusions

This work aimed to (i) develop a reliable *in vitro* protocol for assessing the angiogenic status of endothelial cells directly on biomaterials through a tubulogenesis assay and (ii) to validate this protocol by studying the impact of microporosity and chemical composition of HA-based ceramics on C166 endothelial cells. To this end, four ceramics, differing in terms of their chemical composition (HA vs. SiHA) and their microstructure (dHA and dSiHA vs. pHA and pSiHA), were produced. Prior to performing the tubulogenesis assay, the adhesion and proliferation of C166 cells at the ceramic surface were evaluated over 7 days. The C166 cells adhered significantly better to dense surfaces than to microporous ones, and had a better proliferation rate after 24 h, while the latter should be taken with caution due to the immortalized nature of the C166 line. The metabolic activity of the C166 cells was significantly altered in the experiments performed with longer durations. The production of pro-angiogenic proteins by C166 cells was then assayed. The C166 cultivated at the surface of ceramics exhibited significantly higher pro-angiogenic growth factor VEGF-A production (up to double) compared to when grown at the plastic surface of conventional culture dishes. With time, VEGF-A production trended towards being higher (not significantly) for the cells at the surface of porous ceramics compared to the cells on dense ones. However, there was no statistically significant difference for other angiogenic proteins such as MMP-9 or VEGFR-2. The presence of silicon did not impact the studied cell parameters. Microporosity is consequently the major ceramic parameter affecting the C166 cells at this step. Considering the literature data, the impact of microporosity on C166 might be due to physical cues: increased roughness (adherence and proliferation) and

increased specific surface area through enhancement of protein absorption (production of VEGF-A).

We developed a reliable qualitative procedure to directly evaluate tubulogenesis at the surface of biomaterials using a fibrin gel using two configurations according to the position of cells with regard to the ceramic surface. The underlying idea was to discriminate the effects occurring due to the ceramic's chemistry from those originating from its chemical–physical parameters, mainly microporosity, in this case. Tubule-like structures were observed after 7 days, indicating that the assay was informative. On microporous ceramics, in both configurations, tubule-like structures were less frequently observed (qualitative observation); rather, a repartition of the cell layer into an alveolar pattern was observed.

Having been validated, this procedure will be upgraded by making it quantitative using adapted microscopy imaging and computed analysis and by using co-cultures to sustain endothelial cell assembly into capillary-like structures. The analysis of dissolution products from the ceramics and their impact on the ability of C166 cells to proliferate and migrate from a wound healing assay highlighted that the negative impact of microporosity on C166 is of chemical origin, and is due to a reduction in soluble calcium in cell's surrounding fluids (culture medium). This was validated by modeling this phenomenon by varying the calcium concentration in the culture medium.

This work, conducted with an endothelial cell line alone, aimed to demonstrate the influence of bioceramic surface properties, specifically on the cells responsible for biomaterial vascularization. This made it possible to demonstrate that C166 endothelial cells are sensitive to microporosity. There are probably multiple mechanisms of action: (i) by increasing roughness; (ii) by entrapping calcium from the culture medium, creating an artificial situation of calcium depletion; and (iii) by potentially increasing the protein absorption from the culture medium, microporosity affects the availability of angiogenic factors contained in the close environment of the cells. These findings are very important for the understanding and the rationalization of research on the design of bioceramics in order to increase their biological properties. They underline the importance of understanding the phenomenon occurring at the interface between cells and biomaterials, and show that each chemical or physical parameter is sensed by cells and may interfere with the expected result.

This study also highlights an important bias of 2D *in vitro* static experimentation that must be taken of account in the design of future experiments. Thus, the 3D dynamic culture conditions we are currently implementing will be highly informative regarding the conclusions raised here.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jfb14090460/s1>, Figure S1: In situ expression of MMP-9 in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets; Figure S2: In situ expression of MMP-9 and VEGFR-2 as angiogenesis-related markers in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets (Scale bar: 200  $\mu$ m); Figure S3: In situ expression of MMP-9 and VEGFR-2 as angiogenesis-related markers in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets (Scale bar: 50  $\mu$ m); Figure S4: In situ visualization of C166 endothelial cells in fibrin gels (configuration 1); Figure S5: Ceramic pellets after immersion in complete culture medium for 7 days; Figure S6: Wound healing assay performed for 48 h on C166 cell layers cultured in complete culture medium with various concentration of calcium.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.U., A.D., E.P. and A.M.; methodology, J.U., A.D., E.P. and A.M.; validation, É.C. and A.M.; formal analysis, J.U., A.D., É.R., A.A. and A.M.; investigation, J.U., A.D., E.P., É.R., A.A. and A.M.; writing—original draft preparation, J.U., A.D. and A.M.; writing—review and editing, J.U., É.C. and A.M.; visualization, É.C. and A.M.; supervision, J.B., É.C. and A.M.; project administration, A.M.; funding acquisition, É.C. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by French Research National Agency (ANR): project CharaBioC, ANR-19-CE08-0003-01 and by the laboratory of excellence LabEX SigmaLim (ANR-10-LABX-0074-01).

**Data Availability Statement:** All of the data presented in this work are available and accessible by contacting the corresponding author.

**Acknowledgments:** We would like to thank the university facilities CARMALIM (S. Blanchet, Y. Launay) and BISCEM for technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## References

- Blokhuis, T.J.; Arts, J.J.C. Bioactive and Osteoinductive Bone Graft Substitutes: Definitions, Facts and Myths. *Injury* **2011**, *42* (Suppl. 2), S26–S29. [\[CrossRef\]](#)
- Hou, X.; Zhang, L.; Zhou, Z.; Luo, X.; Wang, T.; Zhao, X.; Lu, B.; Chen, F.; Zheng, L. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 187. [\[CrossRef\]](#)
- Mercado-Pagán, Á.E.; Stahl, A.M.; Shanjani, Y.; Yang, Y. Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs. *Ann. Biomed. Eng.* **2015**, *43*, 718–729. [\[CrossRef\]](#)
- Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* **2011**, *9*, 66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Saran, U.; Gemini Piperni, S.; Chatterjee, S. Role of Angiogenesis in Bone Repair. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561*, 109–117. [\[CrossRef\]](#)
- Malhotra, A.; Habibovic, P. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 983–992. [\[CrossRef\]](#)
- Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Understanding of Dopant-Induced Osteogenesis and Angiogenesis in Calcium Phosphate Ceramics. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 594–605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, H.; Xue, K.; Kong, N.; Liu, K.; Chang, J. Silicate Bioceramics Enhanced Vascularization and Osteogenesis through Stimulating Interactions between Endothelial Cells and Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3803–3818. [\[CrossRef\]](#)
- Li, H.; Chang, J. Stimulation of Proangiogenesis by Calcium Silicate Bioactive Ceramic. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5379–5389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, H.; Chang, J. Bioactive Silicate Materials Stimulate Angiogenesis in Fibroblast and Endothelial Cell Co-Culture System through Paracrine Effect. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6981–6991. [\[CrossRef\]](#)
- Zhai, W.; Lu, H.; Chen, L.; Lin, X.; Huang, Y.; Dai, K.; Naoki, K.; Chen, G.; Chang, J. Silicate Bioceramics Induce Angiogenesis during Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 341–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Szurkowska, K.; Kolmas, J. Hydroxyapatites Enriched in Silicon–Bioceramic Materials for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2017**, *27*, 401–409. [\[CrossRef\]](#)
- Casarrubios, L.; Gómez-Cerezo, N.; Sánchez-Salcedo, S.; Feito, M.J.; Serrano, M.C.; Saiz-Pardo, M.; Ortega, L.; de Pablo, D.; Díaz-Güemes, I.; Fernández-Tomé, B.; et al. Silicon Substituted Hydroxyapatite/VEGF Scaffolds Stimulate Bone Regeneration in Osteoporotic Sheep. *Acta Biomater.* **2020**, *101*, 544–553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ratnayake, J.T.B.; Mucalo, M.; Dias, G.J. Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration: A Review of Current Trends: Substituted HA for Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 1285–1299. [\[CrossRef\]](#)
- Šupová, M. Substituted Hydroxyapatites for Biomedical Applications: A Review. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 9203–9231. [\[CrossRef\]](#)
- Bohner, M. Silicon-Substituted Calcium Phosphates—A Critical View. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6403–6406. [\[CrossRef\]](#)
- Dashnyam, K.; El-Fiqi, A.; Buitrago, J.O.; Perez, R.A.; Knowles, J.C.; Kim, H.-W. A Mini Review Focused on the Proangiogenic Role of Silicate Ions Released from Silicon-Containing Biomaterials. *J. Tissue Eng.* **2017**, *8*, 204173141770733. [\[CrossRef\]](#)
- Gallo, M.; Tadier, S.; Meille, S.; Chevalier, J. Resorption of Calcium Phosphate Materials: Considerations on the in Vitro Evaluation. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2018**, *38*, 899–914. [\[CrossRef\]](#)
- Rouahi, M.; Gallet, O.; Champion, E.; Dentzer, J.; Hardouin, P.; Anselme, K. Influence of Hydroxyapatite Microstructure on Human Bone Cell Response. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78A*, 222–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hing, K.A.; Annaz, B.; Saeed, S.; Revell, P.A.; Buckland, T. Microporosity Enhances Bioactivity of Synthetic Bone Graft Substitutes. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16*, 467–475. [\[CrossRef\]](#)
- Faia-Torres, A.B.; Guimond-Lischer, S.; Rottmar, M.; Charnley, M.; Goren, T.; Maniura-Weber, K.; Spencer, N.D.; Reis, R.L.; Textor, M.; Neves, N.M. Differential Regulation of Osteogenic Differentiation of Stem Cells on Surface Roughness Gradients. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9023–9032. [\[CrossRef\]](#)
- Gariboldi, M.I.; Best, S.M. Effect of Ceramic Scaffold Architectural Parameters on Biological Response. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 151. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, J.; Luo, X.; Barbieri, D.; Barradas, A.M.C.; de Bruijn, J.D.; van Blitterswijk, C.A.; Yuan, H. The Size of Surface Microstructures as an Osteogenic Factor in Calcium Phosphate Ceramics. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3254–3263. [\[CrossRef\]](#)
- Magnaudeix, A. Calcium Phosphate Bioceramics: From Cell Behavior to Chemical-Physical Properties. *Front. Biomater. Sci.* **2022**, *1*, 942104. [\[CrossRef\]](#)

25. Ziebart, T.; Schnell, A.; Walter, C.; Kämmerer, P.W.; Pabst, A.; Lehmann, K.M.; Ziebart, J.; Klein, M.O.; Al-Nawas, B. Interactions between Endothelial Progenitor Cells (EPC) and Titanium Implant Surfaces. *Clin. Oral Investig.* **2013**, *17*, 301–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. An, N.; Schedle, A.; Wieland, M.; Andrukhov, O.; Matejka, M.; Rausch-Fan, X. Proliferation, Behavior, and Cytokine Gene Expression of Human Umbilical Vascular Endothelial Cells in Response to Different Titanium Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *93A*, 364–372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Li, T.; Peng, M.; Yang, Z.; Zhou, X.; Deng, Y.; Jiang, C.; Xiao, M.; Wang, J. 3D-Printed IFN- $\gamma$ -Loading Calcium Silicate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffold Sequentially Activates M1 and M2 Polarization of Macrophages to Promote Vascularization of Tissue Engineering Bone. *Acta Biomater.* **2018**, *71*, 96–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Magnaudeix, A.; Usseglio, J.; Lasgorceix, M.; Lalloue, F.; Damia, C.; Brie, J.; Pascaud-Mathieu, P.; Champion, E. Quantitative Analysis of Vascular Colonisation and Angio-Conduction in Porous Silicon-Substituted Hydroxyapatite with Various Pore Shapes in a Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model. *Acta Biomater.* **2016**, *38*, 179–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Prakasam, M.; Locs, J.; Salma-Ancane, K.; Loca, D.; Largeteau, A.; Berzina-Cimdina, L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6*, 1099–1140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Blair, H.C.; Larrouture, Q.C.; Li, Y.; Lin, H.; Beer-Stoltz, D.; Liu, L.; Tuan, R.S.; Robinson, L.J.; Schlesinger, P.H.; Nelson, D.J. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2017**, *23*, 268–280. [\[CrossRef\]](#)
31. Rytlewski, J.A.; Alejandra Aldon, M.; Lewis, E.W.; Suggs, L.J. Mechanisms of Tubulogenesis and Endothelial Phenotype Expression by MSCs. *Microvasc. Res.* **2015**, *99*, 26–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* **2011**, *146*, 873–887. [\[CrossRef\]](#)
33. Iruela-Arispe, M.L.; Beitel, G.J. Tubulogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **2013**, *140*, 2851–2855. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Wang, S.-J.; Greer, P.; Auerbach, R. Isolation and Propagation of Yolk-Sac-Derived Endothelial Cells from a Hypervascular Transgenic Mouse Expressing a Gain-of-FunctionFPS/FES Proto-Oncogene. *Vitr. Cell. Dev. Biol.-Animal* **1996**, *32*, 292–299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Raynaud, S.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Thomas, P. Calcium Phosphate Apatites with Variable Ca/P Atomic Ratio I. Synthesis, Characterisation and Thermal Stability of Powders. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1065–1072. [\[CrossRef\]](#)
36. Palard, M.; Combes, J.; Champion, E.; Foucaud, S.; Rattner, A.; Bernache-Assollant, D. Effect of Silicon Content on the Sintering and Biological Behaviour of Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6-x</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>x</sub>(OH)<sub>2-x</sub> Ceramics. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1223–1232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Palard, M.; Champion, E.; Foucaud, S. Synthesis of Silicated Hydroxyapatite Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6-x</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>x</sub>(OH)<sub>2-x</sub>. *J. Solid State Chem.* **2008**, *181*, 1950–1960. [\[CrossRef\]](#)
38. Marchat, D.; Zymelka, M.; Coelho, C.; Gremillard, L.; Joly-Pottuz, L.; Babonneau, F.; Esnouf, C.; Chevalier, J.; Bernache-Assollant, D. Accurate Characterization of Pure Silicon-Substituted Hydroxyapatite Powders Synthesized by a New Precipitation Route. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6992–7004. [\[CrossRef\]](#)
39. Drouet, C.; Aufray, M.; Rollin-Martinet, S.; Vandecandelaère, N.; Grosse, D.; Rossignol, F.; Champion, E.; Navrotsky, A.; Rey, C. Nanocrystalline Apatites: The Fundamental Role of Water. *Am. Miner.* **2018**, *103*, 550–564. [\[CrossRef\]](#)
40. Fernández, E.; Gil, F.J.; Ginebra, M.P.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A.; Best, S.M. Calcium Phosphate Bone Cements for Clinical Applications. Part I: Solution Chemistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 169–176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Marchat, D.; Champion, E. Ceramic Devices for Bone Regeneration. In *Advances in Ceramic Biomaterials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 279–311, ISBN 978-0-08-100881-2.
42. Costa, D.O.; Prowse, P.D.H.; Chrones, T.; Sims, S.M.; Hamilton, D.W.; Rizkalla, A.S.; Dixon, S.J. The Differential Regulation of Osteoblast and Osteoclast Activity by Surface Topography of Hydroxyapatite Coatings. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7215–7226. [\[CrossRef\]](#)
43. Zhai, W.; Lu, H.; Wu, C.; Chen, L.; Lin, X.; Naoki, K.; Chen, G.; Chang, J. Stimulatory Effects of the Ionic Products from Ca–Mg–Si Bioceramics on Both Osteogenesis and Angiogenesis in Vitro. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 8004–8014. [\[CrossRef\]](#)
44. Wang, X.; Gao, L.; Han, Y.; Xing, M.; Zhao, C.; Peng, J.; Chang, J. Silicon-Enhanced Adipogenesis and Angiogenesis for Vascularized Adipose Tissue Engineering. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1800776. [\[CrossRef\]](#)
45. Mao, L.; Xia, L.; Chang, J.; Liu, J.; Jiang, L.; Wu, C.; Fang, B. The Synergistic Effects of Sr and Si Bioactive Ions on Osteogenesis, Osteoclastogenesis and Angiogenesis for Osteoporotic Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2017**, *61*, 217–232. [\[CrossRef\]](#)
46. Šalandová, M.; Hengel, I.A.J.; Apachitei, I.; Zadpoor, A.A.; Eerden, B.C.J.; Fratila-Apachitei, L.E. Inorganic Agents for Enhanced Angiogenesis of Orthopedic Biomaterials. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2002254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Zhao, C.; Wang, X.; Gao, L.; Jing, L.; Zhou, Q.; Chang, J. The Role of the Micro-Pattern and Nano-Topography of Hydroxyapatite Bioceramics on Stimulating Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Acta Biomater.* **2018**, *73*, 509–521. [\[CrossRef\]](#)
48. Skoog, S.A.; Kumar, G.; Narayan, R.J.; Goering, P.L. Biological Responses to Immobilized Microscale and Nanoscale Surface Topographies. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 33–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Khang, D.; Choi, J.; Im, Y.-M.; Kim, Y.-J.; Jang, J.-H.; Kang, S.S.; Nam, T.-H.; Song, J.; Park, J.-W. Role of Subnano-, Nano- and Submicron-Surface Features on Osteoblast Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5997–6007. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Ross, C.; Boroviak, T.E. Origin and Function of the Yolk Sac in Primate Embryogenesis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3760. [\[CrossRef\]](#)
51. Lu, L.S.; Wang, S.J.; Auerbach, R. 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. USA* **1996**, *93*, 14782–14787. [\[CrossRef\]](#)

52. Maes, C.; Goossens, S.; Bartunkova, S.; Drogat, B.; Coenegrachts, L.; Stockmans, I.; Moermans, K.; Nyabi, O.; Haigh, K.; Naessens, M.; et al. Increased Skeletal VEGF Enhances  $\beta$ -Catenin Activity and Results in Excessively Ossified Bones. *EMBO J.* **2010**, *29*, 424–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lan Levengood, S.K.; Poellmann, M.J.; Clark, S.G.; Ingram, D.A.; Yoder, M.C.; Wagoner Johnson, A.J. Human Endothelial Colony Forming Cells Undergo Vasculogenesis within Biphasic Calcium Phosphate Bone Tissue Engineering Constructs. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 4222–4228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Peters, E.B. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Laitinen, P.; Väänänen, M.-A.; Kolari, I.-L.; Mäkinen, P.I.; Kaikkonen, M.U.; Weinberg, M.S.; Morris, K.V.; Korhonen, P.; Malm, T.; Ylä-Herttua, S.; et al. Nuclear MicroRNA-466c Regulates Vegfa Expression in Response to Hypoxia. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0265948. [[CrossRef](#)]
56. Yoon, K.-A.; Cho, H.-S.; Shin, H.-I.; Cho, J.-Y. Differential Regulation of CXCL5 by FGF2 in Osteoblastic and Endothelial Niche Cells Supports Hematopoietic Stem Cell Migration. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 3391–3402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Liu, Y.; Yang, Q.; Wang, Y.; Lin, M.; Tong, Y.; Huang, H.; Yang, C.; Wu, J.; Tang, B.; Bai, J.; et al. Metallic Scaffold with Micron-Scale Geometrical Cues Promotes Osteogenesis and Angiogenesis via the ROCK/Myosin/YAP Pathway. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 3498–3514. [[CrossRef](#)]
58. Chen, Y.; Wang, J.; Zhu, X.D.; Tang, Z.R.; Yang, X.; Tan, Y.F.; Fan, Y.J.; Zhang, X.D. Enhanced Effect of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Phase on Neovascularization of Porous Calcium Phosphate Ceramics: In Vitro and in vivo Evidence. *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 435–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ritz, U.; Götz, H.; Baranowski, A.; Heid, F.; Rommens, P.M.; Hofmann, A. Influence of Different Calcium Phosphate Ceramics on Growth and Differentiation of Cells in Osteoblast-Endothelial Co-Cultures: Influence of Different Calcium Phosphate Ceramics on Cells. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 1950–1962. [[CrossRef](#)]
60. Chappell, H.F.; Jugdaohsingh, R.; Powell, J.J. Physiological Silicon Incorporation into Bone Mineral Requires Orthosilicic Acid Metabolism to  $\text{SiO}_4^{4-}$ . *J. R. Soc. Interface* **2020**, *17*, 20200145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Jugdaohsingh, R.; Tucker, K.L.; Qiao, N.; Cupples, L.A.; Kiel, D.P.; Powell, J.J. Dietary Silicon Intake Is Positively Associated with Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *19*, 297–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Nielsen, F.H. Update on the Possible Nutritional Importance of Silicon. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2014**, *28*, 379–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Martin, K.R. The Chemistry of Silica and Its Potential Health Benefits. *J. Nutr. Health Aging* **2007**, *11*, 94–97.
64. Ratcliffe, S.; Jugdaohsingh, R.; Vivancos, J.; Marron, A.; Deshmukh, R.; Ma, J.F.; Mitani-Ueno, N.; Robertson, J.; Wills, J.; Boekschoten, M.V.; et al. Identification of a Mammalian Silicon Transporter. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2017**, *312*, C550–C561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Carneau, A.P.; Carpentier, G.A.; Marcoux, A.-A.; Frenette-Cotton, R.; Simard, C.F.; Rémus-Borel, W.; Caron, L.; Jacob-Wagner, M.; Noël, M.; Powell, J.J.; et al. Aquaporins Mediate Silicon Transport in Humans. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chinnathambi, S.; Chen, S.; Ganesan, S.; Hanagata, N. Silicon Quantum Dots for Biological Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 10–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lerner, T.; Liljenqvist, U. Silicate-Substituted Calcium Phosphate as a Bone Graft Substitute in Surgery for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Eur. Spine J.* **2013**, *22*, 185–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bolger, C.; Jones, D.; Czop, S. Evaluation of an Increased Strut Porosity Silicate-Substituted Calcium Phosphate, SiCaP EP, as a Synthetic Bone Graft Substitute in Spinal Fusion Surgery: A Prospective, Open-Label Study. *Eur. Spine J.* **2019**, *28*, 1733–1742. [[CrossRef](#)]
69. Morin, K.T.; Tranquillo, R.T. In Vitro Models of Angiogenesis and Vasculogenesis in Fibrin Gel. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 2409–2417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Moccia, F.; Negri, S.; Shekha, M.; Faris, P.; Guerra, G. Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: Just What It Takes to Make a Blood Vessel. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3962. [[CrossRef](#)]
71. Fiorio Pla, A.; Munaron, L. Functional Properties of Ion Channels and Transporters in Tumour Vascularization. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Andrikopoulos, P.; Eccles, S.A.; Yaqoob, M.M. Coupling between the TRPC3 Ion Channel and the NCX1 Transporter Contributed to VEGF-Induced ERK1/2 Activation and Angiogenesis in Human Primary Endothelial Cells. *Cell. Signal.* **2017**, *37*, 12–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Materials

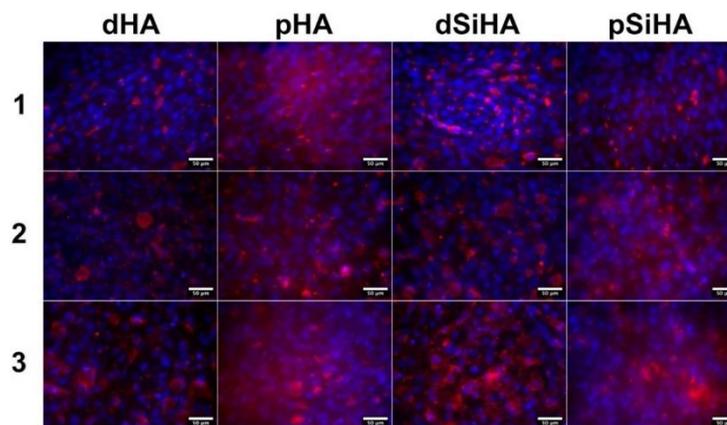
## Microporous Hydroxyapatite-Based Ceramics Alter the Physiology of Endothelial Cells through Physical and Chemical Cues

Julie Usseglio †, Adeline Dumur †, Esther Pagès, Émeline Renaudie, Alice Abélanet, Joël Brie, Éric Champion and Amandine Magnaudeix \*

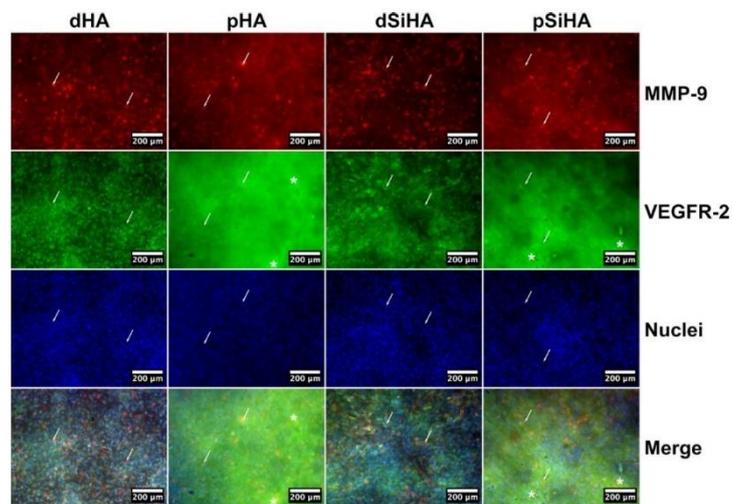
Institut de Recherche sur les Céramiques, UMR 7315, CNRS, Université de Limoges, F-87000 Limoges, France; julie.usseglio-grosso@unilim.fr (J.U.); adeline.dumur@etu.unilim.fr (A.D.); esther.pages@unilim.fr (E.P.); emeline.renaudie@unilim.fr (É.R.); alice.grenier-abelanet@unilim.fr (A.A.); joel.brie@unilim.fr (J.B.); eric.champion@unilim.fr (É.C.)

\* Correspondence: amandine.magnaudeix@unilim.fr; Tel.: +33-5-87-50-24-43

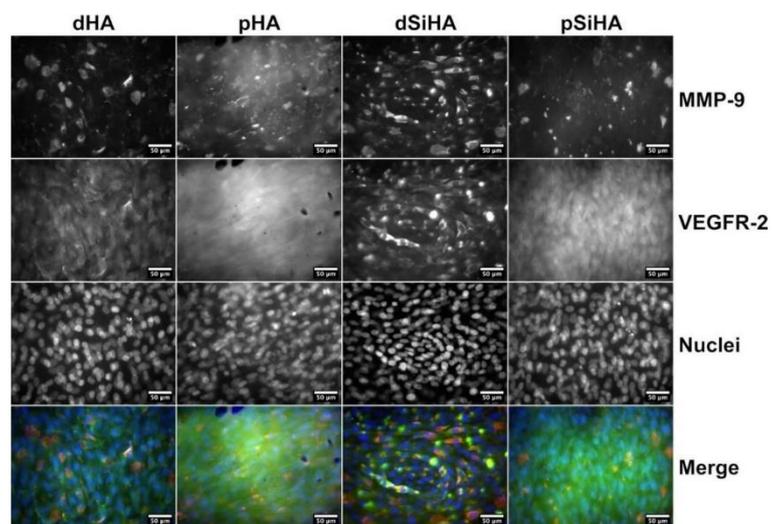
† These authors contributed equally to this work.



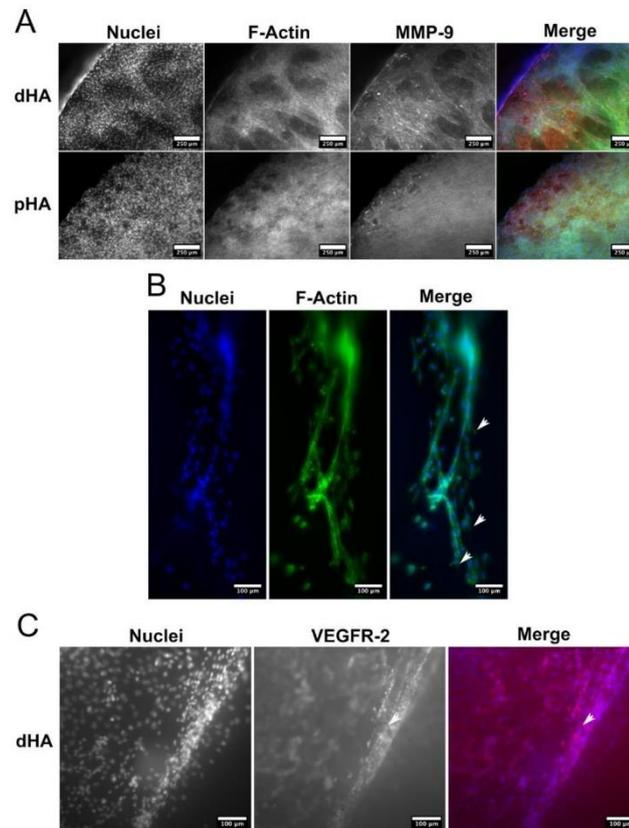
**Figure S1.** In situ expression of MMP-9 in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets after immunofluorescence staining. 1, 2 and 3 represent three independent experiments. Scale bar: 50  $\mu$ m.



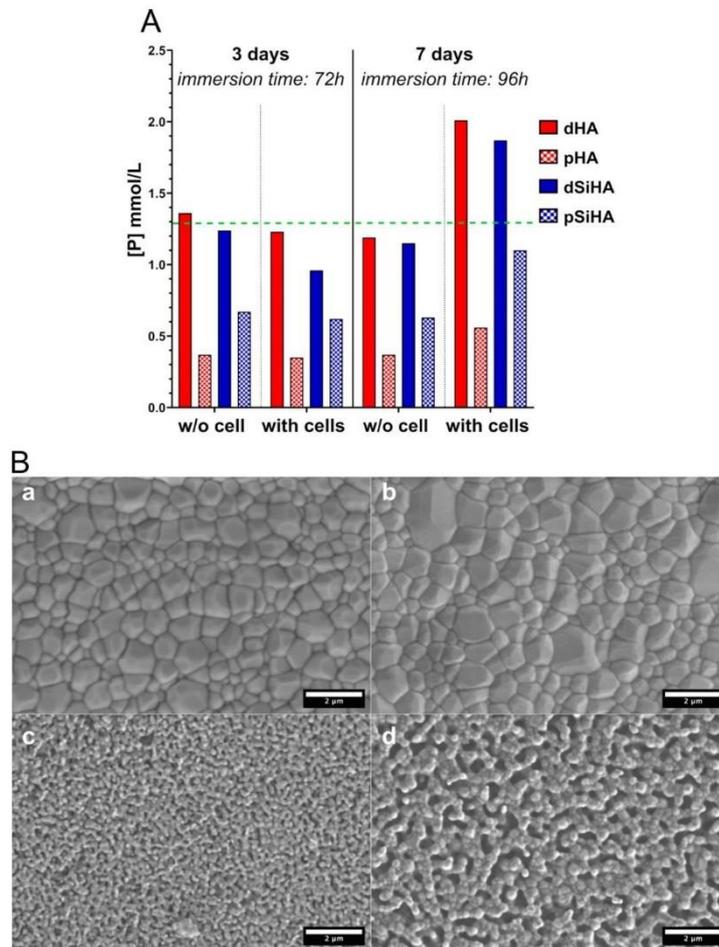
**Figure S2.** In situ expression of MMP-9 (red) and VEGFR-2 (green) as angiogenesis related-markers in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets after immunofluorescence staining. False colors were applied by post-processing of microscopy images. Nuclei were stained by Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 200 µm.



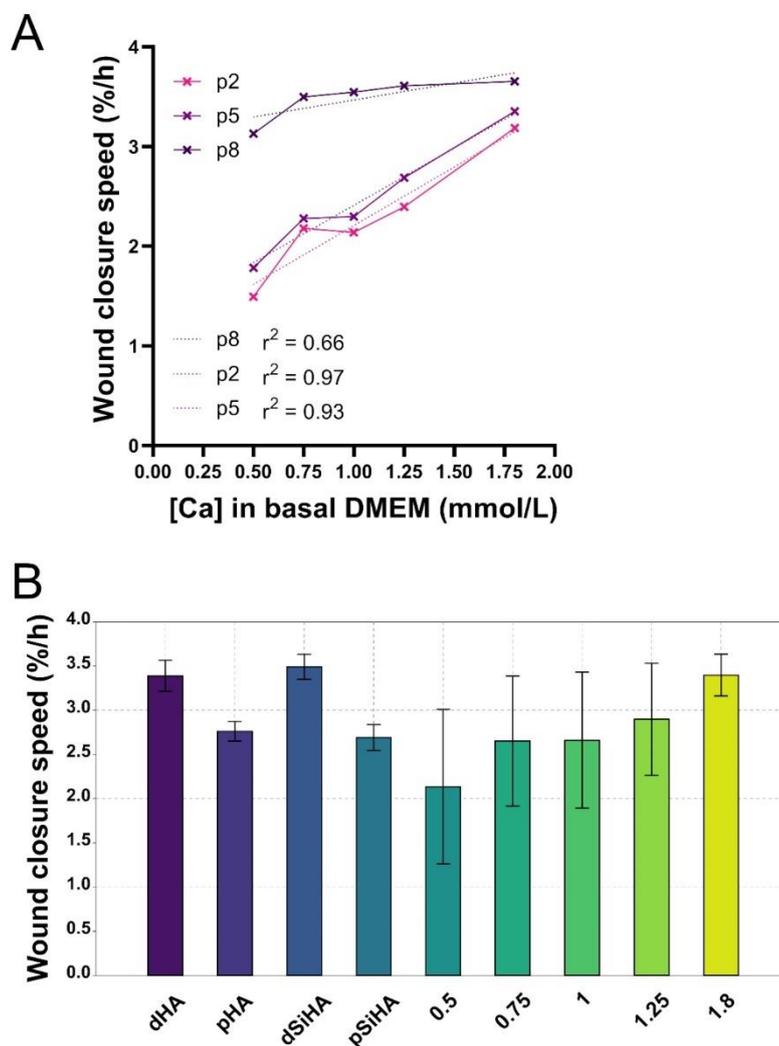
**Figure S3.** In situ expression of MMP-9 and VEGFR-2 as angiogenesis related-markers in C166 endothelial cells cultured on HA-based ceramic pellets after immunofluorescence staining. Scale bar: 50 µm.



**Figure S4.** In situ visualization of C166 endothelial cells in fibrin gels (configuration 1). (A). Comparison of F-Actin (green) stained using phalloidin conjugated to DyLight 488 and MMP-9 (red) stained by immunofluorescence on dHA and pHA surface. Scale bar: 250 µm. (B). Tubule-like structures on the surface of dSiHA. Arrows point out cells with a tip-cell morphology. Scale bar: 100 µm. (C). VEGFR-2 immunostaining of endothelial cells on dHA surface. Scale bar: 100 µm.



**Figure S5.** Ceramics pellets after immersion in complete culture medium for 7 days. **(A).** Phosphorus concentration in culture medium after immersion of ceramics with or without C166 cells, dosed by ICP-OES. The green line materializes the concentration of phosphorus measured in the complete culture medium alone. **(B).** Surface of ceramics in environmental scanning electron microscopy after immersion in complete culture medium for 7 days with a medium renewal after 3 days. Scale bar: 2 μm.



**Figure S6.** Wound healing assay performed for 48h on C166 cell layers cultured in complete culture medium with various concentration of calcium. (A). Wound closure speed according to the calcium concentration in the complete culture medium and the cell passage number.  $r^2$  is the correlation coefficient to qualify the linearity of the relationship between closure speed and calcium concentration. (B). Comparison of the wound closure speed, calculated during the first 24h at the surface of ceramics or in complete culture medium with different calcium concentrations given in mmol/L in basal DMEM (n= 3 independent experiments).

Parmi les stratégies visant à améliorer la vascularisation des architectures pour la médecine régénérative osseuse, l'incorporation d'ions silicates (dopage au silicium) et la modification de leur microporosité semblent particulièrement intéressantes. La réponse des cellules endothéliales, acteurs de la vascularisation, aux signaux chimiques et physiques des surfaces des biomatériaux est peu documentée, bien qu'essentielle. L'objectif de ce travail était de caractériser *in vitro* la réponse d'une lignée de cellules endothéliales, C166, cultivées à la surface de CPC variant soit en termes de composition chimique (HA versus SiHA), soit en termes de microstructure (dense versus microporeux).

L'adhésion, l'activité métabolique et la prolifération à 24h ont été significativement altérées sur les céramiques microporeuses, mais la sécrétion du VEGF-A pro-angiogénique a augmenté de manière significative sur les céramiques poreuses par rapport aux céramiques denses de SiHA après 168 h.

Un essai de tubulogenèse a été modélisé directement sur les céramiques. Deux configurations ont été conçues pour distinguer l'influence de la composition chimique de celle des propriétés physiques de la surface. Des structures tubulaires ont été observées à la surface des CPC. Elles étaient qualitativement plus fréquentes sur les céramiques denses. Il a également été observé des cellules avec des morphologies de type « tip-s cells », ce qui suggère un processus proche de celui de l'angiogenèse. Il n'a pas été noté de différence en fonction des deux configurations. Le mécanisme par lequel la céramique affecte le comportement des cellules passe par les paramètres physiques de surface associés à la microstructure, mais il est possible que le signal final soit de nature chimique. Pour déterminer si cela est le cas, une comparaison des milieux conditionnés a été effectuée. Les céramiques microporeuses ont induit un appauvrissement en calcium dans le milieu de culture, ce qui est délétère pour le C166. Il est important de noter que cet effet pourrait être associé à la culture cellulaire statique *in vitro*.

Enfin, des tests de fermeture de lésion du tapis cellulaire ont démontré que la microporosité avait une influence négative sur l'activité migratoire et proliférative des cellules endothéliales C166 par le biais d'un mécanisme chimique, conséquence de la diminution du taux de calcium en solution dans le milieu de dissolution des CPC poreuses.

Aucune influence du dopage au silicium de l'HA sur le comportement des C166 n'a été détectée.

### Chapitre III. Co-cultures cellules endothéliales – cellules ostéogéniques

---

Cette partie de notre travail consistait à établir et valider un modèle biologique de co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques *in vitro* permettant l'évaluation de propriétés biologiques des matériaux. Cela nous a notamment conduit à dégager un ratio cellules endothéliales / cellules ostéogéniques efficace pour permettre au mieux l'angiogenèse et l'ostéogenèse *in vitro*.

Les expérimentations et résultats exposés dans ce chapitre s'intègre dans les tâches 1,2,3 et 4 « Mise en place des modèles et évaluation biologiques » du 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), mené par l'équipe « Biocéramiques » de l'Institut de recherche sur les céramiques (IRCER).

L'objectif était d'établir *in vitro* un modèle cellulaire caractéristique du microenvironnement osseux défini par l'identification de structures tissulaires spécifiques, principalement une matrice extracellulaire minéralisée et des cellules endothéliales organisées en tubules.

#### III.1. Nécessité d'une co-culture cellules endothéliales - cellules ostéogéniques pour soutenir la croissance vasculaire

Pour se développer lors de l'angiogenèse, les cellules endothéliales nécessitent un support de cellules stromales, qui, par communication entre cellules, guident et favorisent l'invasion vasculaire. Cela est indispensable pour développer de nouveaux vaisseaux qui puissent croître et envahir le matériau. Les cellules endothéliales seules ne peuvent former que des structures vasculaires précoces ressemblant à des capillaires mais qui sont instables à long terme (16). Pour créer ce tissu stromal de soutien et permettre la croissance et le développement des vaisseaux au cœur du biomatériau, les cellules endothéliales ont besoin d'interagir avec d'autres types cellulaires. Ces phénomènes peuvent être évalués *in vitro* grâce à des modèles de co-cultures cellulaires.

Les cellules co-cultivées avec d'autres types de cellules peuvent produire des facteurs bioactifs qui permettent différents schémas de transmission de signal entre les cellules, favorisant les voies de signalisation endocrine, paracrine, autocrine et électrique et les effets directs qui dépendent du contact entre les cellules. Plusieurs études ont montré des effets synergiques en réponse à l'utilisation de systèmes de co-culture, qui ont la capacité d'induire la différenciation des cellules souches (307,343). D'une manière générale, les modèles de co-culture présentent de nombreux intérêts. Elle offre la possibilité de reproduire les interactions cellulaires telles qu'observées dans l'organisme vivant, permettant ainsi aux cellules de communiquer et de réagir entre elles de manière naturelle. La co-culture reproduit ainsi au mieux l'environnement physiologique. De plus, elle fournit une plateforme pour étudier les interactions entre différents types cellulaires. Cela peut aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à divers processus biologiques et pathologiques. En reproduisant les interactions entre différents types cellulaires, la co-culture *in vitro* pourrait contribuer à la modélisation des tissus et des organes humains, ouvrant ainsi la voie au développement de thérapies et de médicaments plus efficaces. Au final, la co-culture *in vitro* est un modèle biologique de fort intérêt en ingénierie tissulaire, offrant un moyen de modéliser et d'étudier les interactions cellules matériaux dans un environnement contrôlé, ce qui peut avoir des implications essentielles pour la compréhension des processus biologiques.

Dans la littérature, plusieurs types cellulaires ont été évalués en co-culture avec les cellules endothéliales. Les MSC, par leur potentiel de différenciation vers plusieurs lignées cellulaires, y compris les lignées vasculaires et endothéliales, ont été largement étudiées (344). Les MSC présentent les caractéristiques des cellules périvasculaires (péricytes), et peuvent ainsi contribuer à la stabilisation, à l'entretien et aux processus hémodynamiques des vaisseaux sanguins (345). En outre, il a été décrit que les MSC favorisent l'angiogenèse par le biais de mécanismes protéolytiques (346).

Dans le contexte d'évaluation des propriétés de biomatériaux destinés à la reconstruction osseuse, les cellules osseuses ont naturellement été proposées en tant que soutien des cellules endothéliales lors d'études *in vitro*. La co-culture de cellules à potentiel ostéogénique et angiogénique attire ainsi l'attention dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse (347). Les cellules ostéogéniques et les cellules endothéliales sont capables d'interagir entre elles, et leur interaction permet de promouvoir à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse (348).

Des travaux montrent qu'en co-culture avec des ostéoblastes, les cellules endothéliales survivent grâce à l'action des ostéoblastes, et notamment par leur sécrétion de VEGF et d'OPN (349). Cette dernière, sécrétée par les ostéoblastes mais également par les ostéoclastes, est un facteur anti-apoptotique pour les cellules endothéliales (350). De leur côté, les cellules endothéliales secrètent 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 dans le paragraphe 1.1.2.3.3. Le rôle des facteurs locaux (351,352). Herzog et al ont démontré que la co-culture d'ostéoblastes primaires et de cellules endothéliales influençait positivement la formation de vaisseaux et la réparation osseuse, ce qui était associé à une augmentation des niveaux de facteurs de croissance et de protéines d'origines différentes (353). La co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques favoriserait la minéralisation osseuse et la production de marqueurs ostéogéniques (phosphatase alcaline, collagène I, RUNX2) et endothéliaux (VEGF, CD31) en comparaison à une monoculture de cellules endothéliales ou de cellules ostéogéniques (354–356). Les ostéoblastes produisent des facteurs angiogéniques, tels que le VEGF, et les composants de la matrice extracellulaire osseuse, importants pour la différenciation des composants des vaisseaux ; à leur tour, ces facteurs stimulent les CE à produire des facteurs ostéogéniques, tels que la BMP-2 (357,358). La co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques favoriserait également la formation de structures de type micro-capillaires, stables (345,348). Dans les co-cultures de cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines (HDMEC) et de cellules ostéoblastiques humaines primaires (HOS) ou de la lignée cellulaire MG-63 de type ostéoblaste humain sur ces biomatériaux, un auto-assemblage tissulaire des cellules s'est produit avec le temps, les cellules endothéliales formant des structures de type microcapillaire contenant une lumière et présentant une forte expression de PECAM aux interfaces cellulaires. Ces structures de type microcapillaire étaient entrelacées entre les couches cellulaires des ostéoblastes et ne se sont pas formées lorsque des stimuli angiogéniques exogènes ont été ajoutés à ces co-cultures. La durée de vie des HDMEC a également été considérablement améliorée par la co-culture, les HDMEC étant présents pendant au moins 42 jours, alors que dans la monoculture, les cellules commençaient à mourir rapidement après une semaine sans passage. Ce système de co-culture peut s'appliquer à une stratégie de pré-vascularisation des biomatériaux avant leur implantation (351).

Dans le cadre de l'évaluation biologique et la validation des capacités d'un biomatériau à être efficacement revascularisé et/ou à promouvoir la vascularisation, des études *in vitro* en co-

cultures sur biomatériau semblent tout à fait pertinentes. La vascularisation du biomatériau dans la reconstruction osseuse est en effet essentielle et sert de support à l'ostéogenèse et à l'ostéointégration de ce dernier. L'interaction entre les processus de vascularisation et d'ostéogenèse est ainsi primordiale. L'échec d'ostéointégration d'un biomatériau est généralement lié au manque de vascularisation de celui-ci. L'évaluation des interactions entre cellules endothéliales et cellules ostéogéniques *in vitro*, en co-culture sur les CPC, est donc intéressante à mener et peut fournir des indications importantes afin d'améliorer les propriétés des biomatériaux.

La co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques permet de promouvoir à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse. En favorisant la communication et les interactions entre les différents types cellulaires, elle reproduit au mieux l'environnement physiologique. Le modèle de co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques *in vitro* semble pertinent pour l'évaluation des propriétés angiogéniques et ostéogéniques des biomatériaux. Il permet notamment d'évaluer les réponses cellulaires spécifiques aux variations physico-chimiques de surface des matériaux.

### III.2. Hypothèses et objectifs de travail

Dans le cadre de notre travail sur l'optimisation de la vascularisation au sein des biomatériaux en céramiques, il nous a ainsi paru pertinent de valider un modèle *in vitro* de co-cultures de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques. Outre la sélection des types de cellules en co-culture (voir paragraphe IV.1. Discussion sur le choix des cellules), le rapport entre les différents types cellulaires dans le système de co-culture peut également influencer les caractéristiques, la survie et le comportement des cellules. Par conséquent, une notion importante porte sur le ratio idéal à utiliser en co-culture *in vitro* pour favoriser à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse. Cependant, dans la littérature, peu d'études systématiques évaluant les ratios cellulaires optimaux entre les cellules endothéliales et les cellules spécifiques des tissus (cellules osseuses ou autres) ont été rapportées. De nombreuses études ont évalué les aspects de co-culture, mais en choisissant des ratios plus ou moins de manière arbitraire. Les équipes ont choisi majoritairement un rapport cellulaire de 1:1. S'agit-il d'une question de simplicité plutôt que d'utiliser tout le potentiel des ratios disponibles ? L'effet des cellules co-cultivées à différents ratios a été étudié par Kim et al (359) pour déterminer le ratio idéal cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ASC) et HBMSC et par Ma et al (160) entre HUVEC et HBMSC. Pour optimiser le ratio de cellules co-cultivées, les différents tests doivent non seulement étudier la prolifération et la viabilité des cellules, mais aussi évaluer l'impact de ce ratio sur l'expression des gènes, la voie de transduction du signal correspondante et l'expression phénotypique souhaitée au sein du système de co-culture. Notre modèle de co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques *in vitro* doit promouvoir à la fois l'ostéogenèse et l'angiogenèse, de manière à refléter la réalité physiologique.

Une revue de la littérature sur les différents ratios cellules endothéliales / cellules ostéogéniques étudiés a été effectuée. Pour déterminer le ratio idéal, les auteurs prenaient principalement en compte l'activité de l'ALP, et, dans une moindre mesure, les niveaux d'expression des marqueurs endothéliaux. Les résultats de cette recherche sont synthétisés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Synthèse des différents ratios de co-cultures *in vitro* cellules endothéliales (CE) / cellules osseuses (CO) étudiés dans la littérature

Ratio CE/CO	1/1	2/1	1/2	5/1	1/5	3/7	10/1	3/2	2/3	4/1	1/9	4/6	3/1
Villars 2002 (360)		X	X										
Duffy 2009 (138)	X												
Xing 2013 (361)					X								
Ma 2011 (362)	X												
Liu 2015 (363)						X							
Kang 2013 (364)	X			X	X								
Zhang 2005 (365)			X										
Shah 2016 (366)				X			X						
Tae 2017 (367)	X	X	X										
Rao 2012 (368)	X			X	X			X	X				
Thein-Han 2013 (354)										X			
Aguirre2010 (369)	X												
Guerrero 2013 (370)	X									X			

LI 2013 (371)	X												
Pekozer 2016 (356)					X								
Kim 2013 (372)	X												
Lu 2018 (373)											X		
Kim 2014 (359)			X										
Melero-Martin2008 (374)												X	
Kook 2018 (345)													X
Liu 2019 (375)	X												
Böhrsen 2016 (376)				X									
Kaigler 2006 (377)	X												
Peng 2019 (378)			X										
Sadowska 2019 (379)			X										
Li 2019 (355)	X												X
Chen 2019 (380)									X				
Li 2014		X											
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Les données obtenues lors de cette revue de la littérature ont permis de définir les ratios à évaluer pour des tests préliminaires. Des monocultures de C166 et de MC3T3-E1 sc14 (cellules pré-ostéoblastiques de calvaria de souris), ainsi que des co-cultures de C166 : MC3T3-E1 sc14 à différents ratios ont été réalisées durant 7 jours : 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 3MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 4MC3T3-E1 sc14). Après marquages des noyaux au Hoescht 33342 (en bleu sur la **Figure 28**), du cytosquelette d'actine par la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 (vert) et de la phosphatase alcaline (rouge), une observation au microscope à épifluorescence a permis d'observer une organisation particulière en 3D avec formation d'une structure circulaire creuse, pour les ratios 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 3MC3T3-E1 sc14. Ce dernier ratio permettant d'obtenir des résultats semblables au ratio 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, il a été décidé de ne pas le retenir d'une part pour ne pas avoir des ratios trop déséquilibrés entre cellules endothéliales et cellules ostéogéniques, et d'autre part car, selon la littérature, les ratios présentant des cellules endothéliales plus abondantes semblent devoir être privilégiés (364,366).

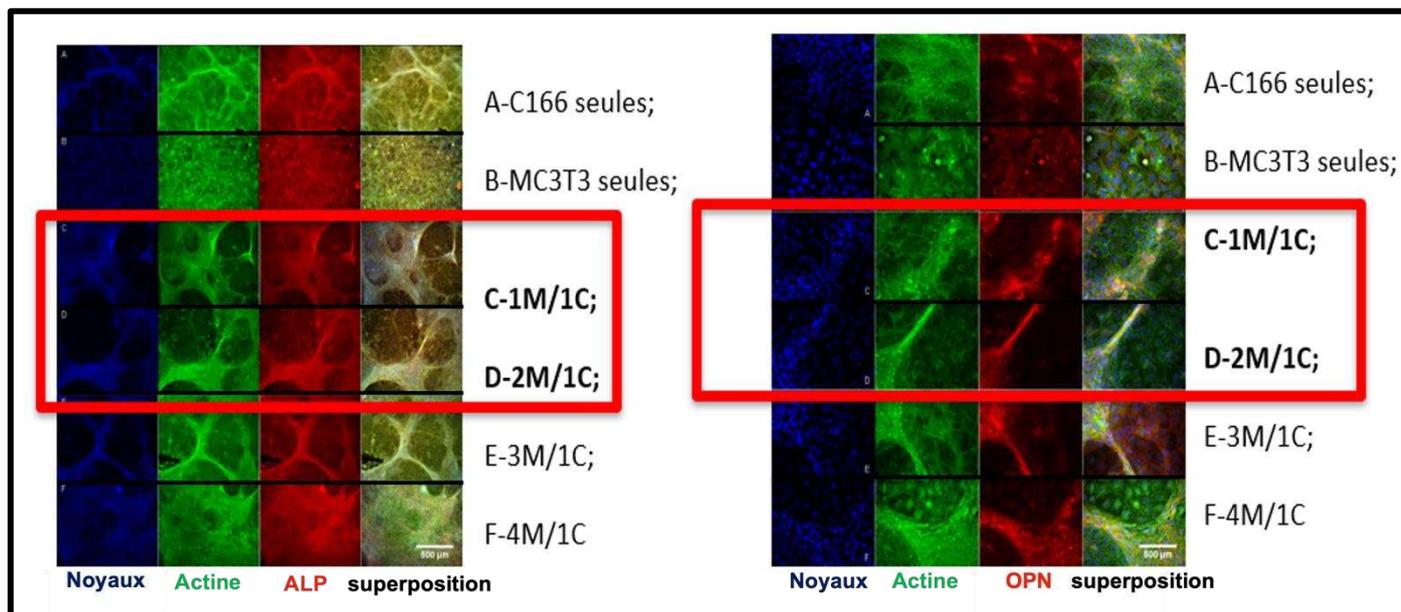


Figure 28 : Monoculture et co-culture de C166 (C) et de MC3T3-E1 sc14 (M) dans un gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoechst 33342 (bleu) ; marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine (vert) ; marquage de l'ALP (rouge) ; microscopie à épifluorescence grossissement – barres d'échelle : 500 µm.

Au final, il nous a donc semblé pertinent de retenir les trois ratios suivants pour l'évaluation des propriétés angiogéniques et ostéogéniques de nos CPC : 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14. En effet, le ratio 1 : 1 est celui le plus souvent cité et étudié dans la littérature. Les ratios 1 : 2 et 2 : 1, quant à eux, disposent d'une certaine pertinence. Ils sont également souvent cités dans la littérature, donnant des résultats reproductibles et informatifs. Ils favoriseraient des interactions optimales entre les deux types de cellules, particulièrement si une population cellulaire agit comme support ou fournit des facteurs de croissance à une autre, un ratio déséquilibré pourrait maximiser ces interactions bénéfiques. De plus, ils sont représentatifs de l'état physiologique (différents types cellulaires naturellement en ratio déséquilibré) que l'on cherche à modéliser *in vitro*. Ils restent tout de même équilibrés, en comparaison avec des ratios à 1 : 5 ou 5 : 1 pour lesquels un type

cellulaire pourrait dominer la culture et masquer les effets des interactions entre les deux types de cellules.

L'objectif principal de ce travail était d'établir et valider un modèle de co-culture *in vitro* de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques permettant l'évaluation pertinente de propriétés des biomatériaux. Cela nous a notamment conduit à analyser plus précisément les réponses biologiques de différents ratios cellules endothéliales / cellules ostéogéniques qui pourraient être les plus efficaces pour promouvoir au mieux l'angiogenèse et l'ostéogenèse *in vitro* : 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14, 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14.

### III.3. Matériel et méthodes

#### III.3.1. Céramiques phosphocalciques

Les matériaux évalués étaient les mêmes que ceux étudiés dans les expérimentations décrites au chapitre précédent, des céramiques à base d'hydroxyapatite pure ou dopées au silicium, denses ou microporeuses avec un taux de microporosité ouverte de 22% pour les pastilles poreuses d'HA pure et de 24% pour SiHA.

#### III.3.2. Cellules

##### III.3.2.1. Modèles cellulaires

Les deux lignées cellulaires évaluées en co-cultures étaient :

- la lignée de cellules endothéliales murines C166 (ATCC®, CRL-2581™), décrites dans Chapitre II Compréhension du comportement des cellules endothéliales aux variations physico-chimiques des CPC.

- une lignée de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 sous-clone 14 (ATCC®, CRL-2594™). Le sous-clone 14 de MC3T3-E1 fait partie d'une série de clones isolés à partir de la lignée cellulaire pré-ostéoblastique MC3T3-E1 issues de la calvaria de souriceaux nouveaux-nés sélectionné pour sa bonne capacité de différenciation. Cette lignée est un modèle adapté pour l'étude *in vitro* de la différenciation des ostéoblastes et de leur réponses cellulaires (381).

Les cellules C166 étaient cultivées dans un milieu à base de 445 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 4,5 g/L de D-glucose (Gibco), supplémenté avec 10%<sub>v/v</sub> serum de veau fœtal (SVF, ThermoFisher) et des antibiotiques : mélange de pénicilline (50 UI/mL) et de streptomycine (50 µg/mL) (Gibco).

Les cellules MC3T3-E1 sc14 étaient cultivées dans un milieu à base de 445 mL de MEMα (Minimum Essential Medium α) (Gibco) sans acide ascorbique, 10%<sub>v/v</sub> de SVF (ThermoFisher) et 5 mL d'un mélange de pénicilline (50 UI/mL) et de streptomycine (50 µg/mL) (Gibco).

Les milieux de culture ainsi supplémentés seront par la suite appelés milieux complets.

##### III.3.2.2. Routine d'entretien des cellules

Lorsque les cellules avaient atteint environ 85% de confluence, le surnageant était jeté et les cellules rincées au PBS 1X (phosphate buffered saline, Gibco) à trois reprises. Les cellules étaient alors recouvertes d'une solution de dissociation Tryple 1X (Gibco) et placées dans l'incubateur à 37°C pendant 5 minutes environ, jusqu'à ce que la totalité des cellules soient détachées du support et donc en suspension et après vérification au microscope optique

inversé. L'action du Tryple était alors inhibée par l'ajout de milieu de culture complet. Le milieu cellulaire était ensuite placé en centrifugation à 20°C, à 300 g pendant 5 minutes. Le surnageant était jeté et les cellules remises en suspension avec 1 mL de milieu de culture complet. Les cellules viables étaient comptées sur lame de Malassez après coloration au bleu Trypan 0,4%.

Le **Tableau 5** présente le temps de culture et la concentration cellulaire pour chaque test de co-culture réalisé.

Tableau 5 : Temps de culture et densité cellulaire à l'ensemencement (en cellules/cm<sup>2</sup>) en fonction du test réalisé

Test réalisé	Temps de culture en jours	Densité cellulaire totale (cellules/cm <sup>2</sup> )
Prolifération EdU	1	25 000
Wound healing assay	1+48h	25 000
Immunofluorescences / tubulogénèse	7	25 000
Rouge Alizarine	7	20 000
Activité de la phosphatase alcaline	7	20 000
Dosage du VEGF par ELISA	7	20 000
RTqPCR	7	20 000

### III.3.3. Etude *in vitro* d'un modèle de co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques

#### III.3.3.1. Les conditions

Six conditions ont été évaluées :

- une monoculture de C166, contrôle négatif, cultivée dans du DMEM complet
- une monoculture de MC3T3-E1 sc14, contrôle négatif, cultivée dans du MEM $\alpha$  complet
- une monoculture C166 + VEGF, contrôle positif, cultivée dans du DMEM complet + VEGF165 recombinant humain (Peprotech) à 50 ng/mL
- une co-culture 2C166 : 1MC3T3-E1 sc 14
- une co-culture 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14
- une co-culture 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14

Pour ces trois dernières conditions, un mélange à quantités égales de DMEM complet et MEM $\alpha$  complet était utilisé.

Comme pour les expérimentations du Chapitre II, préalablement à l'ensemencement des cellules, les pastilles étaient immergées en milieu de culture afin d'atteindre un régime d'équilibre chimique entre le milieu et la surface du matériau. Pour cela, chaque pastille était placée dans un puits de plaque de culture (SARSTEDT, plaque 24 puits) puis recouverte par 1mL de milieu (choisi en fonction de la condition) durant 1h à 37°C.

### III.3.3.2. Étude de la prolifération cellulaire par incorporation d'EdU

L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) est un analogue nucléosidique de la thymidine qui est incorporé à l'ADN pendant la phase de synthèse active de l'ADN au cours de la mitose (phase S). C'est donc un marqueur de cellules vivantes, en cours de prolifération. Il est mis en évidence par conjugaison à un fluorochrome contenant un groupement azide (AzideFluor488 (Sigma Aldrich) lors d'une réaction de liaison covalente spécifique catalysée par le cuivre (« réaction de chimie-click »).

Des lamelles de verre étaient disposées au fond des puits d'une plaque 24 puits préalablement à l'ensemencement des cellules des lignées C166 et MC3T3-E1 sc14 à la concentration désirée (**Tableau 5**). Les cellules étaient laissées en prolifération dans leur milieu de culture pendant 24h à l'incubateur.

1h avant la fin de l'incubation soit 23h après l'ensemencement, le milieu de culture était retiré. Les cellules étaient recouvertes de 1 mL de milieu de culture complet contenant 20  $\mu$ M d'EdU (ThermoFisher). A H24, les cellules étaient rincées 3 fois au PBS 1X (Gibco). Elles étaient ensuite fixées en les recouvrant de 1 mL de solution de paraformaldéhyde (PFA, Sigma Aldrich) dilué à 4% m/v en PBS pendant 15 minutes. Elles étaient rincées 3 fois au PBS 1X et à nouveau incubées dans une solution de Tris à 100 mM et à pH 7,6 pendant 10 minutes. Puis les membranes cytoplasmiques et nucléaires étaient perméabilisées par incubation des cellules dans une solution de Triton-X100 (ThermoFisher) 0,1%v/v dans du PBS 1X, pendant 15 minutes. Les cellules étaient rincées 3 fois au PBS 1X.

Le mélange réactionnel nécessaire pour la réaction de « chimie-click » était préparé extemporanément en mélangeant dans l'ordre pour 1 mL :

- 887,5  $\mu$ L de PBS 1X
- 10  $\mu$ L d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  à 200 mM
- 2,5  $\mu$ L d'Azidefluor 488 (Sigma Aldrich), un fluorochrome vert marquant l'EdU et donc les cellules en prolifération
- 100  $\mu$ L d'une solution aqueuse d'acide ascorbique à 200 mg/mL.

Ce mélange réactionnel était enfin déposé sur les cellules dans le noir à température ambiante pendant 30 minutes. Après 30 minutes, les cellules étaient rincées 3 fois au PBS 1X.

Ensuite, les cellules étaient incubées dans une solution de Hoechst 33342 (ThermoFisher) à 20  $\mu$ M dans du PBS 1X, dans le noir à température ambiante pendant 5 minutes. Le Hoechst 33342 est un marqueur nucléaire qui se fixe à l'ADN et permet de mettre en évidence le noyau de toutes les cellules (coloration bleue), qu'elles soient en prolifération ou non. Après ce marquage, les cellules étaient rincées 3 fois au PBS 1X. Puis, les lamelles de verre étaient alors retirées délicatement des puits, montées sur lame à l'aide de milieu de montage à base de Mowiol® (Sigma Aldrich). Les cellules étaient ensuite observées au microscope à épifluorescence (AxioImager M2, Carl Zeiss) aux grossissements X100 et X400 avec les filtres optiques adaptés. Des images (au moins 10 par échantillon) étaient acquises grâce à une caméra CCD (Carl Zeiss) pilotée par le logiciel Zen (Carl Zeiss). Les images étaient par la suite analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) permettant le calcul du pourcentage de prolifération cellulaire ainsi que la densité cellulaire.

### III.3.3.3. Etude de l'activité cellulaire par scratch-test (WHA : Wound Healing Assay)

Les C166 et les MC3T3-E1 sc14 étaient ensemencées à la concentration désirée dans une plaque 6 puits (**Tableau 5**). Les cellules étaient laissées en prolifération dans leur milieu de culture dans l'incubateur pendant toute la durée de la manipulation.

Après 48h de culture, les cellules étaient à confluence dans le puits permettant la réalisation d'une déchirure dans le tapis cellulaire et à suivre la recolonisation cellulaire de la zone lésée en fonction du temps et des différentes conditions par un suivi en microscopie. La déchirure était réalisée à l'aide d'un embout de micropipette de 1 mL au milieu du puits, d'une extrémité à l'autre.

Des photos étaient ensuite réalisées en microscopie, en lumière transmise (Axiomager M2, Carl Zeiss) à raison de 3 photographies par déchirure dans le tapis cellulaire, correspondant au temps H0. Des photos étaient à nouveau réalisées au microscope à fluorescence à raison de 3 photos par déchirure à H9 et à H24. La surface des déchirures étaient mesurées grâce au logiciel ImageJ.

### III.3.3.4. Étude de la tubulogénèse et de l'expression des marqueurs angiogéniques et ostéogéniques

Les gels de fibrine utilisés pour créer un environnement 3D pour l'étude de la tubulogénèse étaient les mêmes que ceux utilisés dans le Chapitre II.

Ils étaient constitués de 3 éléments à quantité égale : une solution à base de fibrinogène (MP Biomedicals), du milieu de culture (DMEM) complet et une solution à base de thrombine (Merck).

Pour la solution mère de fibrinogène, du fibrinogène bovin en poudre, coagulable à 90% était suspendu dans du PSB 1X à une concentration de 6 mg/mL. La solution était ensuite filtrée sur un filtre de PVDF d'une porosité de 0,22 µm (Millipore) monté sur seringue pour stérilisation de la solution.

Pour la solution mère de thrombine, de la thrombine bovine était suspendue dans de l'eau distillée ultrapure à une concentration de 250 U/mL. La solution était ensuite filtrée à 0,22 µm pour stérilisation de celle-ci. Une dilution au 1/10ème était ensuite effectuée dans de l'eau distillée ultrapure pour obtenir une solution de thrombine à 25 U/mL.

Les gels étaient coulés au fond des puits d'une plaque 24 puits, avec 250 µL de solution de fibrinogène mélangés à 250 µL de milieu de culture. Ce mélange était déposé délicatement dans chaque puits puis 250 µL de la solution finale de thrombine étaient ajoutés. Les gels étaient laissés 45 min dans l'incubateur à 37°C pour solidification. Les C166 et les MC3T3-E1 sc14 étaient alors ensemencées à la densité désirée directement sur le gel dans 1mL de milieu (**Tableau 5**). La plaque était placée dans l'incubateur à 37°C. Le milieu de culture était changé tous les 3 ou 4 jours.

Après 7 jours de culture, les cellules étaient rincées 2 fois 5 minutes au PBS 1X à 37°C pour éliminer le milieu de culture. Les étapes suivantes étaient similaires à celles de l'immunofluorescence sur pastilles réalisée dans le Chapitre II. Les cellules étaient recouvertes par 1 mL de PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante pour fixation. Pour l'anticorps (Ac) anti-PECAM (ThermoFisher), les cellules étaient fixées par 1mL de méthanol absolu à -20°C pendant 7 minutes à température ambiante, ces anticorps étant incompatibles avec le PFA. Les cellules étaient alors rincées 2 fois au PBS 1X pendant 5 minutes. Les

membranes cellulaires et nucléaires étaient ensuite perméabilisées au PBS/Triton 100X à 0,1%v/v ou au TBS/Tween 20 à 0,2% v/v (selon la localisation subcellulaire de la protéine ciblée) pendant 15 minutes à température ambiante. Après deux rinçages au PBS 1X pendant 5 minutes, les sites de fixation protéiques aspécifiques étaient saturés par une solution de PBS1X/BSA (Albumine sérique Bovine – BSA – Sigma Aldrich) à 3%v/v pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules étaient ensuite recouvertes de 500 µL d'une solution d'anticorps primaires, selon le marquage souhaité, pendant 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Elles étaient ensuite rincées 2 fois au PBS 1X pendant 5 minutes.

Puis, les cellules étaient recouvertes par la solution d'Ac secondaires pendant 1h à température ambiante dans le noir. Ces anticorps étaient couplés à un fluorochrome pour permettre leur visualisation et par conséquent celle de leurs cibles. Deux types d'Ac secondaires ont été utilisés selon l'espèce de production des Ac primaires à mettre en évidence et la longueur d'onde d'observation souhaitée :

-Immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline G de souris AlexaFluor® 488 nm fluorescent dans le vert ( $\lambda_{ex}$  : 495 nm,  $\lambda_{em}$  : 519 nm)

- Immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline G de lapin AlexaFluor® 594 nm fluorescent dans le rouge ( $\lambda_{ex}$  : 590 nm,  $\lambda_{em}$  : 617 nm)

On procédait à nouveau à 2 rinçages au PBS 1X pendant 5 minutes.

Alternativement, un marquage à la phalloïdine, marqueur de l'actine polymérisée, couplée à un fluorochrome (ici AlexaFluor 488) pouvait alors être réalisé en recouvrant les cellules d'une solution de phalloïdine (ThermoFisher)/PBS 1X à 1/300<sup>ème</sup> pendant 30 minutes à température ambiante dans le noir, avant un nouveau double rinçage au PBS 1X pendant 5 minutes.

Enfin, dans tous les cas, quel que soit le marqueur visualisé, un marquage des noyaux au Hoechst 33342 était réalisé en recouvrant les cellules d'une solution Hoescht 33342 / PBS 1X à 10 µM pendant 5 minutes à température ambiante dans le noir, avant un nouveau double rinçage au PBS 1X pendant 5 minutes. Les cellules étaient ensuite observées au microscope à épifluorescence, au microscope confocal (Nikon, plateforme BISCEM, US INSERM 42, UMS CNRS 2015) ou au microscope biphotonique (Olympus, plateforme PLATINOM, XLIM UMR CNRS 7252). Les photographies étaient analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Le **Tableau 6** récapitule les différents anticorps primaires et sondes fluorescentes utilisées pour l'évaluation du modèle de co-culture.

Tableau 6 : Anticorps primaires (espèces et dilution), en rouge les anticorps avec une cible endothéliale, en bleu les anticorps avec une cible ostéogénique. Sondes fluorescentes et leur dilution.

Anticorps primaires	Fournisseur	Espèce productrice de l'Ac	Dilution de l'Ac en PBS 1X
Ac anti-actine	Sigma-Aldrich	Souris	1/1000 <sup>ème</sup>
Ac anti-PECAM1 = anti-CD31	Santa Cruz	Souris	1/200 <sup>ème</sup>
Ac anti-MMP9	Sigma-Aldrich	Lapin	1/250 <sup>ème</sup>
Ac anti-collagène I	Thermo Fisher	Lapin	1/400 <sup>ème</sup>
Sondes fluorescentes	Fournisseur	Dilution	
Phalloïdine	Santa Cruz	1/300 <sup>ème</sup>	
Hoescht 33342	Thermo Fisher	1/1000 <sup>ème</sup>	

### III.3.3.5. Mesure de la minéralisation par le rouge alizarine

Les cellules endothéliales C166, ainsi que les cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 sc14 étaient ensemencées à la concentration désirée dans une plaque 6 puits selon les six conditions (**Tableau 5**).

Les cellules étaient cultivées pendant 7 jours avec changement du milieu à 3 ou 4 jours. Après 7 jours de culture, les cellules étaient rincées au PBS 1X 3 fois pendant 5 minutes. Elles étaient ensuite fixées au PFA 4% puis rincées à l'eau distillée 3 fois. Les cellules étaient recouvertes par 1 mL de solution aqueuse de rouge alizarine à 1%*m/v* pH 4,2 (Sigma Aldrich) et laissées en agitation douce durant 30 minutes à température ambiante. Elles étaient ensuite lavées à l'eau distillée 5 fois afin d'éliminer les ions bivalents résiduels et le pigment non fixé. Des photographies étaient alors réalisées.

La seconde étape consistait en la quantification du rouge alizarine. Les cellules étaient recouvertes de 400  $\mu$ L d'acide acétique à 10% pendant 30 minutes en agitation douce à température ambiante. Les puits étaient ensuite grattés avec une pointe de pipette 1000  $\mu$ L, et la suspension cellulaire transférée dans un microtube à centrifuger puis mélangée au vortex.

Les échantillons étaient alors chauffés à 85°C pendant 10 minutes puis transférés sur glace pendant 5 minutes. Ils étaient centrifugés à 20 000g pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant était alors jeté. Le culot était resuspendu dans 200  $\mu$ L d'eau distillée puis était ajouté 75  $\mu$ L d'hydroxyde d'ammonium à 10%.

75  $\mu$ L de chaque échantillon était déposés en triplicata dans une plaque 96 puits. Les échantillons étaient lus en spectrophotométrie dans un lecteur de microplaques (BMG Labtech) à la longueur d'onde de 140 nm.

### III.3.3.6. Activité de la phosphatase alcaline

Les cellules C166 et MC3T3-E1 sc14 étaient ensemencées à la concentration désirée dans une plaque 6 puits, selon les six conditions (**Tableau 5**).

A J7, les cellules étaient rincées une fois au PBS 1X puis recouvertes de 400  $\mu$ L de tampon de lyse, composé d'une solution de PBS 1X/Triton 100X à 1%*v/v* pendant 10 minutes à température ambiante. Une lyse mécanique était ensuite réalisée avec une pointe de pipette de 1000  $\mu$ L. Le mélange était collecté dans un microtube à centrifuger, placé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes et centrifugé à 17 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant était alors récupéré dans un microtube à centrifuger.

Un dosage protéique a été réalisé à l'aide d'un kit commercial (DC protein assay, Biorad), selon la procédure recommandée par le fabricant. Dans chaque puits d'une plaque 96 puits, 25  $\mu$ L d'une solution A+S (1 mL de A avec 20  $\mu$ L de S) et 100  $\mu$ L d'une solution B étaient déposés. 5  $\mu$ L d'une gamme protéique réalisée à partir de BSA et allant de 0  $\mu$ g/mL à 2  $\mu$ g/mL étaient déposés en duplicata (échelle de Bradford). 5  $\mu$ L de chaque échantillon étaient déposés en duplicata. Les échantillons étaient lus en spectrophotométrie dans un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 405 nm.

Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline a été réalisé à l'aide d'une kit commercial (Kit Sigma Aldrich). Dans une plaque 96 puits, il était déposé dans chaque puits, 240  $\mu$ L d'un mélange de réactif Buffer et de pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate), un substrat de la

phosphatase alcaline, avec 5 µL d'échantillon. L'absorbance des échantillons étaient lue en spectrophotométrie dans un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 405 nm en fonction du temps durant 20 minutes (une lecture toutes les 5 minutes).

### III.3.3.7. Dosage du VEGF-A par ELISA

Les cellules C166 et MC3T3-E1 sc14 étaient ensemencées à la concentration désirée dans une plaque 6 puits, selon les cinq conditions, la condition C166+VEGF n'étant pas étudiée (**Tableau 5**). Comme pour l'étude du potentiel angiogénique des C166 (Chapitre II), un dosage par ELISA du VEGF a été réalisé.

Le dosage par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) du VEGF produit par les cellules en cultures a été réalisé à partir d'un kit commercial (PeproTech) sur les surnageants de cultures après 7 jours. Après collecte, les surnageants étaient centrifugés à 300g pendant 5 minutes à 4°C pour éliminer les éventuels débris cellulaires (culot) en vue de leur utilisation.

100 µL de la solution de l'Ac de capture (lapin anti-VEGF humain) à 0,5 µg/mL étaient déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits adaptée (traitement pour faciliter l'absorption des protéines, Sarstedt). La plaque était scellée par un film adhésif et laissée incubée une nuit à température ambiante sous agitation. Le lendemain, la plaque ELISA était vidée par retournement et égouttée sur du papier absorbant. Les puits étaient lavés 4 fois avec 250 µL/puits de tampon de lavage (Tween 20 à 0,05% v/v en PBS 1X) en vidant à chaque fois la plaque par retournement et en l'égouttant sur du papier absorbant (procédure de lavage). 300 µL de tampon de blocage (BSA à 1% m/v en PBS 1X) étaient alors déposés dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante. Les puits étaient lavés 4 fois selon la procédure de lavage et 100 µL d'une gamme croissante de solution de VEGF (de 0 pg/mL à 800 pg/mL) étaient déposés en triplicata d'une part et 100 µL d'échantillons d'autre part étaient déposés dans la plaque 96 puits en triplicata et laissés incubés 2h à température ambiante. Les puits étaient lavés 4 fois selon la procédure de lavage. 100 µL de la solution de l'Ac de détection (biotinylé, lapin anti-VEGF humain) à 0,125 µg/mL étaient déposés dans chaque puits de la plaque et laissés incubés 2h à température ambiante. Les puits étaient lavés 4 fois selon la procédure de lavage. 100 µL de solution de streptavidine-HRP (Horse-Raddish Peroxidase – peroxydase de raifort) à 0,05 µg/mL étaient ensuite déposés dans chaque puits et laissés incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Les puits étaient lavés 4 fois selon la procédure de lavage et 100 µL de substrat ABTS® étaient déposés dans chaque puits de la plaque.

Pour finir, l'absorbance des solutions contenues dans les puits était lue en spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 405 nm et 605 nm.

### III.3.3.8. Analyse de l'expression génique des marqueurs endothéliaux et ostéogéniques par RTqPCR

Les C166 et les MC3T3-E1 sc14 étaient ensemencées à la concentration désirée dans une plaque 6 puits, dans les cinq conditions (**Tableau 5**).

A 24 heures et à 7 jours de culture, les ARN totaux ont été isolés à l'aide du *RNeasy® Plus Micro Kit* (Qiagen). Les cellules étaient rincées une fois au PBS 1X et recouvertes de 350 µL d'une solution de tampon RLT (1 mL, tampon de lyse) et beta-mercaptoéthanol (10 µL) pendant 1 minute. Les cellules couvrant le fond des puits de culture étaient ensuite décollées avec une pointe de pipette de 1000 µL afin de compléter la lyse chimique des cellules par une lyse mécanique. Le lysat était mélangé par pipetage à 350 µL d'éthanol à 70%. Ce mélange

était transféré sur une colonne Rneasy MinElute spin (capture des ARN et élimination des autres constituants du lysat) placée sur un tube de 2 mL. L'ensemble était centrifugé à 10 000g pendant 1 minute. L'éluat contenant les protéines et présent dans le tube était conservé à -20° pour d'autres expériences. 700 µL de tampon RW1 (lavage) étaient ajoutés sur la colonne et l'ensemble était centrifugé à 10 000 g pendant 1 minute. 500 µL de tampon RPE (lavage) étaient ajoutés sur la colonne et l'ensemble était centrifugé à 10 000 g pendant 1 minute. 800 µL d'éthanol à 80% étaient ajoutés sur la colonne (lavage) et l'ensemble était centrifugé à 10 000 g pendant 2 minutes. Le tube de collecte était jeté et la colonne placée sur un tube propre. L'ensemble était centrifugé à 17 000 g pendant 5 minutes pour sécher la membrane. Le tube de collecte était jeté. La colonne était à nouveau placée sur un tube propre. 20 µL d'eau RNase-free étaient ajoutés au centre de la membrane. L'ensemble était centrifugé à 17 000 g pendant 1 minutes 30 afin d'éluer les ARNs. Les ARNs étaient conservés à -80°C.

La quantité d'ARN contenu dans les éluats étaient dosée par mesure au spectrophotomètre (BMG Labtech) des absorbances à 230, 260 et 280 nm. Les ARNs ont été transcrits en ADNc. Le kit *High-capacity RNA-to-cDNA®* (Applied technologies) a été utilisé pour cette transcription inverse selon le protocole fourni par le fabricant. 10 µL de RT Buffer Mix 2X ont été mélangés avec 1 µL de RT enzyme Mix 20X, 1 µg d'ARN et de l'eau *RNase-free* en quantité suffisante pour obtenir un volume de 20 µL. Le mélange était incubé à 37°C pendant 60 minutes puis à 95°C pendant 5 secondes dans un thermocycleur (Biorad). Les échantillons étaient conservés à -20°C. Les ADNc ont été dilués dans de l'eau *RNase-free* afin d'obtenir une concentration finale de 25 ng/ml. La réaction de PCR quantitative a été ensuite réalisée utilisant des amorces et sondes spécifiques au gène étudié (Applied Biotechnologies, technologie Taqman, **Tableau 7**). Brièvement, 6 µL de MasterMix PCR Universel TaqMan™ (Applied Technologies), 0,5 µL de réactif (mélange amorces + sondes, Applied Technologies), 0,5 µL d'eau *RNase-free* étaient déposés dans chaque puit d'une plaque 96 puits semi-jupée (Sarstedt). 4 µL d'échantillon d'ADNc était ensuite ajouté en duplicata dans la plaque (sauf le collagène I qui était en monoplicata). La plaque était fermée hermétiquement et placée dans l'appareil pour PCR en temps réel (AriaMx, Agilent) paramétré selon le programme recommandé par le fabricant du Master Mix.

Tableau 7 : Gènes d'intérêt recherchés lors de la RTqPCR en co-culture et leurs amorces commerciales

Gènes d'intérêt	Type de gènes	Amorces commerciales TaqMan™ spécifiques du gène d'intérêt
GAPDH	Référence	Mm99999915_g1
vWF1	Endothélial	Mm00550376_m1
eNOS	Endothélial	Mm00435217_m1
RUNX2	Ostéogénique	Mm00501584_m1
Collagène I	Ostéogénique	Mm004833888_m1
ALP	Ostéogénique	Mm00475834_m1
ACTB	Référence	Mm00607939_s1

### **III.3.4. Analyses statistiques**

Toutes les expériences étaient réalisées trois fois de manière indépendante.

Les analyses statistiques étaient faites avec le logiciel Prism-Graph Pad®. Quand les données suivaient la loi normale (testée par un test de Shapiro-Wilk), un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey étaient appliqués. Quand les données ne suivaient pas la loi normale, un test de Kruskal-Wallis puis un test post-hoc de Dunn étaient utilisés. Les différences entre les conditions testées étaient considérées comme étant significatives quand  $p < 0,05$ .

### III.4. Résultats

#### III.4.1. Prolifération cellulaire

La densité cellulaire et la prolifération des C166 et des MC3T3-E1 sc14 en monoculture et en co-culture en fonction du ratio C166 :MC3T3-E1 sc14 ont été évaluées.

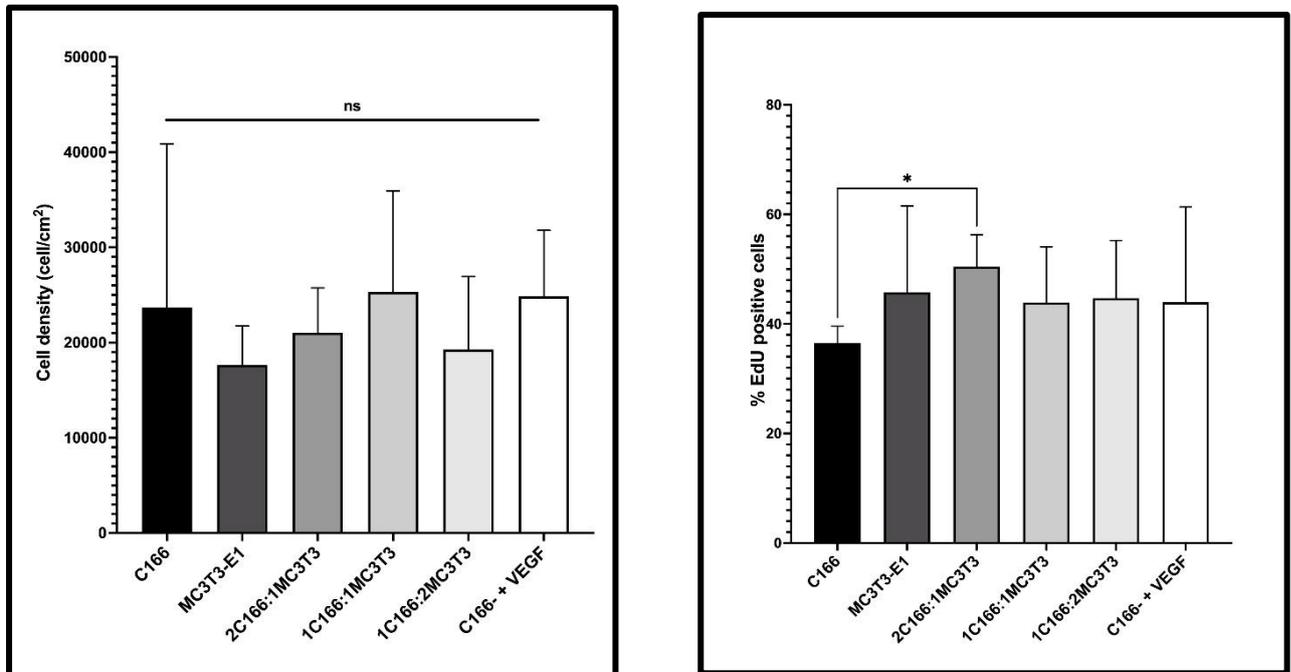


Figure 29 : Gauche : Densité cellulaire en cellules/cm<sup>2</sup> pour les 6 conditions à 24 heures. Test statistique : ANOVA suivi d'un post-hoc de Tukey, ns ( $p \geq 0,05$ ). Droite : Prolifération cellulaire en % pour les 6 conditions à 24 heures. Test statistique : Kruskal Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn, ns ( $p \geq 0,05$ ), \* ( $p < 0,05$ )

A 24h, aucune différence significative n'était observée en termes de densité cellulaire quelle que soit la condition (**Figure 29 gauche**). Les valeurs retrouvées, autour de 25 000 cellules par cm<sup>2</sup>, étaient cohérentes avec les densités d'ensemencement utilisées et le temps de culture considéré. En revanche, le pourcentage de cellules ayant incorporé l'EdU (% de cellules en prolifération) était significativement plus élevé en co-culture au ratio 2C166 :1MC3T3-E1 sc 14 (52 % +/- 5) par rapport à la monoculture de C166 (37 % +/- 5) ( $p \leq 0,05$ ) mais non différent de la mono-culture de MC3T3-E1 sc14 (**Figure 29 droite**). Il n'a pas été observé de noyaux condensés, pouvant indiquer une mortalité cellulaire.

#### III.4.2. Activité cellulaire (WHA)

Le scratch test (ou WHA), par l'étude de la vitesse de recolonisation d'une lésion dans le tapis cellulaire, permet l'évaluation de l'activité cellulaire. Il reflète à la fois les capacités de migration et de prolifération cellulaire. L'analyse a été réalisée pour les 6 conditions au temps H0, H+9 et H+24 (**Figure 30 gauche**).

Les pourcentages de fermeture de la lésion en fonction du temps étaient comparables dans les différentes conditions (**Figure 30 droite**). Les vitesses de fermeture de la lésion étaient

donc similaires quelles que soient les conditions, à H+9 puis à H+24. On ne retrouvait pas de différence significative concernant les surfaces des lésions des différents tapis cellulaires à H+9. A H+24, dans toutes les conditions, le tapis cellulaire s'était refermé.

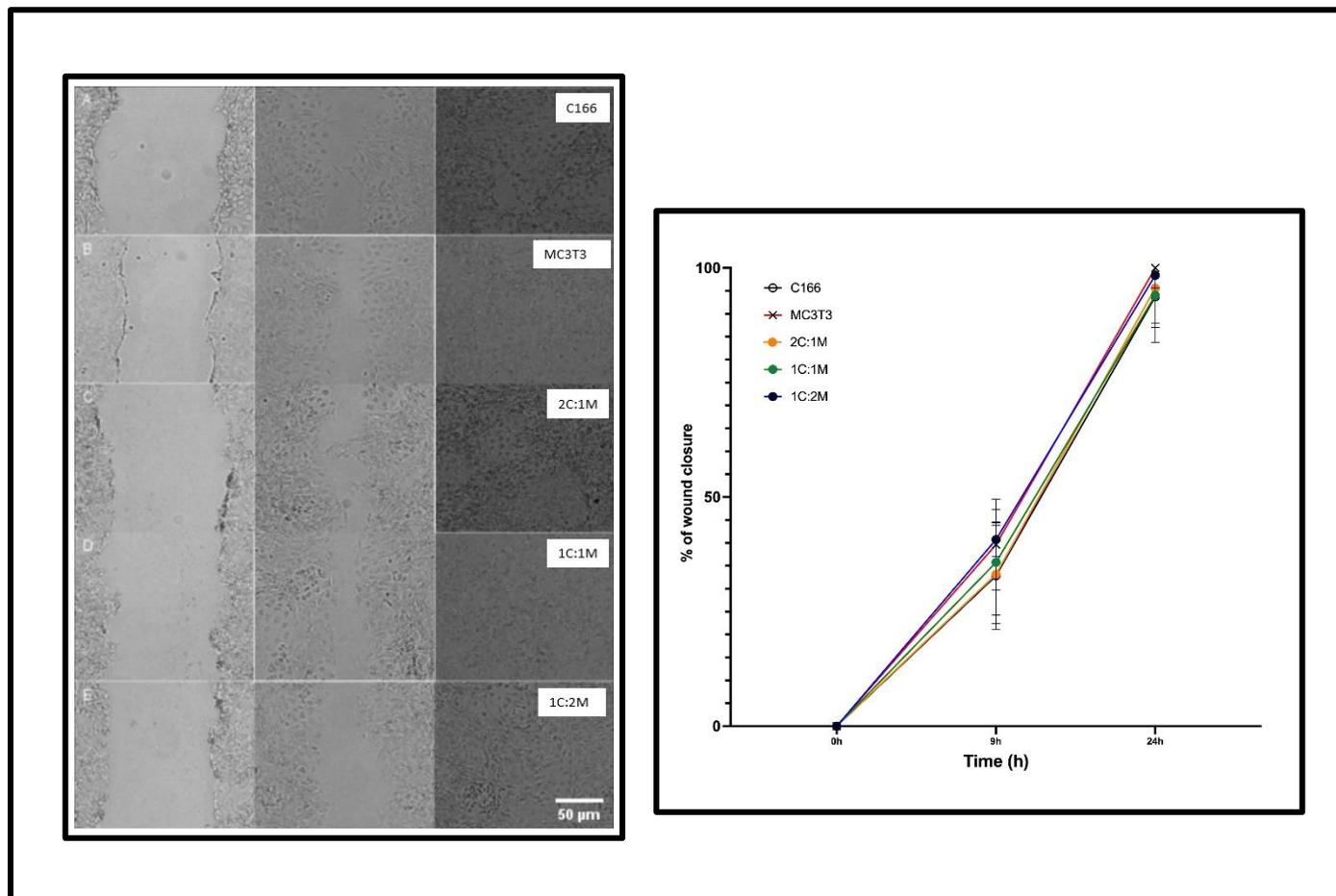


Figure 30 : A gauche : WHA à H0, H9 et H24 pour les 5 conditions, observation au microscope optique. Barre d'échelle 50µm. A droite : Pourcentage de fermeture de la lésion à H0, H9 et H24 pour les 5 conditions

### III.4.3. Tubulogenèse et détection *in situ* de marqueurs de l'angiogénèse et de l'ostéogénèse

Les cellules ont été cultivées dans les six conditions durant 24 heures, en 2D, sans gel de fibrine. Après marquage, un signal correspondant à MMP9 a été retrouvé en intracytoplasmique (comme pour les expérimentations avec les C166 sur les pastilles) dans les six conditions. En revanche, en co-culture, et notamment pour les ratios 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, on retrouvait de nombreux prolongements cellulaires positifs au MMP9 semblant former une structure circulaire, pointés par des flèches orange sur la **Figure 31**.

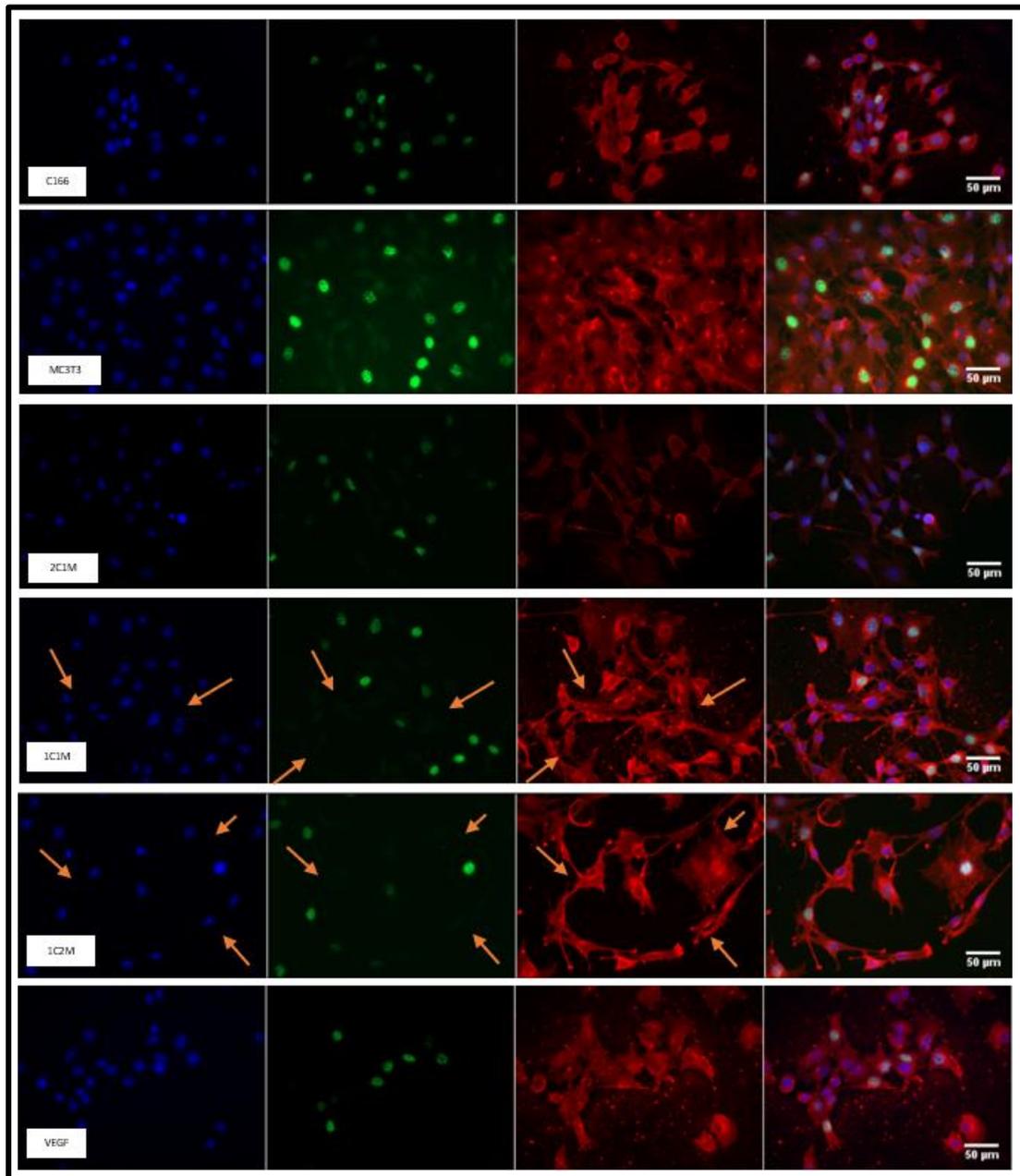


Figure 31 : Culture dans les six conditions sans fibrine à H24 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; détection de l'EdU (vert) ; marquage de la MMP9 (rouge); microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 50 µm

Les cellules ont ensuite été cultivées durant 7 jours sur le gel de fibrine pour leur fournir un environnement 3D propice à la formation de tubules. La **Figure 32** représente le marquage du cytosquelette à la phalloïdine réalisé dans les six conditions. En monoculture, un simple tapis cellulaire était observé. En co-culture, la détection des réseaux d'actine permettait de mettre en évidence une organisation tridimensionnelle des cellules avec la présence de structures pouvant correspondre à des tubules.

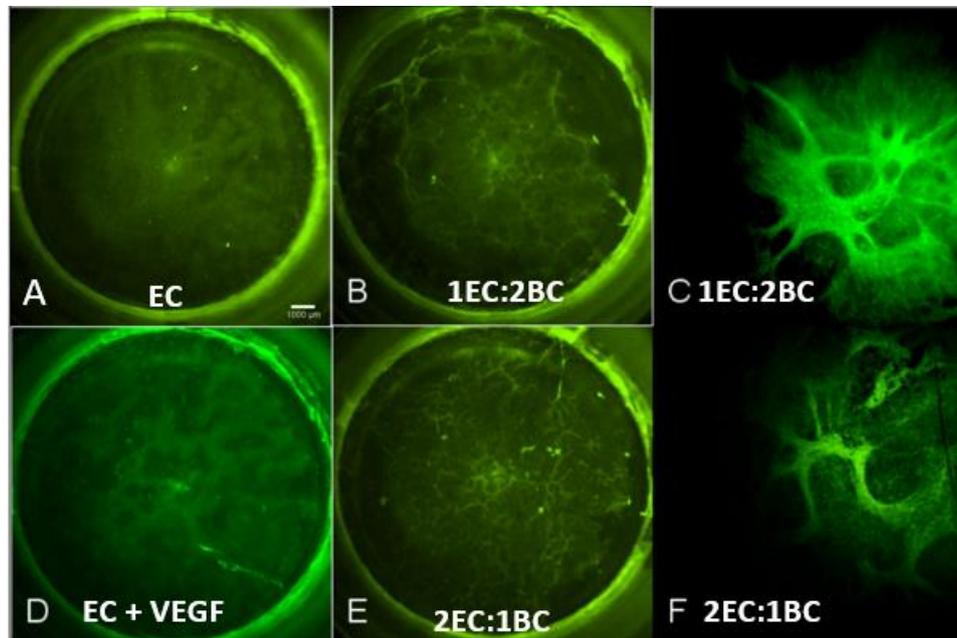


Figure 32 : Culture dans les quatre conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine (vert). C et F : reconstruction en 3D de piles d'images obtenues à partir de co-cultures ; Macroscopie confocale, Barre d'échelle : 1000 µm –. EC : endothelial cells, C166 ; BC : bone cells, MC3T3-E1 sc14

Les **Figure 33** et **Figure 34** représentent le signal apparaissant en vert correspondant à PECAM et le signal apparaissant en rouge correspondant au collagène I, observés au microscope à fluorescence à deux grossissements différents, dans les six conditions, après 7 jours de culture dans le gel de fibrine.

Comme rappelé dans le paragraphe I.2.1.2.2.2. PECAM, PECAM est une protéine d'adhésion impliquée dans la jonction CE-CE. C'est donc un marqueur endothélial. Ici, le signal correspondant à PECAM était retrouvé au niveau intracellulaire ce qui pourrait être un artéfact lié à la méthode de marquage (voir le paragraphe IV.4. Discussion sur les co-cultures) puisque PECAM est une protéine membranaire. Un signal a également été détecté dans les cultures de MC3T3-E1 sc14. Cependant, dans tous les cas, aucun marquage membranaire n'était détecté.

Comme rappelé dans le paragraphe I.1.1.1.1. La matrice extracellulaire osseuse, le collagène-I est un composant essentiel de la MEC osseuse, lui assurant son élasticité et sa résistance mécanique. Dans nos conditions, le collagène I était présent de manière basale dans toutes les cellules dans les monocultures de MC3T3-E1 sc14. Dans le cas des C166, une partie seulement des cellules était positives pour le collagène de type I. Dans les co-cultures, les cellules en bordure des alvéoles précédemment décrites exprimaient plus le collagène de type I et pourraient correspondre aux cellules osseuses. Des structures fibrillaires positives pour le collagène de type I étaient visibles dans la condition 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14. Le collagène

de type I était exprimé dans toutes les conditions. Toutefois en monoculture, on mettait en évidence un simple tapis cellulaire, alors qu'en co-culture, notamment en 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, on observait une organisation en 3D avec des structures circulaires creuses.

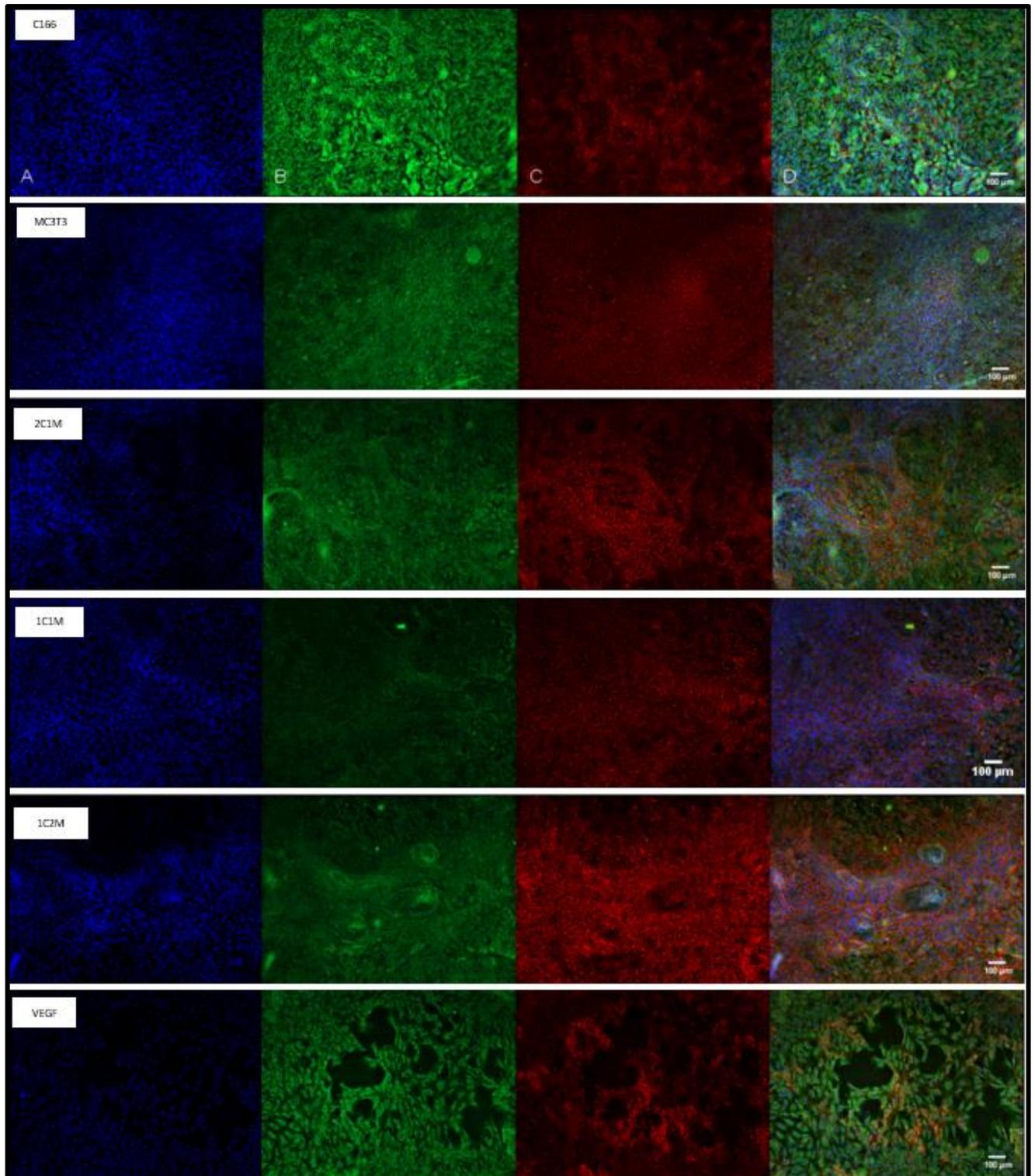


Figure 33 : Culture dans les six conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; marquage de PECAM (vert) ; marquage du collagène de type I (rouge) ; microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 100 μm

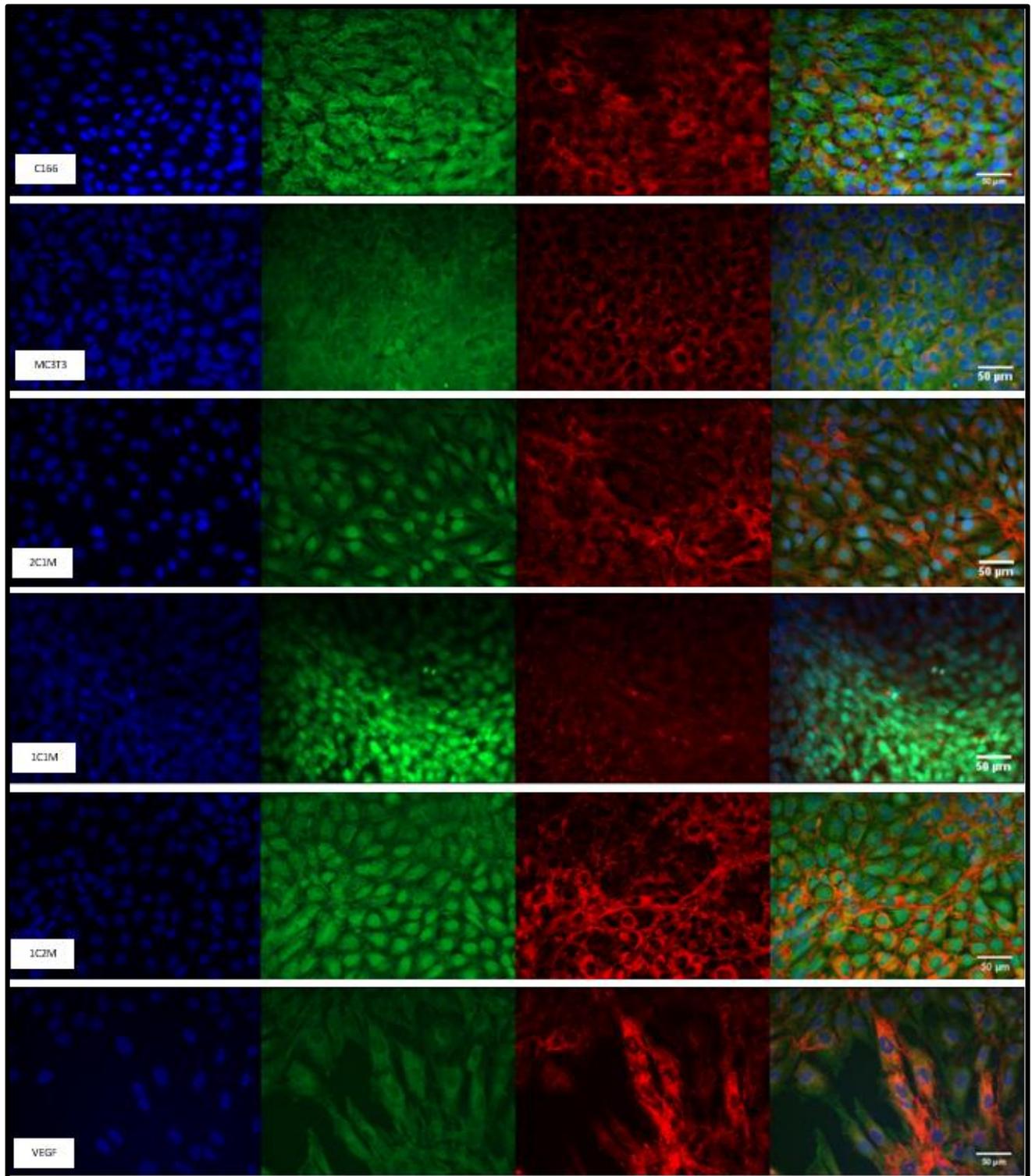


Figure 34 : Culture dans les six conditions dans le gel de fibrine à J7 ; marquage des noyaux au Hoescht 33342 (bleu) ; marquage de PECAM (vert); marquage du collagène de type I (rouge) ; microscopie à épifluorescence, barre d'échelle : 50 µm

#### III.4.4. Mesure de la minéralisation par le rouge alizarine

Le test au rouge alizarine est une méthode utilisée pour déterminer la présence et la concentration d'ions divalents. Il permet ainsi le marquage du  $\text{Ca}^{2+}$  de la MEC minéralisée. Si du calcium est présent dans le milieu à tester, il forme un complexe coloré avec l'alizarine,

produisant une teinte rouge caractéristique. La profondeur de la couleur est proportionnelle à la concentration de calcium dans la solution, ce qui permet de quantifier la quantité de calcium présente. L'intensité de ce marquage a été mesurée au spectrophotomètre en prenant le puits monoculture de MC3T3-E1 sc14 comme référence (**Figure 35**). Les résultats des puits monoculture de C166 et C166+VEGF ne sont présentés car les CE ne produisent pas de matrice minéralisée en conditions physiologiques.

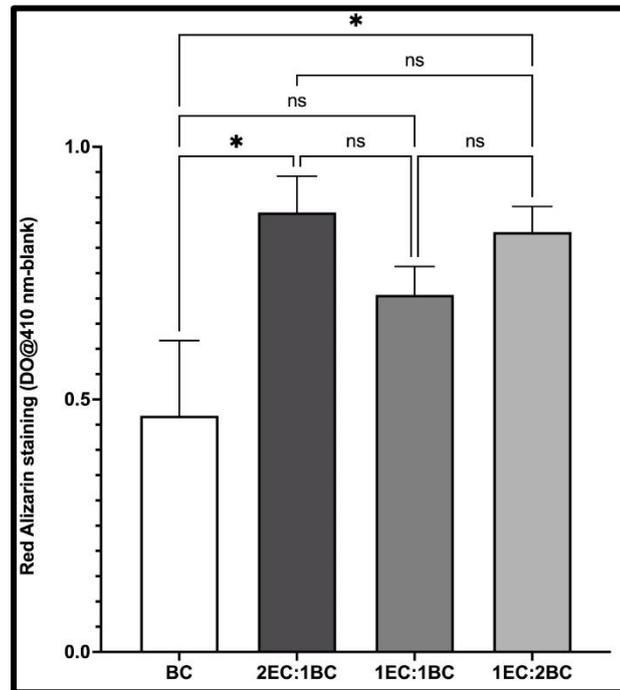


Figure 35 : Intensité du marquage au rouge alizarine à J7 dans les quatre conditions  
EC : Endothelial cells, C166 ; BC : Bone cells, MC3T3-E1 sc14

Test statistique : ANOVA suivi d'un post-hoc de Tukey ; ns : non significatif ; \* :  $p \leq 0,05$

Le rouge Alizarine s'est fixé de manière plus importante dans les conditions de co-culture par rapport aux cellules MC3T3-E1 sc14 seules. La différence était statistiquement significative dans le cas des ratios 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 par rapport à la monoculture de MC3T3-E1 sc14 ( $p \leq 0,05$ ). Le résultat obtenu pour 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14 n'était pas significativement différent du contrôle.

#### III.4.5. Activité de la phosphatase alcaline

L'effet ostéogénique a été évalué par mesure de l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur de la minéralisation osseuse (**Figure 36**). Les résultats obtenus ne montraient aucune différence significative entre les différentes conditions. Cependant, les écarts-types observés étaient importants. Il est à noter que les C166 présentaient une activité phosphatase alcaline importante.

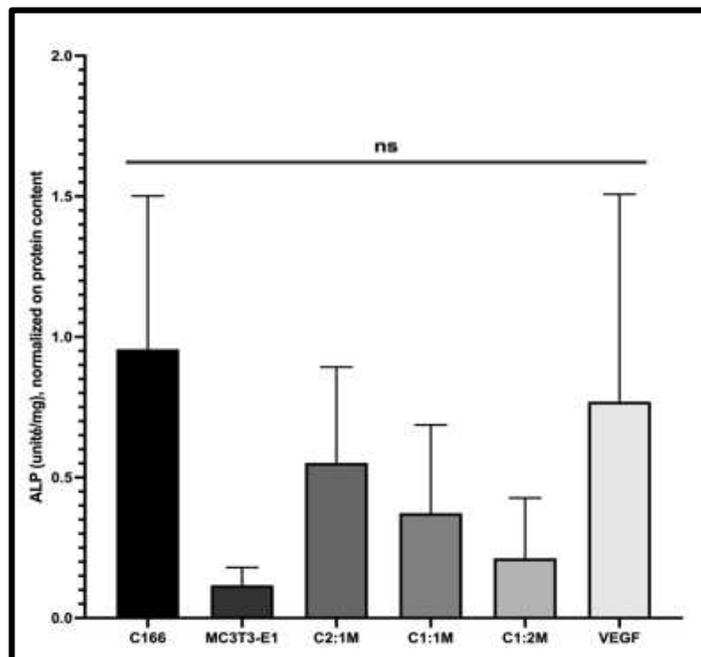


Figure 36 : Mesure de l'activité de l'alkaline phosphatase à J7 dans les six conditions.

Test statistique : ANOVA suivi d'un post-hoc de Tukey, ns : non significatif

#### III.4.6. Dosage du VEGF par ELISA

Comme rappelé dans le paragraphe I.2.4.1. Le VEGF et ses récepteurs, le VEGF est un facteur de croissance vasculaire jouant un rôle essentiel dans l'angiogenèse. Il permet la migration et la prolifération des cellules endothéliales pour former les vaisseaux. Il assure également le maintien des vaisseaux. Son taux a été mesuré par ELISA dans les cinq conditions à J7 (**Figure 37**).

La sécrétion de VEGF était significativement plus élevée en co-culture aux ratios 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 par rapport à une monoculture de C166 ( $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement). La sécrétion de VEGF était plus élevée dans la condition MC3T3-E1 sc14 en monoculture par rapport à la condition C166 en monoculture.

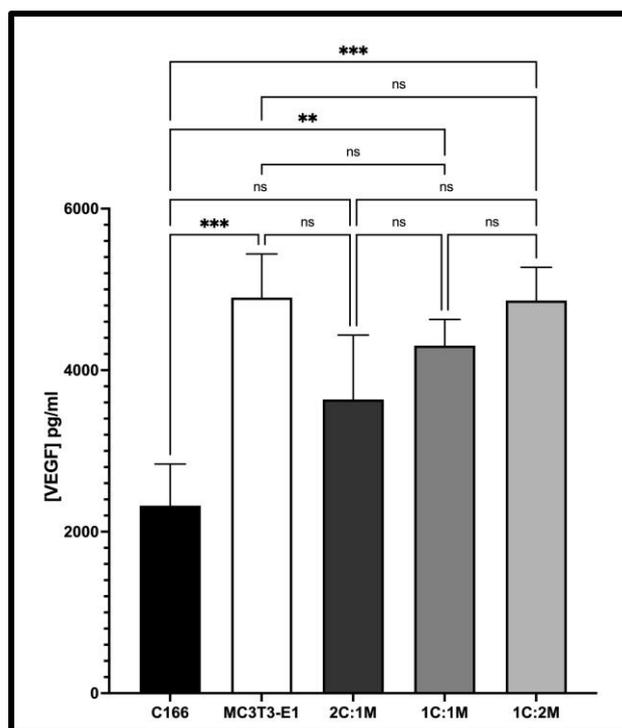


Figure 37 : Sécrétion de VEGF à J7 dans les cinq conditions

Test statistique : ANOVA suivi d'un post-hoc de Tukey ;  
 ns : non significatif ; \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

### III.4.7. Analyse de l'expression génique des marqueurs angiogéniques et osseux par RTq PCR

Les cellules ont été ensemencées en monoculture et en co-culture aux mêmes ratios que précédemment selon les cinq conditions (**Tableau 5**). Après 7 jours, nous avons mesuré l'expression relative de gènes endothéliaux comme vWF1 et eNOS et de gènes osseux comme RUNX2 et collagène I (**Figure 38**). Après 24 heures, l'expression relative de gènes osseux comme RUNX2, collagène I et ALP a été mesurée (**Figure 39**).

Rappelons que eNOS est une protéine qui permet la synthèse du NO dans l'endothélium vasculaire. Elle entraîne une vasodilatation, la prolifération et l'adhésion des cellules endothéliales. vWF1 intervient quant à lui dans l'hémostase primaire en favorisant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes.

RUNX2 est un facteur de transcription qui permet la différenciation et la maturation ostéoblastique. C'est le facteur principal permettant la mise en place de l'ostéogenèse. Le collagène I est un composant de la MEC lui conférant son élasticité et sa résistance mécanique dont l'expression est sous le contrôle de RUNX2 donc apparait plus tardivement au cours de la différenciation. Produite par les ostéoblastes, l'ALP est une enzyme essentielle à la minéralisation de la MEC.

Les expressions ont été normalisées respectivement par rapport à celle des C166 seules pour les marqueurs endothéliaux et à celle des MC3T3-E1 seules concernant les marqueurs ostéoblastiques, selon la méthode du calcul du  $\Delta\Delta CT$ .

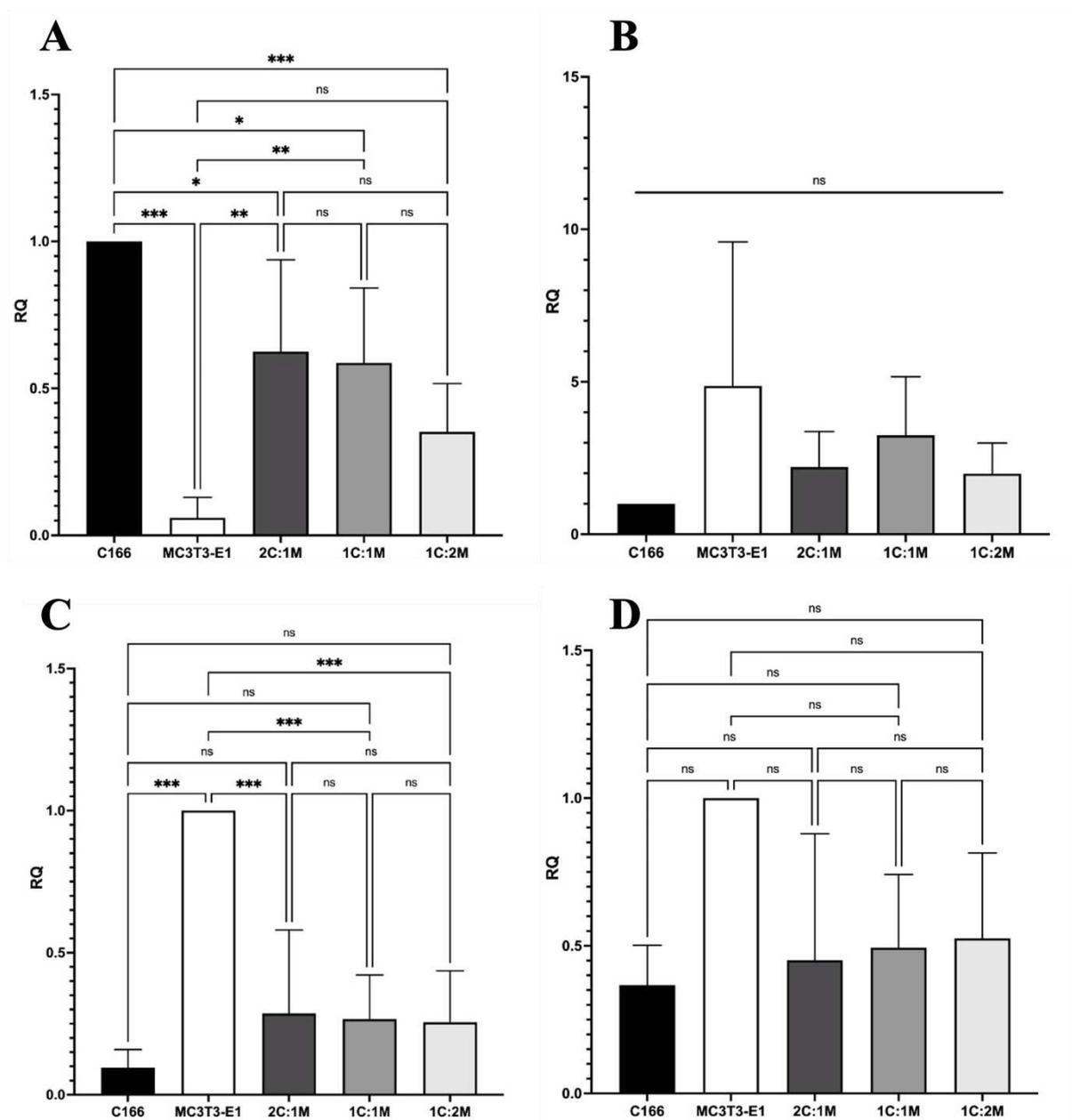


Figure 38 : Expression relative des gènes ENOS (A), vWF1 (B), RUNX2 (C) et collagène I (D) à J7 dans les cinq conditions. Tests statistiques : ns : non significatif ; \*  $p \leq 0,05$  ; \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

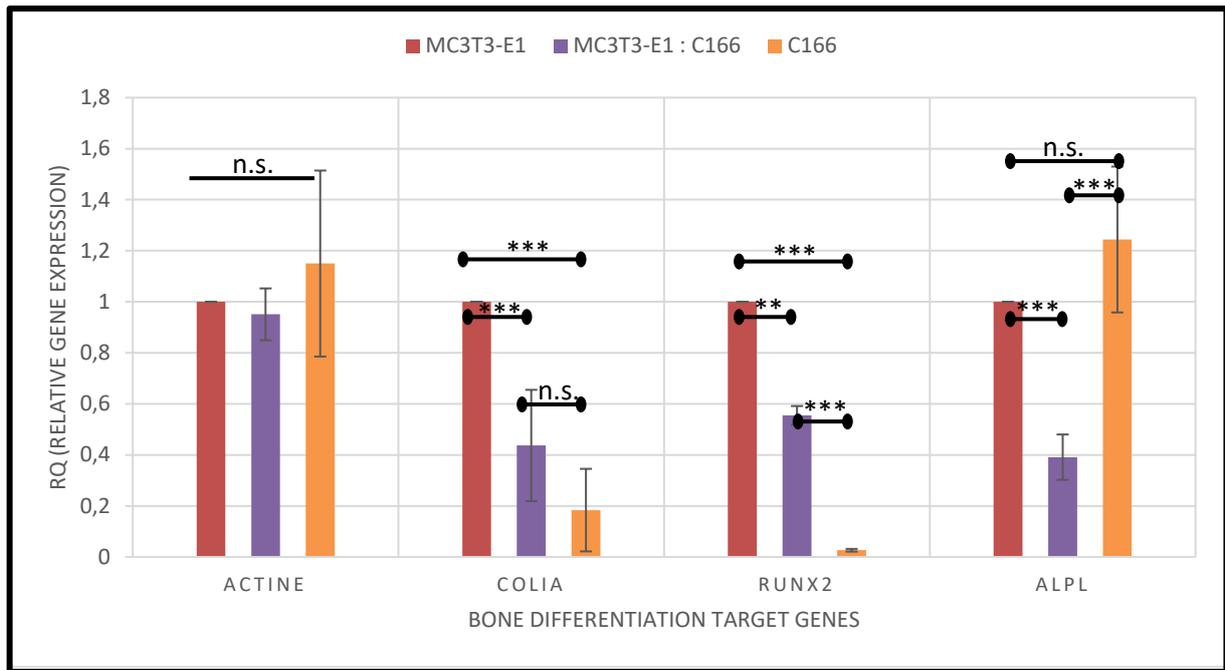


Figure 39 : Expression relative des gènes collagène I, RUNX2 et ALP à 24 heures  
 Tests statistiques : ANOVA 2 voies suivie d'un test post-hoc de Tukey. ns : non significatif ; \*  $p \leq 0,05$  ;  
 \*\*  $p \leq 0,01$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

Concernant l'expression du gène endothélial eNOS, les ratios de co-culture 2C166 : 1MC3T3-E1 et 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14 étaient significativement plus élevés que les MC3T3-E1 sc14 seules ( $p \leq 0.001$ ). En revanche, la condition C166 étaient significativement plus élevée que toutes les autres conditions. On retrouvait finalement une expression de eNOS en co-culture en relation avec le nombre de cellules C166 présentes dans la co-culture. Il n'était pas retrouvé de différence significative entre les différentes conditions de monoculture et co-culture pour l'expression du gène endothélial vWF1 (**Figure 38**).

Pour les gènes osseux, à 24 heures **Figure 39**, l'expression de RUNX2 était significativement plus élevée dans la condition de mono-culture MC3T3-E1 sc14 et dans la condition de co-culture 1C166 : 1MC3T3-E1 sc14 par rapport à la condition de mono-culture C166. A 7 jours, seule la condition mono-culture MC3T3-E1 sc14 était significativement plus élevée que toutes les autres conditions. Pour l'expression de collagène de type I, à 24 heures, la condition de mono-culture MC3T3-E1 sc14 était significativement plus élevée que les autres conditions, puis plus aucune différence significative n'était observée à 7 jours. Enfin, l'expression de l'ALP était significativement plus élevée à 24 heures dans les mono-cultures que dans la co-culture. L'expression d'ALP dans la mono-culture de C166 peut être expliquée par une réponse cellulaire spécifique à cette lignée, probablement plus proche des EPC que des cellules endothéliales.

### III.5. Discussion

L'étude de la communication entre cellules endothéliales et ostéogéniques en co-culture semble pertinente. En effet, physiologiquement, ces deux types cellulaires, présents dans l'os, interagissent lors des processus de réparation tissulaire apportant un niveau de stimulation supplémentaire au-delà de l'effet du matériau sur un type cellulaire isolé (voir paragraphe I.3. Réparation tissulaire osseuse). De plus, les données de la littérature mettent en évidence qu'en fonction du type cellulaire, les réponses à un type de matériau (composition, structure) donné peuvent varier (382). Dans le cadre de la mise en place de stratégie d'optimisation des propriétés de biomatériaux, le développement d'un modèle fonctionnel de co-culture est nécessaire. Le choix des cellules pour notre modèle de co-culture sera discuté dans le IV.1 Discussion sur le choix des cellules.

La mise en co-culture des C166 et des MC3T3-E1 sc14 n'a pas été délétère sur la survie des cellules, il n'a pas été observé de mort cellulaire suspecte, et la densité cellulaire était identique dans les six conditions. La co-culture au ratio 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 semble favoriser une augmentation de la prolifération cellulaire par rapport à la monoculture de C166. Cela suggère qu'il y a des interactions bénéfiques entre ces deux types de cellules qui stimulent la prolifération. Il a été observé un comportement de migration cellulaire (WHA) dans toutes les conditions, ce qui signifie que les cellules prolifèrent, se déplacent et colonisent les zones vides laissées par la blessure. En co-culture, un réseau d'actine a été observé, alors qu'il était absent en monoculture. Cela suggère que l'interaction entre les deux types de cellules entraîne une organisation de l'actine qui peut être cruciale pour des processus cellulaires spécifiques, peut-être liés à la migration cellulaire ou à la formation de structures tridimensionnelles, l'actine participant à la formation de la paroi des structures de type tubules (137). La minéralisation de la MEC a été augmentée en co-culture aux ratios 2C166 :1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 :2MC3T3-E1 sc14 par rapport à la monoculture de MC3T3-E1 sc14. Cela indique que la présence des cellules C166 stimule la minéralisation de la MEC. Ces résultats suggèrent que la co-culture des cellules C166 et MC3T3-E1 sc14 entraîne des interactions cellulaires bénéfiques qui favorisent la prolifération, la migration, la formation de réseau d'actine et la minéralisation de la MEC. Ces notions sont en accord avec les données de la littérature (354–356).

Les expériences de co-culture avec différents ratios de cellules C166 et MC3T3-E1 sc 14, avec ou sans gel de fibrine, ont produit des résultats intéressants concernant la formation de structures cellulaires tridimensionnelles et la régulation de facteurs angiogéniques. Sans gel de fibrine, aux ratios de co-culture 1C166 :1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, les cellules émettaient des prolongements positifs au MMP9, s'organisant de manière circulaire. Cela suggère une dégradation de la MEC permettant aux cellules endothéliales de s'organiser entre elles pour former des structures circulaires. Avec gel de fibrine, aux ratios de co-culture 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14, les marqueurs d'adhésion cellulaire PECAM1 et le collagène I étaient fortement présents. PECAM1 indique le positionnement des cellules endothéliales et le collagène I celui des cellules ostéogéniques, contribuant à la formation de structures circulaires creuses en 3D. La sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF était augmentée en co-culture aux ratios 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 par rapport à la monoculture de C166. Cela suggère que la présence de cellules MC3T3-E1 sc14 stimule la production de VEGF, probablement pour favoriser la survie, la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse. Paradoxalement, les cellules MC3T3-E1 sc14 seules exprimaient davantage de VEGF que les C166 seules. Cela pourrait être attribuable à la capacité intrinsèque des cellules ostéogéniques à produire du VEGF,

soutenant la survie et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins via l'activation de récepteurs spécifiques des cellules endothéliales tels que VEGFR2 (347). La co-culture de cellules C166 et MC3T3-E1 sc14, en particulier à certains ratios et dans des conditions spécifiques de culture, favorise la formation de structures tridimensionnelles et la régulation de facteurs angiogéniques essentiels comme le VEGF, avec des implications potentielles pour la régénération tissulaire et l'angiogenèse.

Une activité élevée de la phosphatase alcaline a été observée dans les cellules C166 seules par rapport aux cellules MC3T3-E1 sc14 seules. Les cellules endothéliales peuvent exprimer la phosphatase alcaline dans certaines conditions, bien que cela soit rare et généralement associé à des situations pathologiques (383,384). Les cellules endothéliales primaires humaines expriment peu ou pas l'ALP (385,386). Cependant, au vu de nos résultats, et de ceux précédemment obtenus au laboratoire par RTqPCR, il apparaît que les C166 expriment l'ALP. Les cellules ostéogéniques, comme les MC3T3-E1 sc14, sont également connues pour exprimer l'ALP dans le cadre de leur différenciation et de leur rôle dans la formation osseuse. Les résultats concernant l'activité de la phosphatase alcaline reflètent la proportion relative de chaque type cellulaire dans les co-cultures. Étant donné que les cellules C166 semblent exprimer davantage de phosphatase alcaline que les cellules MC3T3-E1 sc14, cela peut influencer les mesures d'activité de l'ALP dans les co-cultures. En raison de cette différence d'expression de l'ALP entre les deux types cellulaires, il peut être difficile d'évaluer spécifiquement l'activité de l'ALP propre aux cellules ostéogéniques en relation avec leur état de différenciation dans les co-cultures. Il est donc important de prendre en compte cette différence d'expression cellulaire lors de l'interprétation des résultats relatifs à l'activité de l'ALP et de reconnaître que cela peut limiter la capacité à évaluer spécifiquement l'activité de l'ALP des cellules ostéogéniques dans ce contexte particulier.

Les niveaux d'expression de vWF1 n'ont pas été augmentés en co-culture par rapport aux monocultures. Concernant eNOS, les niveaux d'expression de ces marqueurs étaient généralement proportionnels à la quantité de chaque type cellulaire dans la co-culture. Cela suggère que la présence des deux types cellulaires dans la co-culture n'a pas entraîné une stimulation significative de l'expression de ces gènes par rapport aux monocultures. L'expression du collagène I, un marqueur lié à la production de matrice extracellulaire osseuse, n'était pas différente selon les conditions de culture. De plus, l'expression de RUNX2, un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique, n'a pas été augmentée en co-culture par rapport à une monoculture de MC3T3-E1 sc14 (la condition MC3T3-E1 sc14 seules était significativement plus élevée que toutes les autres conditions). Cela pourrait être dû au fait que les pré-ostéoblastes, déjà différenciés à J7, expriment moins de RUNX2. En résumé, nos résultats indiquent qu'en co-culture, il n'y a pas eu de stimulation significative de l'expression des gènes endothéliaux et osseux étudiés par rapport aux monocultures. Il est possible que la présence des deux types cellulaires n'ait pas eu d'effet synergique sur l'expression de ces gènes dans ce contexte spécifique. De plus, les observations sur l'expression de RUNX2 suggèrent une possible régulation temporelle de l'expression génique liée à la différenciation des ostéoblastes.

Il semble difficile de conclure avec certitude sur le ratio de co-culture le plus favorable à la fois pour l'angiogenèse et l'ostéogenèse. Les ratios 2C166 :1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 :2MC3T3-E1 sc14 semblent les plus prometteurs, mais il est compliqué de les discriminer en termes d'efficacité.

Pour mieux comprendre ces résultats et identifier le temps de culture et le ratio optimaux pour la formation de structures tubulaires, il serait intéressant d'augmenter la durée de culture jusqu'à 21 jours, voire davantage. Cela pourrait permettre une meilleure évaluation quantitative des réseaux microcapillaires formés. En effet, des études antérieures qui ont montré une augmentation du nombre de structures tubulaires avec le temps de culture. Unger et al. (351) ont réalisé de la co-culture sur HA poreuse et ont observé un pic du nombre de structures tubulaires à 42 jours avec un ensemencement des cellules similaire au nôtre. Thein-Han et al. (354) obtiennent également des structures fortement positives à PECAM de type microcapillaires à 42 jours, alors que Rao et al. (368) obtiennent des structures de type vaisseaux dès 7 jours dans un hydrogel de fibrine-collagène. Ces derniers ont montré que l'ajout de fibrine augmentait le réseau type microcapillaires ; alors que l'augmentation de cellule endothéliales diminuait la vasculogénèse. Il paraît donc difficile de conclure sur une durée optimale en co-culture pour la tubulogénèse. Il serait intéressant de réaliser une comparaison à différents temps de culture avec une comparaison quantitative du nombre de microcapillaires. Augmenter la durée de culture et comparer les résultats à différents points temporels semble être une approche prometteuse pour mieux comprendre et optimiser la formation de structures tubulaires en co-culture et définir un ratio idéal. Enfin, des co-cultures en bioréacteur pourraient être envisagées. Ce système de culture permet une croissance cellulaire plus physiologique, formant des structures tridimensionnelles qui se rapprochent davantage de leur environnement naturel *in vivo*. Cette culture 3D dynamique permet de mieux modéliser les interactions cellulaires et tissulaires dans des conditions plus proches de l'environnement *in vivo*.

## Chapitre IV. Discussion générale

---

La vascularisation des implants en CPC poreux destinés à substituer les pertes de substance osseuses est indispensable pour leur ostéointégration et le succès de l'implantation à long terme (14). L'enjeu est la pénétration de la vascularisation au cœur de l'implant (387). Plusieurs stratégies d'amélioration des propriétés angiogéniques des CPC ont été élaborées (notamment la modification de la composition chimique par dopage ionique et le contrôle de la microstructure). Cependant, il est indispensable de pouvoir analyser les effets de chaque modification indépendamment, pour pouvoir élucider quel mécanisme affecte réellement le comportement cellulaire (285). L'association de la modification d'un paramètre physique ou chimique avec une réponse cellulaire précise demeure donc un défi. De plus, la communication intercellulaire entre cellules endothéliales et cellules ostéogéniques semble essentielle pour promouvoir à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse.

### IV.1. Discussion sur le choix des cellules

Pour étudier le comportement des cellules endothéliales à la surface des CPC, nous avons choisi comme modèle les C166. C166 (ATCC®, CRL-2581™) est une lignée de cellules endothéliales immortalisées isolées à partir du sac vitellin d'un embryon de souris de 12 jours issu de souris transgéniques hypervasculaires (**Figure 40**). Ces souris expriment de multiples copies d'un allèle activé du proto-oncogène humain *fes* (*fps/fes*) et présentent une hypervascularisation évoluant vers des hémangiomes multifocaux. Le sac vitellin est le premier site de vasculogenèse et d'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire. Les C166 adoptent un comportement physiologique de cellules endothéliales et notamment ont la capacité de former des tubules lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement 3D (388).

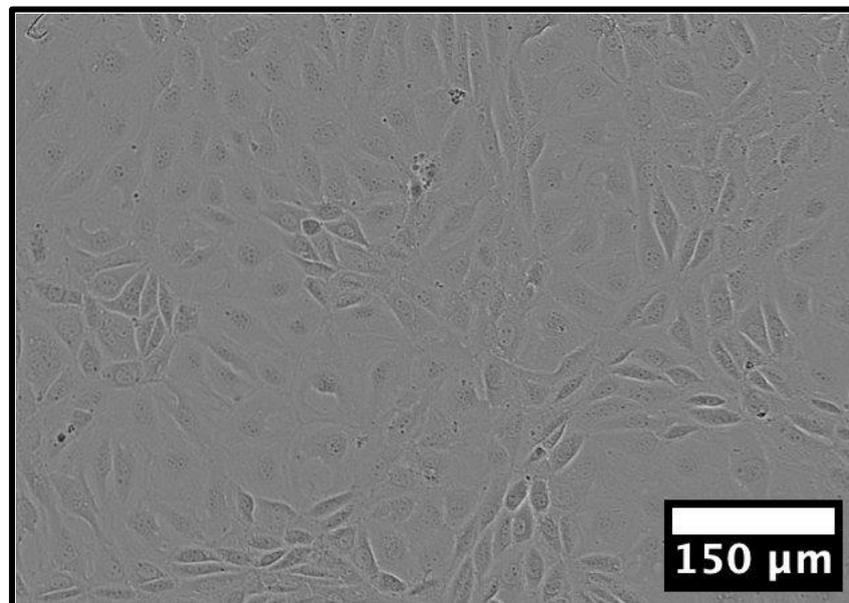


Figure 40 : Aspect des C166 au microscope à confluence (IRCER)

Les C166 ont des propriétés proches de celles des EPC. En effet, le clone C166, étant ici issu du sac vitellin, a la capacité de soutenir l'hématopoïèse embryonnaire (389). Il peut supporter la prolifération stable de cellules souches hématopoïétiques multipotentielles, générant ainsi un nombre adéquat de cellules pour l'étude des mécanismes impliqués dans leur développement et leur différenciation ultérieurs. Comme décrit dans le paragraphe I.2.2.1. Vasculogenèse, les EPC, présents dans la moelle osseuse, ont des propriétés pro-angiogéniques et interviennent au cours de la vasculogenèse.

Néanmoins, les C166 sont principalement considérées comme des cellules endothéliales vasculaires et sont classiquement utilisées comme telles en recherche dans les contextes de vascularisation, et plus précisément de vascularisation des biomatériaux (390). La lignée cellulaire C166 est fréquemment choisie pour l'étude de la différenciation des cellules endothéliales et pour la détermination des mécanismes qui sous-tendent l'établissement de l'hétérogénéité des cellules endothéliales spécifiques à un organe.

Les cellules C166 présentent des caractéristiques endothéliales normales, telles que le réarrangement en structures tubulaires lorsqu'elles sont placées sur du Matrigel® et le maintien de la morphologie en pavés à confluence. Elles expriment de manière constitutive l'adressine vasculaire identifiée par l'anticorps MECA-99, ainsi que des niveaux élevés de la protéine-tyrosine kinase cytoplasmique codée par le proto-oncogène *fes* (*fps/fes*) (388).

Le choix de l'utilisation des C166 présente les avantages et les biais connus et classiques de l'utilisation d'une lignée cellulaire établie. Les principaux avantages sont : l'homogénéité et la reproductibilité (garantissant une cohérence des résultats expérimentaux), l'accessibilité et la durée de vie (permettant une économie de temps et de ressources), le contrôle expérimental (offrant des conditions expérimentales contrôlées permettant d'étudier des variables spécifiques de manière précise). Cependant, les lignées cellulaires peuvent différer des cellules *in vivo* en termes de phénotype, de fonction et de réponse aux stimuli, ce qui peut limiter la pertinence biologique des résultats obtenus. De plus, les lignées cellulaires peuvent subir des changements génétiques et épigénétiques lors de leur culture prolongée en laboratoire, ce qui peut introduire des artéfacts dans les résultats expérimentaux. Nous avons tenté de limiter ce biais en n'utilisant que des passages précoces. En outre, elles ne reproduisent pas la complexité des interactions cellulaires et tissulaires présentes dans un organisme vivant, ce qui peut limiter la capacité à modéliser des processus biologiques complexes.

Il est important de garder à l'esprit que les C166, comme déjà explicité, semblent très proches phénotypiquement des EPC, plus que des cellules endothéliales sur certains points particuliers. De plus, selon si les cellules proviennent de veines ou d'artères, les phénotypes divergent (voir I.2.1.2.1. La structure de la cellule endothéliale). Dans notre cas, en culture 2D, l'absence de flux a tendance à normaliser le phénotype ce qui apporte un biais, connu dans le domaine de l'angiogenèse, par rapport au phénotype des cellules endothéliales. En effet, les réponses des EPC et de cellules endothéliales plus matures à la topographie d'un matériau peuvent différer (337,391). Un autre exemple, le taux de prolifération mesuré par incorporation d'EdU est très haut pour les C166. En comparaison, avec les HUVEC, 4h d'incorporation de l'EdU ne suffisent pas pour avoir un marquage si les cellules ne sont pas stimulées.

Notre choix s'est porté sur cette lignée principalement pour deux raisons. Une étape de développement d'une procédure expérimentale pertinente était nécessaire ce qui requière une quantité importante de cellules. Pour des raisons de coûts et de disponibilité, cela aurait été difficilement envisageable à partir de cellules endothéliales primaires humaines. L'argument

principal est en lien avec notre second objectif : ces cellules devaient être utilisées en co-culture. Pour des raisons techniques similaires et parce que les pré-ostéoblastes murins de la lignée MC3T3-E1 sc14 sont un modèle biologique couramment utilisé dans la recherche sur les biomatériaux, cette lignée a été utilisée. Pour rappel, les cellules MC3T3-E1 sc14 sont une lignée de cellules pré-ostéoblastiques, dérivées de la calvaria de souris embryonnaire, souvent utilisée en recherche en biologie cellulaire et en études de culture cellulaire, en particulier dans le domaine de l'ostéogenèse. Elles sont classiquement utilisées pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la différenciation et la minéralisation des cellules ostéogéniques. Pour que la co-culture soit pertinente, il fallait donc que la lignée endothéliale utilisée soit également d'origine murine et capable de former des tubules en culture, ce qui est le cas des C166.

## IV.2. Discussion sur le choix des matériaux

Au laboratoire, nous élaborons et étudions des CPC à base d'hydroxyapatite. Après revue détaillée de la littérature, nous avons choisi, pour ce travail de thèse, d'analyser deux principales stratégies d'optimisation des CPC : le dopage au silicium et les modifications de la microstructure de la céramique.

Comme explicité dans le paragraphe I.5.4.1 HA dopée au silicium, le silicium agit positivement sur l'ostéogenèse et sur l'angiogenèse, soit de manière directe (par relargage dans le milieu), soit de manière indirecte par modification des propriétés de surface des CPC (307,308,310). Le silicium favorise notamment les interactions cellules endothéliales-cellules ostéogéniques par effet paracrine, en stimulant la libération de facteurs de croissance pro-angiogéniques par les cellules hôtes qui ont migré dans le matériau à la suite des modifications chimiques. La majorité des études *in vitro* ont été réalisées en utilisant des produits de dissolution issus de matériaux contenant du silicium tels que le silicate de calcium (17,309,340). Notre travail est en cela innovant, étudiant des matériaux céramiques à base d'HA dopée au silicium. De plus, comme décrit dans le paragraphe I.5.3.3 Microporosité-Microstructure, la microporosité modifie le comportement cellulaire. En augmentant la surface spécifique et en modifiant d'autres caractéristiques de la surface des CPC, telles que la rugosité et la topographie, la microporosité interfère avec l'adhésion cellulaire (392), la prolifération (393,394) et le devenir des cellules (282). Cependant, ces effets sont variables selon le type de CPC et du type cellulaire étudiés. Nos pastilles de HA et de SiHA ont été frittées différemment pour obtenir soit des matériaux denses, soit des matériaux microporeux. Ces matériaux étaient comparables, en termes de caractéristiques physico-chimiques de surface, rendant possible des conclusions sur l'effet du silicium.

Nous avons donc choisi d'étudier des matériaux en HA pure et en HA dopée au silicium (SiHA), denses ou à un taux de 25% de microporosité ouverte (microporosité interconnectée débouchant à la surface du matériau). Compte-tenu de ses propriétés connues et de son utilisation en clinique, le matériau HA pure et dense a été désigné comme matériau de référence.

Les poudres brutes de HA et de SiHA ont été synthétisées puis calcinées selon le protocole du laboratoire, déjà décrit dans de précédents travaux (395,396). Des pastilles de 10 mm de diamètre ont été mises en forme puis frittées pour obtenir nos quatre matériaux d'étude. Les caractéristiques physico-chimiques des pastilles frittées ont été contrôlées et décrites : les

spectres FTIR<sup>12</sup> (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) ont confirmé la pureté des céramiques, les diffractogrammes DRX ont permis l'analyse de la structure cristalline. Le taux de porosité ouverte était de 22% pour les pHA et de 24% pour les pSiHA. Il était en effet primordial de connaître et de contrôler chaque modification physico-chimique des pastilles, de manière à pouvoir discriminer leurs effets respectifs sur le comportement biologique cellulaire. Les principales caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés sont décrites dans le **Tableau 8**.

---

<sup>12</sup> Outil analytique permettant d'identifier les groupements chimiques dans un matériau et d'étudier leur structure moléculaire

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés

Matériau	Formule chimique	Masse de dopant (% de masse)	Taille des grains ( $\mu\text{m}$ )	Porosité ouverte (%)	Taille des pores ( $\mu\text{m}$ )	Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
<b>dHA</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	NA	0,55	<0,5	NA	0,003
<b>dSi<sub>0.4</sub>HA</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$	1,07%Si	0,55	<0,5	NA	0,009
<b>pHA</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	NA	0,22	22	0,30	4,0
<b>pSi<sub>0.4</sub>HA</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$	1,07%Si	0,19	24	0,45	2,0

### IV.3. Discussion sur les tests *in vitro*

#### IV.3.1. Tests de biocompatibilité

De nombreux régulateurs de l'angiogenèse ont été identifiés, validés et développés sur la base de leurs effets sur la prolifération des cellules endothéliales. Les CE sont parmi les cellules les plus quiescentes de l'organisme, avec des taux de prolifération proches de zéro dans des conditions stables. Ce n'est qu'après stimulation, généralement à la suite d'une blessure, d'une inflammation ou d'un processus pathologique, qu'elles peuvent entrer dans le cycle cellulaire. De nombreuses approches différentes ont été développées pour étudier la prolifération cellulaire. En général, elles comprennent l'évaluation du nombre de cellules ou densité cellulaire (le comptage des cellules est considéré comme le standard de la prolifération), la détection de la synthèse de l'ADN par incorporation d'analogues de nucléotides marqués (ces techniques permettent de déterminer la fraction de cellules en division), la mesure du contenu en ADN, la détection de marqueurs de prolifération (essais de points finaux : la détection de protéines spécifiques, qui agissent de concert pour permettre la progression à travers les différentes étapes de la division cellulaire, généralement par des procédures immunochimiques, permet d'estimer la fraction de cellules en division), et les essais métaboliques (test de réduction du sel de tétrazolium MTT, test à la résazurine) (397).

L'activité métabolique (viabilité) a été évaluée par un test à la résazurine (Alamar Blue). Cette méthode est classiquement utilisée en biologie cellulaire pour évaluer la viabilité cellulaire et la prolifération. La résazurine est un indicateur de la viabilité cellulaire. Lorsqu'elle est ajoutée à un milieu de culture contenant des cellules, la résazurine est réduite par les cellules vivantes métaboliquement actives en une substance fluorescente appelée résorufine. Ainsi, en mesurant la fluorescence produite par la résorufine, une estimation du nombre de cellules vivantes dans l'échantillon peut être faite. L'activité métabolique avait globalement augmenté (augmentation constante de la population cellulaire) de J1 à J7 sur tous les matériaux, qui étaient donc tous biocompatibles, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (391,398). Il a été observé une tendance plus faible sur les céramiques poreuses que sur les denses.

De la même manière, la densité cellulaire augmentait dans le temps jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence à J7. Il n'a pas été observé de trace de mort cellulaire suspecte (pas de noyau condensé). Il a été observé une densité cellulaire plus importante sur les matériaux denses aux temps courts (par probable adhésion diminuée sur les matériaux poreux), puis une densité comparable entre dense et poreux à J7, en raison d'une croissance cellulaire continue jusqu'à confluence.

Les mêmes tendances étaient retrouvées pour la prolifération à 24h qui était significativement réduite sur les échantillons poreux par rapport aux denses. La microporosité affecterait donc la capacité des cellules à proliférer ce qui est cohérent avec des travaux menés précédemment au laboratoire sur le comportement de la lignée pré-ostéoblastique MC3T3-E1 sc14 à la surface de matériaux céramiques denses et poreux (Thèse de Marie-Michèle Germaini (399)). Cependant, les lignées cellulaires dont les C166 ayant un statut hautement prolifératif, il n'y avait par la suite pas de différence en termes de prolifération selon les conditions.

Le paramètre le plus influant sur la réponse des cellules était donc la microstructure, le dopage au silicium n'affectait pas ces propriétés cellulaires. La microporosité, en modifiant les propriétés de surface, et principalement la surface spécifique et la rugosité, influence l'activité cellulaire.

Dans la littérature, d'autres auteurs ont souligné l'effet plutôt positif de la microporosité et notamment Rouahi qui a démontré que la microporosité, en augmentant la surface spécifique, favorisait l'absorption des protéines à partir du milieu de culture et par la même l'adhésion des cellules osseuses SaOs-2, comme présenté dans le **Tableau 2** (276).

#### **IV.3.2. Expression des marqueurs angiogéniques**

L'expression de protéines associées au statut angiogénique des cellules endothéliales a été recherchée par différents tests.

Tout d'abord, l'expression du facteur de croissance principal angiogénique et vasculogénique clé VEGF-A isoforme 164 a été dosée. A J7, il existait une différence significative entre les surnageants référence (plastique) et ceux des céramiques, sans différence en fonction de l'architecture ou de la composition chimique de ces dernières.

Il est intéressant de noter que, à partir de 72 heures, il existait une tendance à une plus grande sécrétion de VEGF-A sur toutes les céramiques par rapport à la boîte de culture en polystyrène. L'augmentation de la sécrétion de VEGF-A sur les céramiques est devenue significative après 168 h (7 jours), ce qui indique un potentiel pro-angiogénique des céramiques à base de phosphate de calcium par un effet auto et paracrine, comme l'ont observé Chen et al. sur différentes céramiques de phosphate de calcium, y compris l'HA (391). Bien qu'il n'y ait pas de différences statistiquement significatives entre les conditions, nous avons remarqué une tendance vers une plus grande production de VEGF-A par les cellules se développant sur les surfaces céramiques microporeuses. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les milieux ont été supplémentés en SVF (sérum de veau fœtal), contenant des protéines adhésives et des facteurs de croissance, parmi lesquels des facteurs pro-angiogéniques. Comme présenté dans le paragraphe I.5.3.3 Microporosité-Microstructure, les céramiques microporeuses ont une capacité d'absorption des protéines plus élevée, ce qui augmenterait la probabilité d'interaction entre les cellules et le matériau.

Puis, en western-blot, il a été retrouvé un signal pour les formes pro- et actives de MMP9, sans différence significative en fonction de la porosité ou de la composition chimique.

Enfin, l'expression des marqueurs angiogéniques MMP9 et VEGFR-2 (principal récepteur du VEGF-A) a été recherchée par immunofluorescence. MMP9 était essentiellement intracytoplasmique, et sans différence en fonction des conditions, ce qui est cohérent avec les résultats du Western-blot. Cette protéine n'était pas exprimée par toutes les cellules, ou du moins pas avec la même intensité. VEGFR-2 a également été détecté en intracytoplasmique, dans toutes les cellules, sans différence apparente en fonction des conditions, mais avec des difficultés de détection en raison de bruit de fond important sur les pastilles poreuses.

Les CPC exercent donc un effet angiogénique positif, sans différence significative en fonction de la composition chimique ou de la microarchitecture.

#### **IV.3.3. Tubulogénèse *in vitro***

L'émergence de réseaux vasculaires par vasculogénèse ou angiogénèse nécessite l'association de cellules en tubes 3D stables dans un processus qui implique la différenciation, la migration, la prolifération, l'agrégation et le réarrangement de ces cellules pour former des cordons qui subissent ensuite la formation d'une lumière (397).

La tubulogénèse *in vitro*, mime les événements survenant lors de l'angiogénèse, à l'échelle des cellules endothéliales lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement 3D mimant une

MEC. L'environnement 3D classiquement utilisé est un hydrogel de type Matrigel® ou gel de collagène.

Une partie de ce travail de thèse a consisté au développement d'une méthode expérimentale d'évaluation de la tubulogenèse *in vitro* adaptée au CPC. En effet, peu d'études à ce sujet ont été retrouvées dans la littérature. À cette fin, un protocole utilisant une couche de gel à base de fibrine a été élaboré. Le gel de fibrine est fréquemment utilisé comme substrat de culture cellulaire en raison de ses propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité et de capacité à imiter certaines caractéristiques de la matrice extracellulaire naturelle. La fibrine est une protéine adhésive participant à la formation des caillots sanguins. Elle est naturellement présente dans l'environnement des cellules endothéliales. Elle est impliquée dans le processus de coagulation sanguine et la formation de vaisseaux sanguins. Par conséquent, le gel de fibrine peut être utilisé pour étudier la néo-angiogenèse et la formation de réseaux vasculaires *in vitro*, ce qui est pertinent pour de nombreuses applications biomédicales, notamment en ingénierie tissulaire. Dans le cadre de l'étude de la tubulogenèse *in vitro*, l'utilisation de gel de fibrine nous a paru pertinente pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le gel de fibrine fournit un environnement tridimensionnel similaire à la MEC naturelle, ce qui permet aux cellules de s'organiser et de se différencier de manière plus proche de ce qui se produit *in vivo* (400). Ensuite, il peut être modulé (en augmentant la concentration de fibrine) pour contrôler la migration cellulaire, ce qui est crucial pour la formation de structures tubulaires. Il peut être utilisé pour étudier comment différents facteurs influencent la migration des cellules et leur capacité à former des tubes. Il permet donc d'appréhender la régulation de la migration cellulaire. En effet, son utilisation est simple et reproductible. Composé d'une protéine unique, la fibrine, la composition de ce gel est ainsi très contrôlée. C'est un avantage certain par rapport au Matrigel® qui mime une MEC de type lame basale. Sa reproductibilité est plus faible du fait de sa variabilité lot à lot et du grand nombre de facteurs de croissance et de molécules de régulation qu'il contient. En outre, le gel de fibrine permet également d'étudier les interactions entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et la matrice extracellulaire. Cela peut fournir des informations précieuses sur les mécanismes sous-jacents à la tubulogenèse, y compris les signaux de communication cellulaire et les voies de signalisation impliquées.

Il nous a paru primordial de développer une méthode permettant de distinguer l'influence de la composition chimique de celle de la conception microarchitecturale de l'échafaudage céramique. Deux essais différents ont donc été réalisés (**Figure 41**) : une première configuration (configuration 1) dans laquelle les cellules ont étéensemencées directement au contact de la surface biocéramique, sous le gel de fibrine apportant l'environnement tridimensionnel favorable à la mise en place du processus de tubulogenèse. Cette configuration permet d'étudier l'influence des conceptions chimiques et micro-architecturales de la surface céramique (effet des paramètres physico-chimiques de surface sur les cellules). Dans une seconde configuration (configuration 2), les cellules ont étéensemencées au-dessus du gel de fibrine, donc à distance de la surface du matériau, pour étudier plus

spécifiquement l'influence des produits de dissolution (en temps réel) de la céramique dans le milieu de culture.

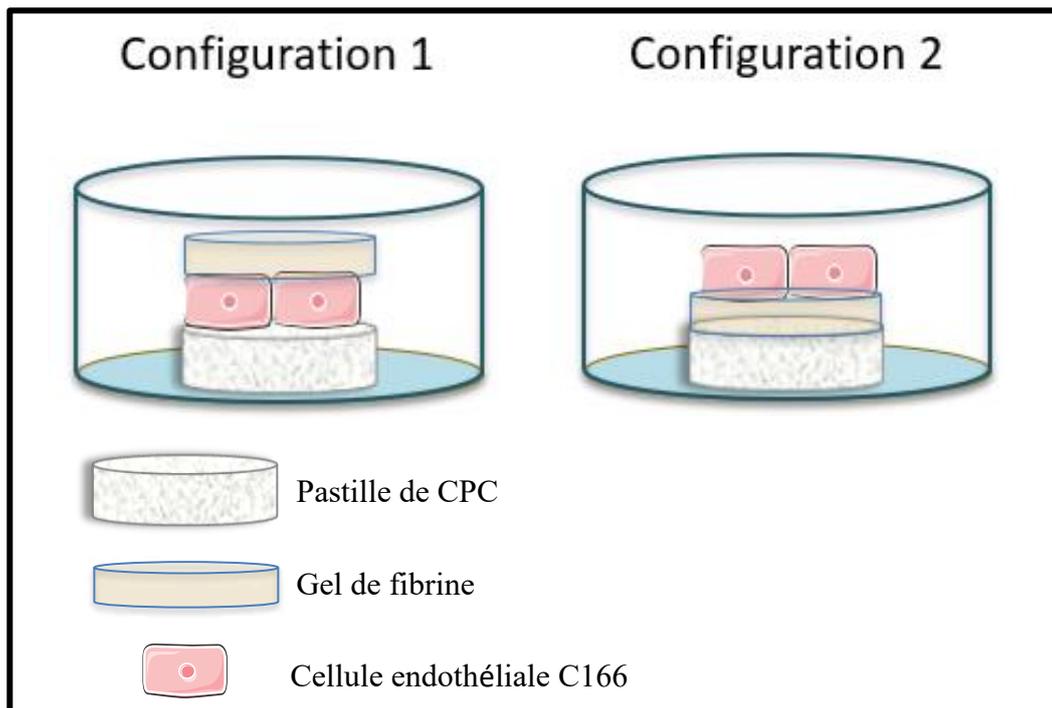


Figure 41 : Deux configurations du modèle de tubulogenèse *in vitro*

Dans toutes les conditions et les différentes configurations, il a été observé une certaine organisation cellulaire due à l'environnement 3D ; et non un simple tapis cellulaire à la surface des matériaux. Il a été observé la formation de structures tubulaires sur les pastilles denses, et une organisation en motif alvéolaire sur les pastilles poreuses. Les structures tubulaires étaient positives aux marqueurs endothéliaux MMP9 et VEGFR-2. Ceci est un argument fort pour affirmer que ces structures sont bien des tubules.

De telles structures tubulaires, positives aux marqueurs vasculaires PECAM, vWF1, VE-cadhérine et VEGFR-2, ont été mises en évidence par Zhang et al. dans un gel de fibrine PEGylé ensemencé avec des MSC, qui ont donc évolué vers un phénotype de cellule endothéliale (401). Cette organisation est influencée par la microstructure, mais pas par la composition chimique (pas d'effet du silicium). Des résultats très similaires ont été observés dans les deux configurations consacrées à la distinction de l'impact des paramètres chimiques de ceux liés aux caractéristiques physiques. Il a également été observé des cellules avec des morphologies de type « tip-cells », ce qui suggère un processus proche de celui de l'angiogenèse (**Figure 42**). Rappelons que les « tip-cells » sont des cellules qui émettent des prolongements afin de s'orienter, de s'organiser et de guider l'angiogenèse. Les C166 sont donc capables de réaliser de la tubulogenèse *in vitro* dans des conditions d'induction de l'angiogenèse.

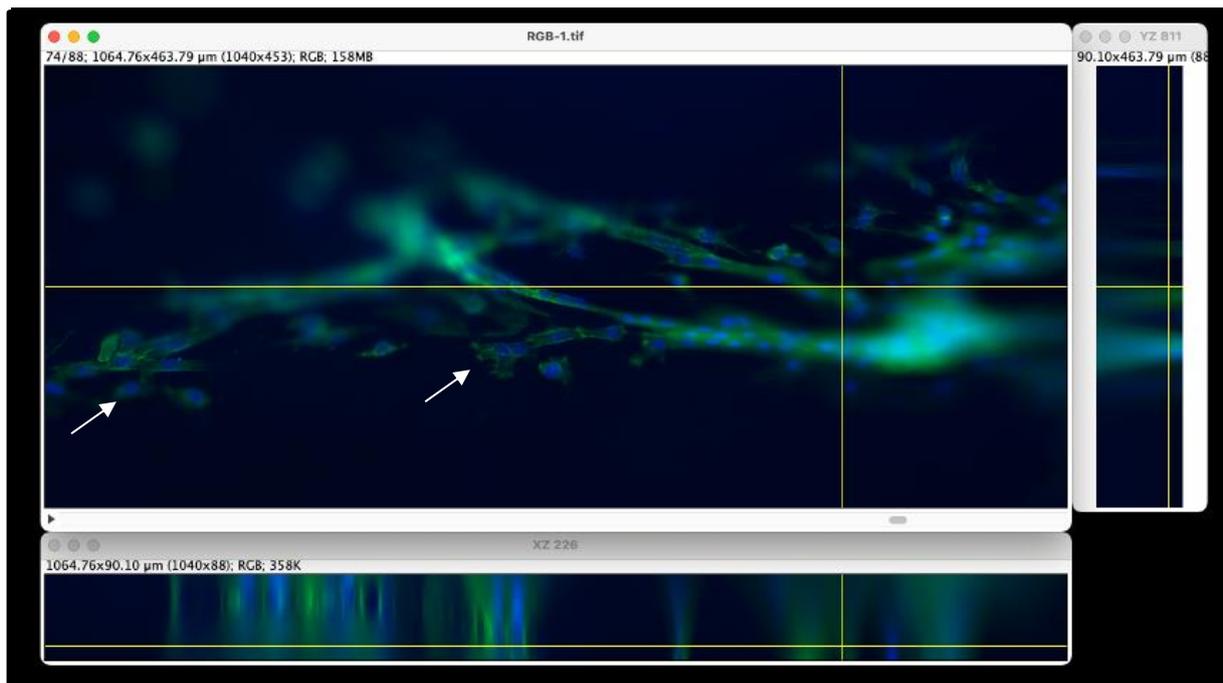


Figure 42 : Tubules observés en épifluorescence : observation de cellules à morphologie de tip-cell (flèches blanches)

Les C166 sont ainsi capables de tubulogenèse à la surface de nos matériaux, fortement influencé par la microarchitecture. Les matériaux denses semblent donc être plus favorables au processus de tubulogenèse. Cependant, le motif "alvéolaire" suggère un réarrangement cellulaire et ne signifie pas que les cellules sont inactives lorsqu'elles sont cultivées sur des microstructures microporeuses. Par conséquent, le mécanisme par lequel la céramique affecte le comportement des cellules passe par les paramètres physiques de surface associés à la microstructure, mais il est possible que le signal final soit de nature chimique. Pour déterminer si cela est le cas, une comparaison des milieux conditionnés a été effectuée.

En résumé, l'utilisation du gel de fibrine pour étudier la tubulogenèse *in vitro* offre un modèle expérimental pertinent et flexible pour explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à ce processus biologique complexe. Il permet de créer un environnement 3D offrant la possibilité aux cellules de former un réseau vasculaire, organisation qui n'est pas retrouvée dans une culture classique. Cela peut avoir des implications importantes pour la recherche fondamentale sur le développement tissulaire ainsi que pour le développement de thérapies et de stratégies de régénération tissulaire. Cependant, notre observation n'a été que qualitative. L'évolution de ce modèle pourrait permettre la réalisation de photographies standardisées et ainsi une analyse quantitative.

#### IV.3.4. Étude de la dissolution des céramiques

##### IV.3.4.1. Dosages ioniques

Les CPC interagissent avec leurs milieux environnants, notamment par échanges ioniques. Il a été retrouvé des concentrations de calcium très proches dans les milieux des pastilles denses par rapport au milieu de référence, ce qui suggère l'établissement d'un équilibre « apparent » chimique, et ce indépendamment de la présence de cellules ou non. Pour les céramiques poreuses, la concentration de calcium dans le milieu a été drastiquement diminuée (de moitié) par rapport aux céramiques denses ou au milieu de référence après 3

jours d'immersion. Les mêmes observations ont été faites avec les concentrations de phosphore. Cela pourrait être expliqué par une absorption des ions à la surface des céramiques et principalement des céramiques poreuses dont la surface spécifique est augmentée, comme décrit dans le **Tableau 8**. Les cations calcium et le phosphore (sous forme d'orthophosphates) pourraient se trouver dans une couche hydratée non cristalline contenant des ions mobiles à la surface des cristaux d'apatites en milieu aqueux, qui se retrouvent également à la surface des apatites biologiques, pouvant expliquer leur exceptionnelle réactivité de surface, comme décrit par Drouet et al. (402). En solution, les céramiques sont le lieu de réactions de précipitation-dissolution, et de réorganisation de leur surface.

Concernant les céramiques dopées au silicium, il a été observé une libération continue de silicium dans le milieu. La quantité de silicium libérée par les céramiques poreuses est beaucoup plus importante que celle libérée par les céramiques denses, avec ou sans cellules. Ceci est probablement également dû à l'augmentation de la surface spécifique des pastilles poreuses. Comme rappelé dans le paragraphe I.5.4.1.1. Le rôle biologique du silicium, le silicium est impliqué dans la croissance osseuse et dans la minéralisation. Dans l'organisme, le silicium est évacué par voie fécale. Sa forme bioactive solubilisée, appelé acide silicique, est excrétée par voie urinaire. Il n'y a pas de surdosage en silicium décrit dans la littérature. Les CPC dopées au silicium sont déjà actuellement utilisées en reconstruction osseuse, sans aucune toxicité décrite (317). Contrairement au calcium ou au phosphore, le silicium ne participe pas à la formation d'une apatite biologique ou d'une couche hydratée précipitée à la surface de l'HA. Lorsqu'il est libéré par dissolution (notamment par les céramiques poreuses), il n'est donc pas reprécipité, et en conséquence sa concentration en solution ne peut qu'augmenter.

#### **IV.3.4.2. Effet des produits de dissolution sur la migration cellulaire**

La migration des cellules endothéliales est essentielle pour stimuler la formation des vaisseaux. En fonction de la question scientifique spécifique, une gamme de tests est disponible pour évaluer quantitativement et qualitativement la migration cellulaire. Les essais les plus largement utilisés comprennent des variantes des essais de fermeture de lésion du tapis cellulaire et des essais en chambre de Boyden (ou transwell) (397). Les essais de fermeture de lésion en culture cellulaire (migration latérale) sont réalisés pour étudier l'effet pro- ou anti-migratoire des composés (substrats). L'essai de fermeture de la lésion en culture cellulaire est l'un des indicateurs de base pour caractériser l'activité migratoire des cellules. L'essai de migration cellulaire en chambre de Boyden est un outil utile pour étudier la chimiotaxie et l'invasion cellulaire.

Dans nos précédentes expérimentations, nous avons prouvé une influence de la microporosité sur le comportement angiogénique des C166. Cependant, il est difficile de conclure si cet effet est direct, ou indirect (la microporosité modifie la composition chimique des milieux de dissolution). Pour cela, nous avons réalisé un test de fermeture de lésion du tapis cellulaire qui a mis en évidence des fermetures plus rapides des blessures réalisées dans le tapis cellulaire en présence des produits de dissolution des céramiques denses (par rapport aux poreuses), et plus rapide (lors de la phase linéaire de la fermeture) dans le cas de ceux issus des céramiques SiHA denses. En effet, le test de cicatrisation, qui reflète l'activation des cellules endothéliales caractérisée par une capacité accrue à proliférer et à migrer, a démontré que les produits de dissolution des substrats microporeux ralentissaient la fermeture de la lésion. La présence de silicium semble favorable à la fermeture de la lésion sur les matériaux denses (différence significative entre le dHA et le dSiHA), mais pas sur les matériaux poreux

(pHA vs. pSiHA). Cette différence significative n'a pas été perçue lorsque les vitesses de fermeture ont été comparées. Par conséquent, dans ces conditions, il n'est pas possible de conclure à un effet stimulant du silicium sur les cellules endothéliales C166. Ce résultat pourrait être mis en lien avec une activité cellulaire consommant de l'énergie plus importante à J7 pour les cellules cultivées à la surface des dSiHA, alors que parallèlement il n'a pas été mis en évidence de différence en termes de prolifération (EdU et densité cellulaire).

Le test de fermeture de lésion du tapis cellulaire ne discrimine pas totalement les comportements de migration de ceux de prolifération car les deux phénomènes co-existent pour obtenir la fermeture de la lésion. Cependant, dans notre cas, compte-tenu de la réalisation d'un time lapse avec des photos prises toutes les heures il serait tout à fait possible d'effectuer un tracking des cellules pour étudier plus spécifiquement la migration. Une autre solution pour étudier seulement la migration serait de réaliser les essais en utilisant une drogue de type mitomycine pour inhiber la prolifération permettant de conclure uniquement sur la migration. Il est également possible de croiser les résultats avec ceux obtenus en EdU.

Ces résultats confirment que la microporosité a une influence négative sur l'activité migratoire et proliférative des cellules endothéliales C166 par le biais d'un mécanisme chimique. Les effets dus à la microporosité sont visibles à partir de 6 heures. Ceci est probablement la conséquence de la diminution du taux de calcium en solution dans le milieu de dissolution. Pour valider cette hypothèse, nous avons réalisé un nouveau test de fermeture de blessure en modélisant uniquement la réduction de la concentration de calcium en solution sur la base des résultats obtenus suite aux dosages élémentaires par ICP-OES. Pour cela du milieu de culture sans calcium a été utilisé et la concentration en calcium a été ajustée par ajout de  $\text{CaCl}_2$  avant de supplémenter le milieu de manière identique à celui utilisé pour l'obtention des produits de dissolution. Les résultats ainsi obtenus, à savoir plus la concentration de calcium dans le milieu était faible, plus la fermeture de la plaie était lente, ont confirmé le rôle de la diminution du taux de calcium en solution sur le ralentissement de la fermeture de la blessure par des phénomènes de migration/prolifération.

Cet effet a déjà été constaté dans de précédentes études *in vitro* (222) sur des cellules endothéliales murines SVEC4-10. Les auteurs montrent qu'une diminution de la concentration en calcium à environ 52 mg/L (1,3 mM), par rapport à un milieu initial de 62 mg/L (1,55 mM), entraîne une réduction de près de 50% de la taille du réseau vasculaire dans une matrice de collagène. Cela suggère l'existence de concentrations extracellulaires de calcium plus favorables à l'angiogenèse (222).

Par conséquent, la modification de la disponibilité du calcium est très probablement l'élément causal expliquant comment la microstructure affecte la physiologie des cellules C166. Comme mentionné dans le paragraphe I.4.3.3. L'effet des CPC sur les cellules endothéliales, le calcium ionisé intracellulaire est un second messenger crucial pour l'accomplissement de l'angiogenèse conduite par les cellules endothéliales exposées à des signaux pro-angiogéniques comme le VEGF-A (403). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules endothéliales vasculaires est également favorisée par des stimuli angiogéniques. Le ciblage de l'entrée du calcium dans les cellules endothéliales est une stratégie de prévention de l'angiogenèse tumorale (404), et plusieurs canaux calciques transitoires sont impliqués dans l'angiogenèse induite par le VEGF (405).

Une telle situation ne peut être raisonnablement imaginée *in vivo*, en raison du flux permanent des fluides corporels interstitiels et de la circulation sanguine et de la régulation très contrôlée de la calcémie, c'est-à-dire la concentration sérique en calcium. On peut donc émettre

l'hypothèse que les résultats obtenus dans notre étude sont des conséquences de la culture statique en 2D. Cette observation est particulièrement importante, car la culture en 2D est un moyen habituel et simple pour mener des expériences préliminaires afin de caractériser les propriétés biologiques des biomatériaux, y compris les céramiques bioactives.

#### **IV.4. Discussion sur les co-cultures**

L'étude de la communication entre cellules endothéliales et ostéogéniques et le développement d'un modèle fonctionnel de co-culture semblent pertinent. Dans notre modèle, la co-culture de cellules endothéliales C166 et de cellules ostéogéniques MC3T3-E1 sc14 était bénéfique sur l'activité cellulaire : prolifération, migration, organisation cellulaire et formation d'un réseau d'actine. L'effet co-stimulateur de ces lignées cellulaires cultivées ensemble a déjà été démontré dans la littérature (357,358). La co-culture de cellules C166 et MC3T3-E1 sc14, en particulier à certains ratios et dans des conditions spécifiques de culture, favorise la formation de structures tridimensionnelles et la régulation de facteurs angiogéniques essentiels comme le VEGF, avec des implications potentielles pour la régénération tissulaire et l'angiogenèse. nos résultats indiquent qu'en co-culture, il n'y a pas eu de stimulation significative de l'expression des gènes endothéliaux et osseux étudiés par rapport aux monocultures. Il est possible que la présence des deux types cellulaires n'ait pas eu d'effet synergique sur l'expression de ces gènes dans ce contexte spécifique. De plus, les observations sur l'expression de RUNX2 suggèrent une possible régulation temporelle de l'expression génique liée à la différenciation des ostéoblastes. Il semble difficile de conclure avec certitude sur le ratio de co-culture le plus favorable à la fois pour l'angiogenèse et l'ostéogenèse avec les types cellulaires utilisés dans nos expérimentations. Les ratios 2C166 :1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 semblent les plus prometteurs, mais il est compliqué de les discriminer en termes d'efficacité.

Dans la continuité, il serait pertinent de réaliser des cultures en bioréacteur. Ce système de culture permet une croissance cellulaire plus physiologique, formant des structures tridimensionnelles qui se rapprochent davantage de leur environnement naturel *in vivo*. Cette culture 3D dynamique permet de mieux modéliser les interactions cellulaires et tissulaires dans des conditions plus proches de l'environnement *in vivo*.

De plus, l'utilisation de co-cultures dans notre modèle de tubulogenèse *in vitro* permettant de soutenir l'assemblage des cellules endothéliales en structures capillaires, nous paraît extrêmement judicieux. Nos études préliminaires de co-cultures de cellules endothéliales-cellules ostéogéniques dans un gel de fibrine nous ont permis de maîtriser cette co-culture et de dégager un ratio intéressant. La prochaine étape est la validation de notre modèle de tubulogenèse *in vitro* sur CPC en co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques.

## Conclusion générale et perspectives

---

### Conclusion générale

Le premier objectif de ce travail de thèse était l'étude des réponses cellulaires des cellules endothéliales aux CPC. Il consistait à développer un protocole *in vitro* fiable pour évaluer le statut angiogénique des cellules endothéliales directement sur des biomatériaux par un essai de tubulogenèse et de valider ce protocole en étudiant l'impact de la microporosité et de la composition chimique des céramiques à base d'HA sur le comportement des cellules endothéliales C166. A cette fin, quatre matériaux céramiques, différant par leur composition chimique (HA vs. SiHA) et par leur microstructure (dHA et dSiHA vs. pHA et pSiHA), ont été produites et testées. Avant d'effectuer l'essai de tubulogenèse, l'adhésion et la prolifération des cellules C166 à la surface de la céramique ont été évaluées pendant 7 jours. Les cellules C166 ont adhéré significativement mieux aux surfaces denses qu'aux surfaces microporeuses, et avaient un meilleur taux de prolifération après 24 h sur les surfaces denses, bien que ce dernier soit à prendre avec précaution en raison de l'immortalité des cellules C166 (lignée cellulaire). L'activité métabolique des cellules C166 a été significativement altérée sur les CPC poreuses dans les expériences réalisées avec des durées plus longues.

La production de protéines pro-angiogéniques par les cellules C166 a ensuite été évaluée. Les cellules C166 cultivées à la surface de la céramique ont présenté une production significativement plus élevée du facteur de croissance pro-angiogénique VEGF-A (jusqu'au double) par rapport aux cellules cultivées sur la surface en plastique des boîtes de culture conventionnelles. Avec le temps, la production de VEGF-A a eu tendance à être plus élevée (de manière non significative) pour les cellules à la surface des céramiques poreuses par rapport aux cellules sur les céramiques denses. Cependant, il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour d'autres protéines angiogéniques telles que MMP9 ou VEGFR-2 (par immunofluorescence ou western-blot).

La présence de silicium n'a pas eu d'impact sur les paramètres cellulaires étudiés. La microporosité semble donc être le principal paramètre affectant les cellules C166 à cette étape. Compte tenu des données de la littérature, l'impact de la microporosité sur les cellules C166 pourrait être dû à des facteurs physiques : augmentation de la rugosité (adhérence et prolifération) et amélioration de l'absorption des protéines (production de VEGF-A) par augmentation de la surface spécifique.

Nous avons développé une procédure qualitative fiable pour évaluer directement la tubulogenèse à la surface des biomatériaux à l'aide d'un gel de fibrine selon deux configurations en fonction de la position des cellules par rapport à la surface de la céramique. L'idée sous-jacente était de discriminer les effets dus à la chimie de la céramique (dopage au silicium) de ceux provenant de ses paramètres physico-chimiques, principalement la microporosité dans ce cas. Des structures en forme de tubes ont été observées après 7 jours, ce qui indique que l'essai est informatif. Dans les deux configurations, les structures tubulaires ont été moins fréquentes (observation qualitative) à la surface des céramiques microporeuses pour lesquelles il a plutôt été observé une organisation alvéolaire.

L'analyse des produits de dissolution des céramiques et leur impact sur la capacité des cellules C166 à proliférer et à migrer à partir d'un essai de cicatrisation (fermeture de blessure) a mis en évidence que l'impact négatif de la microporosité sur les cellules C166 était d'origine chimique. En effet, il semble être dû à une réduction du calcium soluble dans les fluides

environnants de la cellule (milieu de culture), calcium qui serait absorbé sur la céramique de manière plus importante par les céramiques poreuses. Ceci a été validé par la modélisation de ce phénomène en faisant varier la concentration en calcium dans le milieu de culture.

Ce travail, réalisé uniquement sur une lignée de cellules endothéliales, visait à démontrer l'influence des propriétés de surface des biocéramiques, en particulier sur les cellules responsables de la vascularisation du biomatériau. Il a permis de démontrer que les cellules endothéliales C166 étaient sensibles à la microporosité. Les mécanismes d'action sont probablement multiples : par augmentation de la rugosité ; par piégeage du calcium du milieu de culture, créant ainsi une situation artificielle de déplétion calcique; et par augmentation de l'absorption des protéines du milieu de culture. La microporosité affecte ainsi la disponibilité des facteurs angiogéniques contenus dans l'environnement proche des cellules. Ces résultats nous paraissent essentiels pour la compréhension et la rationalisation de la recherche sur la conception des biocéramiques afin d'accroître leurs propriétés biologiques. Ils soulignent l'importance de comprendre les phénomènes se produisant à l'interface entre les cellules et les biomatériaux, et montrent que chaque paramètre chimique ou physique est perçu par les cellules et peut interférer avec le résultat escompté.

Le second second objectif de ce travail consistait à établir et valider un modèle biologique de co-culture de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques *in vitro* permettant l'évaluation pertinente de propriétés biologiques des matériaux. Par le biais du modèle de tubulogenèse élaboré précédemment, les réponses cellulaires de co-cultures de cellules endothéliales et de cellules ostéogéniques *in vitro* ont été évaluées, ce qui a conduit à dégager un ratio cellules endothéliales / cellules ostéogéniques efficace pour promouvoir au mieux l'angiogenèse et l'ostéogenèse *in vitro*. L'objectif était d'établir *in vitro* un modèle cellulaire caractéristique du microenvironnement osseux défini par l'identification de structures tissulaires spécifiques, principalement une matrice extracellulaire minéralisée et des cellules endothéliales organisées en tubules.

La prolifération était augmentée en co-culture (cellules endothéliales C166 / cellules ostéogéniques MC3T3 sc14) au ratio 2C166 :1MC3T3 sc14 par rapport à une monoculture de C166. Notre modèle de co-culture dans un gel de fibrine a permis d'observer un réseau de structures type microcapillaires à J7, sans qu'une quantification soit possible. La minéralisation de la MEC était augmentée en co-culture aux ratios 2C166 :1MC3T3 sc14 et 1C166 : 2MC3T3 sc14 par rapport à la monoculture de MC3T3-E1 sc14. A ces mêmes ratios, la protéine d'adhésion PECAM et la protéine de résistance mécanique de la MEC collagène I étaient fortement exprimées. Il a été mis en évidence l'expression de gènes endothéliaux (vWF1 et eNOS) et de gènes ostéogéniques (RUNX2 et collagène I) en co-culture. Au total, les ratios de co-culture les plus pertinents semblent être 2C166 :1MC3T3 sc14 et 1C166 : 2MC3T3 sc14.

## Perspectives

Notre modèle d'évaluation de la tubulogenèse *in vitro* sur les CPC pourra être amélioré tout d'abord par des analyses quantitatives en utilisant l'imagerie microscopique et l'analyse informatique adaptées. Pour les images obtenues par microscopie à fluorescence, des techniques d'analyse spécifiques peuvent être utilisées pour quantifier l'intensité, la localisation et la distribution des signaux fluorescents dans l'image. Des analyses qualitatives plus pertinentes seraient ainsi obtenues. Cependant, la microscopie à fluorescence ne permet de réaliser des images qu'avec un champ large, et à l'échelle du tube. L'environnement 3D

créé par la fibrine avait une certaine épaisseur qui pouvait gêner l'observation que ce soit au microscope à épifluorescence, au microscope confocal ainsi qu'au microscope électronique à balayage. Une solution a été l'observation au microscope biphotonique cependant les acquisitions des images étaient longues et la longueur d'ondes rouge non visualisable. Le microscope confocal semble une piste pertinente à développer, il offre un champ d'observation large permettant de quantifier les tubules dans les puits. Il fournit également la possibilité d'acquisition en 3D avec la visualisation d'une lumière dans les tubules.

De plus, l'utilisation de co-cultures dans notre modèle de tubulogenèse *in vitro* permettant de soutenir l'assemblage des cellules endothéliales en structures capillaires, nous paraît extrêmement judicieux. Nos études préliminaires de co-cultures de cellules endothéliales-cellules ostéogéniques dans un gel de fibrine nous ont permis de maîtriser cette co-culture et de dégager un ratio intéressant. La prochaine étape est la validation de notre modèle de tubulogenèse *in vitro* sur CPC en co-culture cellules endothéliales / cellules ostéogéniques

Des perspectives sont également envisagées concernant le choix des cellules. Pour pallier les obstacles dûs à la nature de nos cellules, notamment endothéliales, qui sont issues d'une lignée immortalisée, l'utilisation de cellules endothéliales primaires est indispensable. Leur utilisation présente quelques défis techniques et logistiques en fonction de la source choisie. Les cultures primaires peuvent être plus difficiles à établir et à maintenir en culture par rapport aux lignées cellulaires établies. Elles nécessitent souvent des conditions de culture spécifiques et des protocoles de manipulation délicats. Elles peuvent également présenter une variabilité interindividuelle, car les tissus sont prélevés à partir de patients différents. Cela peut rendre difficile la comparaison entre différentes expériences et nécessiter des échantillons provenant de plusieurs individus pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. En outre, elles ont une durée de vie limitée en culture, ce qui limite leurs passages et nécessite un réapprovisionnement régulier en cellules « fraîches ». Enfin, établir et maintenir des cultures primaires peut être plus coûteux que l'utilisation de lignées cellulaires établies, en raison des exigences en termes de temps, de matériel et de main-d'œuvre.

Cependant, les cultures primaires reflètent plus fidèlement le comportement biologique *in vivo* que les lignées cellulaires établies, car elles conservent les caractéristiques spécifiques des cellules d'origine. A noter que, l'absence de flux en culture statique tend à standardiser le phénotype des cellules endothéliales, quel que soit le tissu vasculaire/artériel d'origine. La culture en flux dynamique serait alors très pertinente. En outre, elles permettent de reproduire les réponses physiologiques de manière plus précise que les lignées cellulaires immortalisées, ce qui rend leur utilisation intéressante pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires complexes. Enfin, selon les tissus prélevés, l'extraction peut contenir plusieurs types cellulaires différents (co-culture), ce qui permet d'étudier les interactions entre cellules dans un environnement plus représentatif du réel.

Un stage de M1 est actuellement en cours au laboratoire dans la continuité de mes travaux de thèse avec l'utilisation d'HUVEC poolées. Ces lots standardisés d'HUVEC contenant des cellules issues de plusieurs patients permettent d'atténuer l'effet patient et la variabilité interindividuelle décrite plus haut.

Les démarches nécessaires pour réaliser les extractions à partir de tissu de patients ont été réalisées en 2019 : Autorisation n° 312-2019-78 en date du 12/09/2019 du comité d'éthique du CHU de Limoges, cellules enregistrées au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du

CHU de Limoges dirigé par le Dr Françoise Esclaire dans le respect des exigences réglementaires, déclaration CODECOH n°DC-2008-604. Ainsi, après leur consentement, nous réalisons des prélèvements de tissus (déchets chirurgicaux) au bloc opératoire sur les patients opérés dans le service de chirurgie maxillo-faciale du CHU de Limoges. Actuellement, le protocole est validé pour l'extraction des MSC à partir de tissu adipeux. Il est en cours de transposition pour les cellules endothéliales.

Cette étude met également en évidence un biais important de l'expérimentation *in vitro* en 2D statique, qui doit être pris en compte dans la conception des expériences futures. Ainsi, les conditions de culture dynamique en 3D que nous sommes en train de mettre en place seront très instructives pour les conclusions soulevées ici. En effet, nous disposons au laboratoire d'un bioréacteur. Ce système, conçu pour cultiver des cellules ou des tissus, permet une croissance cellulaire plus physiologique, formant des structures tridimensionnelles qui se rapprochent davantage de leur environnement naturel *in vivo*. Le bioréacteur fournit un environnement contrôlé qui peut inclure la régulation de facteurs tels que la température, le pH, la concentration en oxygène, le débit de nutriments et d'autres paramètres. Il peut également faciliter la perfusion des milieux de culture à travers les échantillons tridimensionnels poreux, permettant ainsi un approvisionnement en nutriments et en oxygène ; ainsi qu'une élimination des déchets cellulaire plus efficaces. Cette culture en 3D dynamique permet de mieux modéliser les interactions cellulaires et tissulaires dans des conditions plus proches de l'environnement *in vivo* (242).

D'autres expérimentations permettant d'évaluer l'angiogenèse pourraient être envisagées sur nos CPC. Le modèle de la CAM est un modèle biologique *ex ovo* principalement développé pour tester les propriétés pro- ou anti-angiogéniques de composés chimiques ou de processus tumoraux (406). Dans notre contexte, il a permis d'analyser la vascularisation au niveau de pastilles de SiHA et les effets de la géométrie des pores sur le guidage vasculaire. L'analyse d'images d'implants vascularisés permet d'évaluer la densité vasculaire, la dimension fractale et le diamètre des vaisseaux sanguins à deux échelles différentes (la céramique entière et les pores seuls) (257). Il semblerait intéressant de comparer ces paramètres pour nos quatre biomatériaux en les déposant sur le modèle de la CAM.

Deux autres modèles *ex vivo* sont également décrits pour étudier les effets angiogéniques. Le test de l'anneau aortique chez le rat est utilisé pour évaluer le potentiel angiogénique des cellules *ex vivo* (407). Il est l'un des protocoles les plus largement utilisés pour étudier l'angiogenèse par bourgeonnement. Il s'agit d'une méthode très adaptable qui peut être utilisée pour étudier les effets de différents facteurs de croissance, de médicaments à petites molécules et de modifications génétiques sur le bourgeonnement vasculaire dans un contexte physiologiquement pertinent (408). Même s'il est moins connu que d'autres tests d'angiogenèse, le test de l'explant d'allantoïne murine représente un outil puissant pour étudier les mécanismes généraux de formation des vaisseaux sanguins, y compris le remodelage d'un plexus vasculaire primitif, la différenciation des angioblastes, le destin artériel et veineux, l'angiogenèse de bourgeonnement et la maturation du réseau capillaire par le recrutement de cellules murales (397). Ces deux tests pourraient être appliqués à l'étude de la vascularisation sur les CPC.

Enfin, notre travail doit être poursuivi par des expérimentations *in vivo*. Dans un premier temps, l'objectif serait l'implantation de nos quatre biomatériaux dans le petit animal en site orthotopique (c'est-à-dire dans une perte de substance osseuse, pour reproduire au mieux les conditions physiologiques), et en site ectopique (non osseux sous cutané ou intramusculaire,

pour évaluer notamment leur propriétés d'ostéoinduction). L'ostéogenèse et la vascularisation au cœur des matériaux seraient évaluées par étude histologique.

La reconstruction des grandes pertes de substance osseuses par des biomatériaux poreux en CPC demeure un défi quant à l'invasion vasculaire de celles-ci favorisant leur ostéointégration et leur bonne tolérance à long terme.

## Références bibliographiques

---

1. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Nov;26(6).
2. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S16-21.
3. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019;23:9.
4. Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury*. 2015 Dec;46 Suppl 8:S8–19.
5. Mainard D. Substituts osseux. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot*. 2007 Nov;93(7):22–3.
6. Blokhuis TJ, Arts JJC. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S26-29.
7. Hou X, Zhang L, Zhou Z, Luo X, Wang T, Zhao X, et al. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J Funct Biomater*. 2022 Oct 14;13(4):187.
8. Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials*. 2006 Nov 1;27(31):5399–408.
9. Wan B, Wang R, Sun Y, Cao J, Wang H, Guo J, et al. Building Osteogenic Microenvironments With Strontium-Substituted Calcium Phosphate Ceramics. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Oct 7;8:591467.
10. Udagawa A, Sato S, Hasuike A, Kishida M, Arai Y, Ito K. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Jul;24(7):787–92.
11. Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng*. 2015 Mar;43(3):718–29.
12. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011 May 31;9:66.
13. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:109–17.
14. Malhotra A, Habibovic P. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. *Trends Biotechnol*. 2016 Dec;34(12):983–92.
15. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol*. 2013 Oct;31(10):594–605.
16. Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature*. 2004 Mar 11;428(6979):138–9.

17. Zhai W, Lu H, Chen L, Lin X, Huang Y, Dai K, et al. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration. *Acta Biomater.* 2012 Jan;8(1):341–9.
18. Rüdrieh U, Lasgorceix M, Champion E, Pascaud-Mathieu P, Damia C, Chartier T, et al. Pre-osteoblast cell colonization of porous silicon substituted hydroxyapatite bioceramics: Influence of microporosity and macropore design. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Apr;97:510–28.
19. Zhang K, Fan Y, Dunne N, Li X. Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regen Biomater.* 2018 Mar;5(2):115–24.
20. Usseglio J, Dumur A, Pagès E, Renaudie É, Abélanet A, Brie J, et al. Microporous Hydroxyapatite-Based Ceramics Alter the Physiology of Endothelial Cells through Physical and Chemical Cues. *J Funct Biomater.* 2023 Sep 5;14(9):460.
21. Velleman SG. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci.* 2000 Jul;79(7):985–9.
22. Robinson RA. Bone tissue: composition and function. *Johns Hopkins Med J.* 1979 Jul;145(1):10–24.
23. Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasawan P, Sricholpech M, Boskey AL, et al. Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2009 Jan;28(1):44–52.
24. Roberts HC, Moseley R, Sloan AJ, Youde SJ, Waddington RJ. Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease. *Eur J Oral Sci.* 2008 Jun;116(3):207–16.
25. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Dec;8(12):a031229.
26. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res Int.* 2015;2015:421746.
27. Legros R, Balmain N, Bonel G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tissue Int.* 1987 Sep;41(3):137–44.
28. Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2009 Jun;20(6):1013–21.
29. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371–86.
30. Euw S von. Biominéralisation osseuse : de la caractérisation structurale du minéral à son organisation 3D [Internet] [phdthesis]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2014 . Available from: <https://theses.hal.science/tel-01127563>
31. Holden JL, Clement JG, Phakey PP. Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1995 Sep;10(9):1400–9.
32. Albrektsson T, Linder L. A method for short- and long-term in vivo study of the bone-implant interface. *Clin Orthop.* 1981 Sep;(159):269–73.

33. Blair HC, Zaidi M, Huang CLH, Sun L. The developmental basis of skeletal cell differentiation and the molecular basis of major skeletal defects. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008 Nov;83(4):401–15.
34. Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol.* 2005;242:121–56.
35. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop.* 1995 May;(314):266–80.
36. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect.* 1987;36:27–48.
37. Enseignement d’Histologie Humaine, Pr Serge Nataf - Tissu Osseux. Available from: <http://histoblog.viabloga.com/texts/tissu-osseux>
38. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 22;22(13):6651.
39. Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int.* 2003;27(4):315–24.
40. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* 1999 Apr 15;13(8):1025–36.
41. Barré R. Étude du rôle des récepteurs couplés aux protéines G lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes : intérêt de la voie Gi [These de doctorat]. Toulouse 3; 2012. Available from: <https://www.theses.fr/2012TOU30107>
42. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):345–57.
43. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship’s lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2002 Jan;17(1):77–90.
44. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):19883–7.
45. Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol.* 2000 Sep;192(1):4–13.
46. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Apr 1;22(4):549–53.
47. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011 Sep 11;17(10):1231–4.
48. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138189.

49. Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol.* 2010 Apr;39(4):319–23.
50. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat.* 1990 Aug;171:233–9.
51. histologie fondamentale de junqueira: texte & atlas anthony l. mescher
52. Bergh C, Wennergren D, Möller M, Brisby H. 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.* 2020;15(12):e0244291.
53. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-139.
54. Biga LM, Bronson S, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, et al. Anatomy & Physiology [Internet]. OpenStax/Oregon State University; 2019. Available from: <https://open.oregonstate.edu/aandp/>
55. de Baat P, Heijboer MP, de Baat C. [Development, physiology, and cell activity of bone]. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2005 Jul;112(7):258–63.
56. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJA, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med Auckl NZ.* 2014 Jan;44(1):37–53.
57. Richelle LJ, Onkelinx C, Dallemagne MJ. [RELATIONS BETWEEN PHOSPHO-CALCIUM METABOLISM AND BONE TISSUE]. *Bull Acad R Med Belg.* 1965;5:99–109.
58. Borle AB. [Physico-chemical and biological aspects of metabolism of bone]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1961 Nov 11;91:1325–33.
59. Zhou R, Guo Q, Xiao Y, Guo Q, Huang Y, Li C, et al. Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Res.* 2021 May 20;9(1):25.
60. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629–48.
61. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115–37.
62. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018 May;55(3):308–27.
63. Gasser J, Kneissel M. Bone Physiology and Biology. In 2017. p. 27–94.
64. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003 Dec 1;22(23):6267–76.
65. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am.* 1984 Oct;15(4):597–612.
66. Kohli N, Ho S, Brown SJ, Sawadkar P, Sharma V, Snow M, et al. 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*. 2018 May;110:38–46.
67. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiol Bethesda Md*. 2016 May;31(3):233–45.
  68. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, et al. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell*. 1998 Aug;9(8):2249–58.
  69. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol*. 2000 Nov 13;151(4):931–44.
  70. N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2 - PubMed. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10699973/>
  71. Strewler GJ. Local and systemic control of the osteoblast. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):271–2.
  72. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):365–408.
  73. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet*. 1997 Aug;16(4):391–6.
  74. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):719–30.
  75. Kream BE, Graves L, Lukert BP. Chapter 44 - Clinical and Basic Aspects of Glucocorticoid Action in Bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of Bone Biology (Third Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2008
  76. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*. 2000 Aug;21(4):393–411.
  77. Rifkin D, Sachan N, Singh K, Sauber E, Tellides G, Ramirez F. The role of LTBP3 in TGF beta signaling. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2022 Jan;251(1):95–104.
  78. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF- $\beta$ -binding proteins. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2015 Sep;47:44–53.
  79. Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF- $\beta$ 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol*. 1996 Jan;132(1–2):195–210.
  80. Marie PJ, Lomri A, Debais F, Lemonnier J. Fibroblast growth factors and osteogenesis. *Skelet Growth Factors*. 2000 Jan 1;179–96.
  81. Lomri A, Lemonnier J, Hott M, de Parseval N, Lajeunie E, Munnich A, et al. Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1310–7.

82. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, et al. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology*. 2000 Jul;141(7):2674–82.
83. Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*. Pearson Education; 2005. 1288 p.
84. Maurice G, Wang X, Lehalle B, Stoltz JF. [Modeling of elastic deformation and vascular resistance of arterial and venous vasa vasorum]. *J Mal Vasc*. 1998 Oct;23(4):282–8.
85. Frank O. The basic shape of the arterial pulse. First treatise: mathematical analysis. 1899. *J Mol Cell Cardiol*. 1990 Mar;22(3):255–77.
86. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373–6.
87. Bessaguet F, Henrion D, Desmoulière A. Organisation générale des vaisseaux sanguins. *Actual Pharm*. 2022 Oct 1;61(619):53–6.
88. Potente M, Mäkinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Aug;18(8):477–94.
89. Karow M, Sánchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, et al. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Oct 5;11(4):471–6.
90. Courtney JM, Sutherland BA. Harnessing the stem cell properties of pericytes to repair the brain. *Neural Regen Res*. 2020 Jun;15(6):1021–2.
91. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):158–73.
92. Louis JS. Développements en IRM quantitative de perfusion pour le diagnostic de fibrose myocardique. 2020.
93. Moore JE, Bertram CD. Lymphatic System Flows. *Annu Rev Fluid Mech*. 2018 Jan;50:459–82.
94. Watson EC, Adams RH. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jul 2;8(7):a031559.
95. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*. 2017 Aug;20(3):291–302.
96. Trueta J. Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin Orthop*. 1974;(105):11–26.
97. Pazzaglia UE, Congiu T, Raspanti M, Ranchetti F, Quacci D. Anatomy of the intracortical canal system: scanning electron microscopy study in rabbit femur. *Clin Orthop*. 2009 Sep;467(9):2446–56.
98. Hendriks M, Ramasamy SK. Blood Vessels and Vascular Niches in Bone Development and Physiological Remodeling. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:602278.

99. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):323–8.
100. Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system - Breathing life into bone tissue. *Bone*. 2018 Oct;115:50–8.
101. Zahraoui A. Les junctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *médecine/sciences*. 2004 May 1;20(5):580–5.
102. Runkle EA, Antonetti DA. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;686:133–48.
103. Falk MM. Adherens junctions remain dynamic. *BMC Biol*. 2010 Apr 8;8:34.
104. Karaman S, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Dev Camb Engl*. 2018 Jul 20;145(14):dev151019.
105. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253–9.
106. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res*. 2014 Mar;355(3):607–19.
107. Sluiter TJ, van Buul JD, Huveneers S, Quax PHA, de Vries MR. Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021 Mar 24;9(4):328.
108. Sturtzel C. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1003:71–91.
109. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73–91.
110. Curtis CD, Davis RB, Ingram KG, Griffin CT. Chromatin-remodeling complex specificity and embryonic vascular development. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012 Dec;69(23):3921–31.
111. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev*. 2001 Feb;100(2):157–63.
112. Gendron N, Smadja DM. [Circulating endothelial cells: new biomarker of the endothelial dysfunction in hematological malignancies]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2015 Nov;73 Suppl 1:14–6.
113. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
114. Shi Q, Wu MH, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes AW, Sauvage LR. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg*. 1994 Oct;20(4):546–56; discussion 556-557.
115. Rafii S, Oz MC, Seldomridge JA, Ferris B, Asch AS, Nachman RL, et al. Characterization of hematopoietic cells arising on the textured surface of left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg*. 1995 Dec;60(6):1627–32.

116. Uzan G, Vanneaux V, Delmau C, Ayoubi F, Gluckman E, Larghero J. [Cord blood circulating endothelial progenitors: perspectives for clinical use in cardiovascular diseases]. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Mar;193(3):537–43; discussion 543-544.
117. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):858–64.
118. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997 Apr 17;386(6626):671–4.
119. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res.* 2004;117:3–32.
120. Desroches-Castan A. Inhibition de l'angiogenèse tumorale criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. Thèse de doctorat, université de Grenoble; 2014.
121. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50(1–2):1–15.
122. Gentil Dit Maurin A. Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire. Thèse de doctorat, université de Grenoble; 2010.
123. Kim YH, Choi J, Yang MJ, Hong SP, Lee CK, Kubota Y, et al. A MST1-FOXO1 cascade establishes endothelial tip cell polarity and facilitates sprouting angiogenesis. *Nat Commun.* 2019 Feb 19;10(1):838.
124. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:133–58.
125. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003 Jun 23;161(6):1163–77.
126. Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res.* 2020 Jul 3;127(2):310–29.
127. Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Dev Camb Engl.* 2016 Jul 1;143(13):2249–60.
128. Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, Kvanta A, Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med.* 2009 Jun;15(6):657–64.
129. Kilarski WW, Gerwins P. A new mechanism of blood vessel growth - hope for new treatment strategies. *Discov Med.* 2009 Jun;8(40):23–7.
130. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med.* 2011 Apr;32(2):71–87.
131. Drake CJ, Cheresh DA, Little CD. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci.* 1995 Jul;108 ( Pt 7):2655–61.
132. Auerbach R, Auerbach W. Profound effects on vascular development caused by perturbations during organogenesis. *Am J Pathol.* 1997 Nov;151(5):1183–6.

133. van Weel V, van Tongeren RB, van Hinsbergh VWM, van Bockel JH, Quax PHA. Croissance vasculaire des membres ischémiques : revue des mécanismes et possible stimulation thérapeutique. *Ann Chir Vasc*. 2008 Jul 1;22(4):632–49.
134. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):873–87.
135. Iruela-Arispe ML, Beitel GJ. Tubulogenesis. *Dev Camb Engl*. 2013 Jul;140(14):2851–5.
136. Xu K, Cleaver O. Tubulogenesis during blood vessel formation. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Dec;22(9):993–1004.
137. Rytlewski JA, Alejandra Aldon M, Lewis EW, Suggs LJ. Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs. *Microvasc Res*. 2015 May;99:26–35.
138. Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem RM. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2459–70.
139. Abdeen AA, Lee J, Mo SH, Kilian KA. Spatially defined stem cell-laden hydrogel islands for directing endothelial tubulogenesis. *J Mater Chem B*. 2015 Oct 28;3(40):7896–8.
140. Lafleur MA, Handsley MM, Knäuper V, Murphy G, Edwards DR. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci*. 2002 Sep 1;115(Pt 17):3427–38.
141. Calderon GA, Thai P, Hsu CW, Grigoryan B, Gibson SM, Dickinson ME, et al. Tubulogenesis of co-cultured human iPS-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in fibrin and gelatin methacrylate gels. *Biomater Sci*. 2017 Jul 25;5(8):1652–60.
142. Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2017 Jul;60–61:110–23.
143. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem*. 2017;82:405–56.
144. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):3967–79.
145. Maharaj ASR, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res*. 2007;74(2–3):100–13.
146. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal*. 2016 Dec;10(4):347–54.
147. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6–7):1334–47.
148. Bajbouj K, Ramakrishnan RK, Hamid Q. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Its Implications in Asthma. *J Immunol Res*. 2021;2021:6645072.
149. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221–33.

150. Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood*. 2018 Jul 12;132(2):132–40.
151. Randi AM, Laffan MA. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J Thromb Haemost JTH*. 2017 Jan;15(1):13–20.
152. Xiang Y, Hwa J. Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease. *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):288–93.
153. Al-Shabrawey M, El-Remessy A, Gu X, Brooks SS, Hamed MS, Huang P, et al. Normal vascular development in mice deficient in endothelial NO synthase: possible role of neuronal NO synthase. *Mol Vis*. 2003 Oct 8;9:549–58.
154. Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, Faubert D, Wilkes BC, Delisle C, et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell*. 2010 Aug 13;39(3):468–76.
155. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov 27;252(3):743–6.
156. Thein E, Chevalley F, Borens O. Pseudarthroses aseptiques des os longs.
157. Petite H. La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *médecine/sciences*. 2002 Oct;18(10):995–1002.
158. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
159. Chen Z, Klein T, Murray RZ, Crawford R, Chang J, Wu C, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Mater Today*. 2016 Jul 1;19(6):304–21.
160. Al-Maawi S, Orlowska A, Sader R, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin Immunol*. 2017 Feb;29:49–61.
161. Obert L, Couesmes A, Pauchot J, Garbuio P, Tropet Y. Facteurs de la consolidation osseuse. In: Le Nen D, Fabre A, Dubrana F, editors. *Réparations tissulaires à la jambe: De l'os... à la peau* [Internet]. Paris: Springer; 2012. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-2-287-99066-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-2-287-99066-3_11)
162. Alexandre P. Haute Autorité de santé. 2019;
163. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 1;88(5):873–84.
164. Tomlinson RE, Silva MJ. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res*. 2013 Dec;1(4):311–22.
165. Sathy BN, Mony U, Menon D, Baskaran VK, Mikos AG, Nair S. Bone Tissue Engineering with Multilayered Scaffolds-Part I: An Approach for Vascularizing Engineered Constructs In Vivo. *Tissue Eng Part A*. 2015 Oct;21(19–20):2480–94.

166. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15;105(2):686–91.
167. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):376–80.
168. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M, Zeuschner D, Bixel MG, Milia C, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *Nat Commun*. 2016 Dec 6;7:13601.
169. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3413–31.
170. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*. 2002 Feb;(395):81–98.
171. Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater Today*. 2010 Jan;13(1–2):24–30.
172. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*. 2012;8(4):114–24.
173. Jordana F, Le Visage C, Weiss P. [Bone substitutes]. *Med Sci MS*. 2017 Jan;33(1):60–5.
174. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(7):1465–85.
175. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013 Sep;9(9):8037–45.
176. Champion E, Damia C, Viana M, Beaubrun-Giry K, Drouet C, Grossin D. Elaboration de biocéramiques phosphocalciques. Chone J, Guerin JD, Quaegebeur P, editors. *MATEC Web Conf*. 2013;7:04010.
177. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000 Sep;18(9):959–63.
178. Egli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop*. 1988 Jul;(232):127–38.
179. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014–7.
180. Costantino PD, Friedman CD, Lane A. Synthetic biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial Plast Surg FPS*. 1993 Jan;9(1):1–15.
181. Roinet O. Les biomatériaux de substitution osseuse en chirurgie orale : connaissances actuelles [Thèse]. Nantes; 2005.

182. Ducheyne P. Bone bonding biomaterials. Reed Healthc Commun. Reed Healthcare Communications; 1992.
183. Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raheer S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. J Biomed Mater Res. 1990 Mar;24(3):379–96.
184. Pellenc D. Auto-assemblage de la fibronectine induit par l'adsorption caractérisation expérimentale sur l'hydroxyapatite et étude par simulation numérique [Thèse de doctorat]. Cergy Pontoise; 2005.
185. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J Biomed Mater Res A. 2009 May;89(2):326–35.
186. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W. Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement. Biomaterials. 2001 Jul;22(13):1739–47.
187. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. J Biomed Mater Res. 2001 Nov;57(2):258–67.
188. El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc. 1999 May;17(3):340–5.
189. Cairns ML, Meenan BJ, Burke GA, Boyd AR. Influence of surface topography on osteoblast response to fibronectin coated calcium phosphate thin films. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010 Jul 1;78(2):283–90.
190. Stephansson SN, Byers BA, García AJ. Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. Biomaterials. 2002 Jun;23(12):2527–34.
191. Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. J Dent Res. 2001 Jun;80(6):1540–4.
192. Davies JE, Baldan N. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. J Biomed Mater Res. 1997 Sep 15;36(4):429–40.
193. Sennerby L, Odman J, Lekholm U, Thilander B. Tissue reactions towards titanium implants inserted in growing jaws. A histological study in the pig. Clin Oral Implants Res. 1993 Jun;4(2):65–75.
194. Steflik DE, Corpe RS, Lake FT, Young TR, Sisk AL, Parr GR, et al. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. J Biomed Mater Res. 1998 Mar 15;39(4):611–20.
195. Costanzo LS. REGULATION OF CALCIUM AND PHOSPHATE HOMEOSTASIS. Adv Physiol Educ. 1998 Dec 15;275(6):S206-216.
196. Thakker RV. Calcium-sensing receptor: Role in health and disease. Indian J Endocrinol Metab. 2012 Dec;16(Suppl 2):S213-216.
197. Kass GE, Orrenius S. Calcium signaling and cytotoxicity. Environ Health Perspect. 1999 Feb;107 Suppl 1(Suppl 1):25–35.

198. Humeau J, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Nuñez L, Villalobos C, Kroemer G, et al. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium*. 2018 Mar;70:3–15.
199. Barradas AMC, Fernandes HAM, Groen N, Chai YC, Schrooten J, van de Peppel J, et al. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(11):3205–15.
200. Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kaji H, Tsukamoto T, Yamaguchi T, et al. Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1993 Dec;8(12):1445–52.
201. Aquino-Martínez R, Monroe DG, Ventura F. Calcium mimics the chemotactic effect of conditioned media and is an effective inducer of bone regeneration. *PloS One*. 2019;14(1):e0210301.
202. Blair HC, Robinson LJ, Huang CLH, Sun L, Friedman PA, Schlesinger PH, et al. Calcium and bone disease. *BioFactors Oxf Engl*. 2011;37(3):159–67.
203. Taylor JG, Bushinsky DA. Calcium and phosphorus homeostasis. *Blood Purif*. 2009;27(4):387–94.
204. Michigami T, Ozono K. Roles of Phosphate in Skeleton. *Front Endocrinol*. 2019;10:180.
205. Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8352–7.
206. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, Chihara K. Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol*. 2003 Jul;196(1):180–9.
207. Wang X, Yu Y, Ji L, Geng Z, Wang J, Liu C. Calcium phosphate-based materials regulate osteoclast-mediated osseointegration. *Bioact Mater*. 2021 Dec;6(12):4517–30.
208. Marrella A, Lee TY, Lee DH, Karuthedom S, Syla D, Chawla A, et al. Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Mater Today Kidlington Engl*. 2018 May;21(4):362–76.
209. Saberianpour S, Heidarzadeh M, Geranmayeh MH, Hosseinkhani H, Rahbarghazi R, Nouri M. Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. *J Biol Eng*. 2018;12:36.
210. Fondi C, Franchi A. Definition of bone necrosis by the pathologist. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2007;4(1):21–6.
211. Geiger F, Beverungen M, Lorenz H, Wieland J, Fehr M, Kasten P. Bone Substitute Effect on Vascularization and Bone Remodeling after Application of phVEGF165 Transfected BMSC. *J Funct Biomater*. 2012 Apr 19;3(2):313–26.
212. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop*. 1998 Oct;(355 Suppl):S82-89.
213. Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing – A brief overview. *Ann Anat - Anat Anz*. 2012 Mar 20;194(2):171–3.

214. Rz L. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*;(395). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11937868/>
215. Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury*. 2007 Mar;*38* Suppl 1:S49-62.
216. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*. 2001;*19*(1):117–25.
217. Albrektsson T, Linder L. Intravital, long-term follow-up of autologous experimental bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg Arch Orthopadische Unf-Chir*. 1981;*98*(3):189–93.
218. Fu J, Wang DA. In Situ Organ-Specific Vascularization in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol*. 2018 Aug;*36*(8):834–49.
219. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*. 1981 Jun;*(157)*:259–78.
220. Filippini A, D'Amore A, D'Alessio A. Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep *12*;20(18):4525.
221. Li S, Ning H, Ye Y, Wei W, Guo R, Song Q, et al. Increasing extracellular Ca<sup>2+</sup> sensitizes TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via a TRPC1/ERK1/2/NFκB-dependent pathway in human vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017 Oct;*1864*(10):1566–77.
222. Stähli C, James-Bhasin M, Hoppe A, Boccaccini AR, Nazhat SN. Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass® on 3D endothelial cell morphogenesis. *Acta Biomater*. 2015 Jun;*19*:15–22.
223. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jun;*294*(6):F1381-1387.
224. Di Marco GS, König M, Stock C, Wiesinger A, Hillebrand U, Reiermann S, et al. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int*. 2013 Feb;*83*(2):213–22.
225. Peng A, Wu T, Zeng C, Rakheja D, Zhu J, Ye T, et al. Adverse effects of simulated hyper- and hypo-phosphatemia on endothelial cell function and viability. *PLoS One*. 2011;*6*(8):e23268.
226. Das A, Segar CE, Hughley BB, Bowers DT, Botchwey EA. The promotion of mandibular defect healing by the targeting of S1P receptors and the recruitment of alternatively activated macrophages. *Biomaterials*. 2013 Dec;*34*(38):9853–62.
227. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 Jun;*42*(6):551–5.
228. Blokhuis TJ, Calori GM, Schmidmaier G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence? *Injury*. 2013 Jan;*44*:S40–2.
229. Baumhauer JF, Pinzur MS. Women in Orthopaedic Surgery. *Foot Ankle Int*. 2014 Sep;*35*(9):949–50.

230. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017 Dec;2(4):224–47.
231. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng [H].* 2010 Dec;224(12):1329–43.
232. Schlickewei W, Schlickewei C. The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects – the Clinical View and History. *Macromol Symp.* 2007 Aug;253(1):10–23.
233. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.
234. Faour O, Dimitriou R, Cousins CA, Giannoudis PV. The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: any specific needs? *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S87-90.
235. Zhang LY, Bi Q, Zhao C, Chen JY, Cai MH, Chen XY. Recent Advances in Biomaterials for the Treatment of Bone Defects. *Organogenesis.* 16(4):113–25.
236. Lu Y, Lu X, Li M, Chen X, Liu Y, Feng X, et al. Minimally invasive treatment for osteonecrosis of the femoral head with angioconductive bioceramic rod. *Int Orthop.* 2018 Jul;42(7):1567–73.
237. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* 2001 Jul;19(7):255–65.
238. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998 Mar;16(3):247–52.
239. Damia C, Magnaudeix A, Laverdet B. Chemical Functionalization of Calcium Phosphate Bioceramic Surfaces. In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.* 2020.
240. Brie J, Chartier T, Chaput C, Delage C, Pradeau B, Caire F, et al. A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* 2013 Jul;41(5):403–7.
241. Humphries S, Joshi A, Webb WR, Kanegaonkar R. Auricular reconstruction: where are we now? A critical literature review. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 2022 Feb;279(2):541–56.
242. Lasgorceix M. Lasgorceix M (2014) Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique. Thèse de doctorat, Université de Limoges. Limoges; 2014.
243. Champion E, Magnaudeix A, Pascaud-Mathieu P, Chartier T. 14 - Advanced processing techniques for customized ceramic medical devices. In: *Palmero P, Cambier F, De Barra E, editors. Advances in Ceramic Biomaterials . Woodhead Publishing; 2017 p. 433–68.* Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081008812000154>
244. Chartier T, Dupas C, Lasgorceix M, Brie J, Champion E, Delhote N, et al. Additive Manufacturing to Produce Complex 3D Ceramic Parts. *J Ceram Sci Technol.* 2015 Jun 1;6:95–104.

245. Lasgorceix M, Champion E, Chartier T. Shaping by microstereolithography and sintering of macro–micro-porous silicon substituted hydroxyapatite. *J Eur Ceram Soc.* 2016 Mar;36(4):1091–101.
246. Cesarano J. A Review of Robocasting Technology. *MRS Proc.* 1998;542:133.
247. Studart AR, Gonzenbach UT, Tervoort E, Gauckler LJ. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J Am Ceram Soc.* 2006;89(6):1771–89.
248. Eric Champion AM. <https://www.openscience.fr>. OpenScience; 2021 [cited 2024 Mar 7]. Les céramiques biomédicales. Available from: <https://www.openscience.fr/Les-ceramiques-biomedicales>
249. Gariboldi MI, Butler R, Best SM, Cameron RE. Engineering vasculature: Architectural effects on microcapillary-like structure self-assembly. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210390.
250. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* 2006 Jun;27(17):3230–7.
251. Le Huec JC, Schaefferbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials.* 1995 Jan;16(2):113–8.
252. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998;19(1–3):133–9.
253. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(27):5474–91.
254. Akay G, Birch MA, Bokhari MA. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(18):3991–4000.
255. Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1990 Jul;11:86–7.
256. Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000 Jun;21(12):1291–8.
257. Magnaudeix A, Usseglio J, Lasgorceix M, Lalloue F, Damia C, Brie J, et al. Quantitative analysis of vascular colonisation and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model. *Acta Biomater.* 2016 01;38:179–89.
258. Huttmacher DW, Schantz JT, Lam CFX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(4):245–60.
259. Woodard JR, Hildore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(1):45–54.

260. Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, et al. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo. *Biomed Mater Bristol Engl*. 2011 Feb;6(1):015007.
261. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Nov;8(4):277–84.
262. Bai F, Wang Z, Lu J, Liu J, Chen G, Lv R, et al. The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study. *Tissue Eng Part A*. 2010 Dec;16(12):3791–803.
263. Flautre B, Descamps M, Delecourt C, Blary MC, Hardouin P. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Aug;12(8):679–82.
264. Xiao X, Wang W, Liu D, Zhang H, Gao P, Geng L, et al. The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci Rep*. 2015 Mar 23;5:9409.
265. Rumpler M, Woesz A, Dunlop JWC, van Dongen JT, Fratzl P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface*. 2008 Oct 6;5(27):1173–80.
266. Dunlop JWC, Fischer FD, Gamsjäger E, Fratzl P. A theoretical model for tissue growth in confined geometries. *J Mech Phys Solids*. 2010 Aug 1;58(8):1073–87.
267. Gamsjäger E, Bidan CM, Fischer FD, Fratzl P, Dunlop JWC. Modelling the role of surface stress on the kinetics of tissue growth in confined geometries. *Acta Biomater*. 2013 Mar;9(3):5531–43.
268. Scarano A, Perrotti V, Artese L, Degidi M, Degidi D, Piattelli A, et al. Blood vessels are concentrated within the implant surface concavities: a histologic study in rabbit tibia. *Odontology*. 2014 Jul;102(2):259–66.
269. Paderni S, Terzi S, Amendola L. Major bone defect treatment with an osteoconductive bone substitute. *Chir Organi Mov*. 2009 Sep;93(2):89–96.
270. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int*. 1990 Jan;46(1):20–7.
271. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, et al. The effect of the microstructure of beta-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(16):2612–21.
272. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. *Adv Biosyst*. 2019 Dec;3(12):e1900140.
273. Gallo M, Tadier S, Meille S, Chevalier J. Resorption of calcium phosphate materials: Considerations on the in vitro evaluation. *J Eur Ceram Soc*. 2017 Jul 1;38.
274. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019;23:4.

275. Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A, Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 Jan 15;47(1):10–9.
276. Rouahi M, Gallet O, Champion E, Dentzer J, Hardouin P, Anselme K. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78A(2):222–35.
277. Cheng L, Ye F, Yang R, Lu X, Shi Y, Li L, et al. Osteoinduction of hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1569–74.
278. Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 May;16(5):467–75.
279. Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR. Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2004 Jan;25(1):85–96.
280. Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *J Microsc*. 2004 Jul;215(Pt 1):100–10.
281. Isaac J, Hornez JC, Jian D, Descamps M, Hardouin P, Magne D. beta-TCP microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Aug;86(2):386–93.
282. Faia-Torres AB, Guimond-Lischer S, Rottmar M, Charnley M, Goren T, Maniura-Weber K, et al. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials*. 2014 Nov;35(33):9023–32.
283. Gariboldi MI, Best SM. Effect of Ceramic Scaffold Architectural Parameters on Biological Response. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:151.
284. Zhang J, Luo X, Barbieri D, Barradas AMC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, et al. The size of surface microstructures as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):3254–63.
285. Magnaudeix A. Calcium phosphate bioceramics: From cell behavior to chemical-physical properties. *Front Biomater Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 Sep 20];1. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbiom.2022.942104>
286. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Dec;14(12):1089–97.
287. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3565–75.
288. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1999 Oct;20(19):1799–806.

289. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, et al. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1260–9.
290. felss NE. Céramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude des propriétés de surface par méthodes spectroscopiques. In 2018
291. Tomoda K, Ariizumi H, Nakaji T, Makino K. Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Mar 1;76(1):226–35.
292. Tagaya M, Ikoma T, Hanagata N, Yoshioka T, Tanaka J. Competitive adsorption of fibronectin and albumin on hydroxyapatite nanocrystals. *Sci Technol Adv Mater*. 2011 Jun;12(3):034411.
293. Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater*. 2010 Jun;6(6):1882–94.
294. Wang X, Wang Y, Li L, Gu Z, Xie H, Yu X. Stimulation of strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering to protein secretion and mRNA expression of the angiogenic growth factors from endothelial cells in vitro. *Ceram Int*. 2014 Jun 1;40(5):6999–7005.
295. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Jul;105(5):1285–99.
296. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram Int*. 2015 Sep 1;41(8):9203–31.
297. Farooq MA, Dietz KJ. Silicon as Versatile Player in Plant and Human Biology: Overlooked and Poorly Understood. *Front Plant Sci*. 2015;6:994.
298. Jurkić LM, Capanec I, Pavelić SK, Pavelić K. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy. *Nutr Metab*. 2013 Jan 8;10(1):2.
299. Araújo LA de, Addor F, Campos PMBGM. Use of silicon for skin and hair care: an approach of chemical forms available and efficacy. *An Bras Dermatol*. 2016;91(3):331–5.
300. Carlisle EM. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science*. 1970 Jan 16;167(3916):279–80.
301. Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 May;70(5):1608–12.
302. Carlisle EM. Silicon: an essential element for the chick. *Science*. 1972 Nov 10;178(4061):619–21.
303. Carlisle EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J Nutr*. 1980 May;110(5):1046–56.
304. Schwarz K, Milne DB. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature*. 1972 Oct 6;239(5371):333–4.
305. Zhou X, Zhang N, Mankoci S, Sahai N. Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Jul;105(7):2090–102.

306. Nielsen FH. Update on the possible nutritional importance of silicon. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2014 Oct;28(4):379–82.
307. Li H, Xue K, Kong N, Liu K, Chang J. Silicate bioceramics enhanced vascularization and osteogenesis through stimulating interactions between endothelial cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2014 Apr;35(12):3803–18.
308. Li H, Chang J. Stimulation of proangiogenesis by calcium silicate bioactive ceramic. *Acta Biomater*. 2013 Feb;9(2):5379–89.
309. Li H, Chang J. Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. *Acta Biomater*. 2013 Jun;9(6):6981–91.
310. Dashnyam K, El-Fiqi A, Buitrago JO, Perez RA, Knowles JC, Kim HW. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *J Tissue Eng*. 2017;8:2041731417707339.
311. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans B a. J, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*. 2003 Feb;32(2):127–35.
312. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 1;79(3):723–30.
313. Lehmann G, Cacciotti I, Palmero P, Montanaro L, Bianco A, Campagnolo L, et al. Differentiation of osteoblast and osteoclast precursors on pure and silicon-substituted synthesized hydroxyapatites. *Biomed Mater Bristol Engl*. 2012 Oct;7(5):055001.
314. Keeting PE, Oursler MJ, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs BL. Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1992 Nov;7(11):1281–9.
315. Kim EJ, Bu SY, Sung MK, Choi MK. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Apr;152(1):105–12.
316. Zhou X, Moussa FM, Mankoci S, Ustriyana P, Zhang N, Abdelmagid S, et al. Orthosilicic acid, Si(OH)<sub>4</sub>, stimulates osteoblast differentiation in vitro by upregulating miR-146a to antagonize NF-κB activation. *Acta Biomater*. 2016 Jul 15;39:192–202.
317. Szurkowska K, Kolmas J. Hydroxyapatites enriched in silicon – Bioceramic materials for biomedical and pharmaceutical applications. *Prog Nat Sci Mater Int*. 2017 Aug 1;27(4):401–9.
318. Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*. 1999 Mar 15;44(4):422–8.
319. Palard M. Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées. [Thèse de doctorat]. Limoges; 2007.
320. Porter AE, Botelho CM, Lopes MA, Santos JD, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun 15;69(4):670–9.

321. Botelho CM, Lopes MA, Gibson IR, Best SM, Santos JD. Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1123–7.
322. Hayakawa S, Kanaya T, Tsuru K, Shirosaki Y, Osaka A, Fujii E, et al. Heterogeneous structure and in vitro degradation behavior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles. *Acta Biomater*. 2013 Jan;9(1):4856–67.
323. Palard M, Combes J, Champion E, Foucaud S, Rattner A, Bernache-Assollant D. 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*. 2009 May;5(4):1223–32.
324. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*. 2005 Apr;26(10):1097–108.
325. Bohner M. Silicon-substituted calcium phosphates – A critical view. *Biomaterials*. 2009 Nov 1;30(32):6403–6.
326. Gasquères G, Bonhomme C, Maquet J, Babonneau F, Hayakawa S, Kanaya T, et al. Revisiting silicate substituted hydroxyapatite by solid-state NMR. *Magn Reson Chem MRC*. 2008 Apr;46(4):342–6.
327. Damia C, Marchat D, Lemoine C, Douard N, Chaleix V, Sol V, et al. Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Feb 1;95:343–54.
328. Hjezi Z. Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées  $\mu$  étude de la silanisation de surface [Thèse de doctorat]. Limoges; 2015.
329. Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(29):5014–26.
330. Fu X, Liu P, Zhao D, Yuan B, Xiao Z, Zhou Y, et al. Effects of Nanotopography Regulation and Silicon Doping on Angiogenic and Osteogenic Activities of Hydroxyapatite Coating on Titanium Implant. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:4171–89.
331. Aminian A, Solati-Hashjin M, Samadikuchaksaraei A, Bakhshi F, Gorjipour F, Farzadi A, et al. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources. *Ceram Int*. 2011 May 1;37(4):1219–29.
332. Honda M, Kikushima K, Kawanobe Y, Konishi T, Mizumoto M, Aizawa M. Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis route. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Dec;23(12):2923–32.
333. Chen YW, Feng T, Shi GQ, Ding YL, Yu XX, Zhang XH, et al. Interaction of endothelial cells with biodegradable strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering. *Appl Surf Sci*. 2008 Nov 15;255(2):331–5.
334. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Oct;23(10):2335–47.
335. Wu Q, Xu S, Wang X, Jia B, Han Y, Zhuang Y, et al. Complementary and synergistic effects on osteogenic and angiogenic properties of copper-incorporated silicocarnotite bioceramic: In vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2021 Jan 1;268:120553.

336. Iaquina MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 31;20(3):618.
337. Ziebart T, Schnell A, Walter C, Kämmerer PW, Pabst A, Lehmann KM, et al. Interactions between endothelial progenitor cells (EPC) and titanium implant surfaces. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):301–9.
338. An N, Schedle A, Wieland M, Andrukhov O, Matejka M, Rausch-Fan X. Proliferation, behavior, and cytokine gene expression of human umbilical vascular endothelial cells in response to different titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Apr;93(1):364–72.
339. Casarrubios L, Gómez-Cerezo N, Sánchez-Salcedo S, Feito MJ, Serrano MC, Saiz-Pardo M, et al. Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomater*. 2020 Jan 1;101:544–53.
340. Li T, Peng M, Yang Z, Zhou X, Deng Y, Jiang C, et al. 3D-printed IFN- $\gamma$ -loading calcium silicate- $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold sequentially activates M1 and M2 polarization of macrophages to promote vascularization of tissue engineering bone. *Acta Biomater*. 2018 Apr 15;71:96–107.
341. Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largebeau A, Berzina-Cimdina L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *J Funct Biomater*. 2015 Dec 21;6(4):1099–140.
342. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Jun;23(3):268–80.
343. Liu X, Chen W, Zhang C, Thein-Han W, Hu K, Reynolds MA, et al. Co-Seeding Human Endothelial Cells with Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells on Calcium Phosphate Scaffold Enhances Osteogenesis and Vascularization in Rats. *Tissue Eng Part A*. 2017 Jun;23(11–12):546–55.
344. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(3):377–84.
345. Kook YM, Kim H, Kim S, Heo CY, Park MH, Lee K, et al. Promotion of Vascular Morphogenesis of Endothelial Cells Co-Cultured with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Nanomater Basel Switz*. 2018 Feb 18;8(2):117.
346. Kachgal S, Putnam AJ. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*. 2011 Mar;14(1):47–59.
347. Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2009 Oct;27(10):562–71.
348. Chen W, Liu X, Chen Q, Bao C, Zhao L, Zhu Z, et al. Angiogenic and osteogenic regeneration in rats via calcium phosphate scaffold and endothelial cell co-culture with human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), human umbilical cord MSCs, human induced pluripotent stem cell-derived MSCs and human embryonic stem cell-derived MSCs. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jan;12(1):191–203.

349. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*. 2018 Sep;59:17–24.
350. Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *médecine/sciences*. 2001 Dec 1;17(12):1260–9.
351. Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials*. 2007 Sep;28(27):3965–76.
352. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jun;109(7):2384–97.
353. Herzog DPE, Dohle E, Bischoff I, Kirkpatrick CJ. Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts. *BioMed Res Int*. 2014;2014:320123.
354. Thein-Han W, Xu HHK. Prevascularization of a gas-foaming macroporous calcium phosphate cement scaffold via coculture of human umbilical vein endothelial cells and osteoblasts. *Tissue Eng Part A*. 2013 Aug;19(15–16):1675–85.
355. Li L, Li J, Zou Q, Zuo Y, Cai B, Li Y. Enhanced bone tissue regeneration of a biomimetic cellular scaffold with co-cultured MSCs-derived osteogenic and angiogenic cells. *Cell Prolif*. 2019 Jul 11;52(5):e12658.
356. Gurel Pekozer G, Torun Kose G, Hasirci V. Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells. *Microvasc Res*. 2016 Nov;108:1–9.
357. Jiang YN, Zhao J, Chu FT, Jiang YY, Tang GH. Tension-loaded bone marrow stromal cells potentiate the paracrine osteogenic signaling of co-cultured vascular endothelial cells. *Biol Open*. 2018 Jun 13;7(6):bio032482.
358. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):537–44.
359. Kim KI, Park S, Im GI. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2014 Jun;35(17):4792–804.
360. Villars F, Guillotin B, Amédée T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Apr;282(4):C775–785.
361. Xing Z, Xue Y, Finne-Wistrand A, Yang ZQ, Mustafa K. Copolymer cell/scaffold constructs for bone tissue engineering: co-culture of low ratios of human endothelial and osteoblast-like cells in a dynamic culture system. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Apr;101(4):1113–20.
362. Ma J, van den Beucken JJJP, Yang F, Both SK, Cui FZ, Pan J, et al. Coculture of osteoblasts and endothelial cells: optimization of culture medium and cell ratio. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011 Mar;17(3):349–57.

363. Liu R, Liu J, Guo L, Tian A. [Effect of different proportions of bone marrow mesenchymal stem cells and endothelial cells on osteogenesis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi Chin J Stomatol*. 2015 Nov;50(11):675–80.
364. Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y. Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater*. 2013 Jan;9(1):4906–15.
365. Zhang J, Hu M, Zhang WY. [Influence of vascular cell co-cultured with osteoblast in vitro on ability of osteoblast]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi West China J Stomatol*. 2005 Aug;23(4):325–8.
366. Shah AR, Wenke JC, Agrawal CM. Manipulation of Human Primary Endothelial Cell and Osteoblast Coculture Ratios to Augment Vasculogenesis and Mineralization. *Ann Plast Surg*. 2016 Jan;77(1):122–8.
367. Tae JY, Lee SI, Ko Y, Park JB. Enhanced Osteogenic Differentiation Potential of Stem-Cell Spheroids Created From a Coculture of Stem Cells and Endothelial Cells. *Implant Dent*. 2017 Dec;26(6):922–8.
368. Rao RR, Peterson AW, Ceccarelli J, Putnam AJ, Stegemann JP. Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis*. 2012 Jun;15(2):253–64.
369. Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 17;400(2):284–91.
370. Guerrero J, Catros S, Derkaoui SM, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater*. 2013 Sep;9(9):8200–13.
371. Li Q, Wang Z. Influence of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: an in vitro study. *Arch Med Res*. 2013 Oct;44(7):504–13.
372. Kim J, Kim HN, Lim KT, Kim Y, Pandey S, Garg P, et al. Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2013 Oct;34(30):7257–68.
373. Lü L, Deegan A, Musa F, Xu T, Yang Y. The effects of biomimetically conjugated VEGF on osteogenesis and angiogenesis of MSCs (human and rat) and HUVECs co-culture models. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018 Jul 1;167:550–9.
374. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res*. 2008 Jul 18;103(2):194–202.
375. Liu J, Chuah YJ, Fu J, Zhu W, Wang DA. Co-culture of human umbilical vein endothelial cells and human bone marrow stromal cells into a micro-cavitary gelatin-methacrylate hydrogel system to enhance angiogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Sep;102:906–16.

376. Böhrensen F, Schliephake H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. *Int J Oral Sci.* 2016 Dec 16;8(4):223–30.
377. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2006 May;21(5):735–44.
378. Peng J, Chen L, Peng K, Chen X, Wu J, He Z, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Co-Culture Enhances Large Segment Bone Defect Repair. *J Biomed Nanotechnol.* 2019 Apr 1;15(4):742–55.
379. Sadowska JM, Guillem-Marti J, Ginebra MP. The Influence of Physicochemical Properties of Biomimetic Hydroxyapatite on the In Vitro Behavior of Endothelial Progenitor Cells and Their Interaction with Mesenchymal Stem Cells. *Adv Healthc Mater.* 2019 Jan;8(2):e1801138.
380. Chen L, Wu J, Wu C, Xing F, Li L, He Z, et al. Three-Dimensional Co-Culture of Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells for Bone Regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2019 Feb 1;15(2):248–60.
381. Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1999 Jun;14(6):893–903.
382. Chiesa I, De Maria C, Lapomarda A, Fortunato GM, Montemurro F, Di Gesù R, et al. Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication.* 2020 Feb 19;12(2):025013.
383. Nakazato H, Deguchi M, Fujimoto M, Fukushima H. Alkaline phosphatase expression in cultured endothelial cells of aorta and brain microvessels: induction by interleukin-6-type cytokines and suppression by transforming growth factor betas. *Life Sci.* 1997;61(20):2065–72.
384. Savinov AY, Salehi M, Yadav MC, Radichev I, Millán JL, Savinova OV. Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2015 Dec 16;4(12):e002499.
385. Deracinois B, Duban-Deweere S, Pottiez G, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. TNAP and EHD1 are over-expressed in bovine brain capillary endothelial cells after the induction of blood-brain barrier properties. *PLoS One.* 2012;7(10):e48428.
386. Mutschall H, Winkler S, Weisbach V, Arkudas A, Horch RE, Steiner D. Bone tissue engineering using adipose-derived stem cells and endothelial cells: Effects of the cell ratio. *J Cell Mol Med.* 2020 Jun;24(12):7034–43.
387. Marchat D, Champion E. Ceramic devices for bone regeneration. In: *Advances in Ceramic Biomaterials.* 2017. p. 279–311.
388. Wang SJ, Greer P, Auerbach R. 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.* 1996 May;32(5):292–9.

389. Lu LS, Wang SJ, Auerbach R. 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*. 1996 Dec 10;93(25):14782–7.
390. Liu Y, Yang Q, Wang Y, Lin M, Tong Y, Huang H, et al. Metallic Scaffold with Micron-Scale Geometrical Cues Promotes Osteogenesis and Angiogenesis via the ROCK/Myosin/YAP Pathway. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 Aug 8;8(8):3498–514.
391. Chen Y, Wang J, Zhu XD, Tang ZR, Yang X, Tan YF, et al. Enhanced effect of  $\beta$ -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. *Acta Biomater*. 2015 Jan;11:435–48.
392. Zhao C, Wang X, Gao L, Jing L, Zhou Q, Chang J. The role of the micro-pattern and nano-topography of hydroxyapatite bioceramics on stimulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2018 Jun;73:509–21.
393. Khang D, Choi J, Im YM, Kim YJ, Jang JH, Kang SS, et al. Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(26):5997–6007.
394. Skoog SA, Kumar G, Narayan RJ, Goering PL. Biological responses to immobilized microscale and nanoscale surface topographies. *Pharmacol Ther*. 2018 Feb;182:33–55.
395. Palard M, Champion E, Foucaud S. Synthesis of silicated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ . *J Solid State Chem*. 2008 Aug 1;181:1950–60.
396. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*. 2002 Feb 15;23(4):1065–72.
397. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018 Aug;21(3):425–532.
398. Ritz U, Götz H, Baranowski A, Heid F, Rommens PM, Hofmann A. Influence of different calcium phosphate ceramics on growth and differentiation of cells in osteoblast-endothelial co-cultures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Oct;105(7):1950–62.
399. Germaini MM. Elaboration de céramiques phosphocalciques pour l'ingénierie tissulaire osseuse : étude de l'influence des propriétés physico-chimiques des matériaux sur le comportement biologique in vitro [Internet] [Thèse de doctorat]. Limoges; 2017 [cited 2024 Apr 28]. Available from: <https://theses.fr/2017LIMO0003>
400. Morin KT, Tranquillo RT. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp Cell Res*. 2013 Oct 1;319(16):2409–17.
401. Zhang G, Drinnan CT, Geuss LR, Suggs LJ. Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix. *Acta Biomater*. 2010 Sep;6(9):3395–403.
402. Drouet C, Aufray M, Rollin-Martinet S, Vandecandelaère N, Grossin D, Rossignol F, et al. Nanocrystalline apatites: The fundamental role of water. *Am Mineral*. 2018 Apr 25;103(4):550–64.

403. Moccia F, Negri S, Shekha M, Faris P, Guerra G. Endothelial Ca<sup>2+</sup> Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: just What It Takes to Make a Blood Vessel. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 14;20(16):3962.
404. Fiorio Pla A, Munaron L. Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Mar 19;369(1638):20130103.
405. Andrikopoulos P, Eccles SA, Yaqoob MM. Coupling between the TRPC3 ion channel and the NCX1 transporter contributed to VEGF-induced ERK1/2 activation and angiogenesis in human primary endothelial cells. *Cell Signal.* 2017 Sep;37:12–30.
406. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2017 Jun;70:97–101.
407. Iqbal F, Szaraz P, Librach M, Gauthier-Fisher A, Librach CL. Angiogenic potency evaluation of cell therapy candidates by a novel application of the in vitro aortic ring assay. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Aug 14;8(1):184.
408. van Gaalen SM, Dhert WJA, van den Muysenberg A, Oner FC, van Blitterswijk C, verbout AJ, et al. Bone tissue engineering for spine fusion: an experimental study on ectopic and orthotopic implants in rats. *Tissue Eng.* 2004;10(1–2):231–9.

## Production scientifique

---

### Communications affichées

*A tubulogenesis assay to characterize the influence of hydroxyapatite-based ceramic properties on endothelial cells*

**Julie Usseglio**, Adeline Dumur, Emeline Renaudie, Esther Pages, Joël Brie, Eric Champion, Amandine Magnaudeix

Poster présenté à l'ESB (European Society of Biomaterials), Bordeaux, Septembre **2022** (congrès international)

*A tubulogenesis assay to characterize the influence of hydroxyapatite-based ceramic properties on endothelial cells*

**Adeline Dumur**, **Julie Usseglio**, Esther Pagès, Emeline Renaudie, Joël Brie, Eric Champion, Amandine Magnaudeix

Poster présenté à Sigma Tech days, LABEX sigma LIM, Limoges, Octobre **2021** (congrès national)

*A tubulogenesis assay to characterize the influence of hydroxyapatite-based ceramic properties on endothelial cells*

**Adeline Dumur**, **Julie Usseglio**, Esther Pagès, Emeline Renaudie, Joël Brie, Eric Champion, Amandine Magnaudeix

Poster présenté 31<sup>st</sup> conference of the European Society for Biomaterial (ESB), Porto, Septembre **2021** (Congrès International)

### Communications orales

Mon master en 180 secondes : *Impact de la microstructure et de la composition chimique de céramiques d'hydroxyapatite sur le comportement de cellules endothéliales seules ou en co-culture avec des cellules ostéoblastiques*

**Adeline Dumur**, Eric Champion, Amandine Magnaudeix, Joël Brie, **Julie Usseglio**

57<sup>ième</sup> congrès de la SFSCMFCO, Reims, Octobre **2022** (Congrès National)

*A tubulogenesis assay to characterize the influence of hydroxyapatite-based ceramic properties on endothelial cells*

**J. Usseglio**, A. Dumur, E. Pagès, E. Renaudie, J. Brie, E. Champion, A. Magnaudeix

XIX Brazil MRS meeting and IUMRS ICEM, Brazil, Septembre **2021** (Congrès international)

*Impact of microstructure and chemical composition of hydroxyapatite-based ceramics on endothelial cell behavior alone or in co-culture with osteoblastic cells*

**Julie Usseglio**, Adeline Dumur, Esther Pagès, Emeline Renaudie, Joël Brie, Eric Champion, Amandine Magnaudeix

25<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery, Paris, Juillet **2021** (Congrès International)

## Articles publiés

*Microporous hydroxyapatite-based ceramics alter the physiology of endothelial cells through physical and chemical cues*

**Usseglio J**, Dumur A, Pages E, Renaudie E, Abelanet A, Brie J, Champion E, Magnaudeix A  
Journal of functional biomaterials, doi: 10.3390/jfb14090460, **2023**

## Serment d'intégrité scientifique

---

*« En présence de mes pairs. Parvenue à l'issue de mon doctorat en Biologie-Chimie-Santé, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »*



## Influence des propriétés physico-chimiques de surface de céramiques à base d'hydroxyapatite (HA) sur le comportement de cellules endothéliales

Le défi actuel en ingénierie des tissus osseux est la mise au point d'une nouvelle génération de biomatériaux, facilitant l'ostéoconduction (propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse) et l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants), pour permettre l'ostéoinduction en offrant la possibilité de formation de tissu osseux sur de grandes pertes de substance, favorisant ainsi l'ostéointégration (intégration stable et fonctionnelle dans l'os environnant) des implants. Les céramiques phosphocalciques (CPCs), et plus particulièrement celles à base d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  sont fréquemment utilisées en chirurgie pour la réparation osseuse. Le défaut de vascularisation des implants semble être le facteur principal des échecs d'ostéointégration des biomatériaux. L'incorporation d'ions silicates dans les CPCs et la modification de leur architecture poreuse multi-échelle sont deux stratégies d'optimisation de la vascularisation des pièces architecturées poreuses. La réponse des cellules endothéliales aux propriétés chimiques et physiques de surface des biomatériaux est peu documentée, bien qu'essentielle. Nous avons cherché à caractériser *in vitro* la réponse d'une lignée de cellules endothéliales, C166, cultivées à la surface de CPCs variant soit par leur composition chimique (HA pure vs HA dopée au silicium), soit par leur microstructure (dense vs microporeuse). L'objectif principal de ce travail était le développement d'un modèle cellulaire pertinent pour l'étude des propriétés biologiques des matériaux et la compréhension de l'interface vivant-matériau. Dans ce contexte, l'adhésion, l'activité métabolique et la prolifération des cellules endothéliales au contact des biomatériaux ont été étudiées. Elles ont été significativement altérées à la surface des céramiques microporeuses. De plus, un essai de tubulogenèse, utilisant un gel à base de fibrine, a été spécifiquement développé. Deux configurations ont été conçues pour distinguer l'influence de la chimie de celle des propriétés physiques de surface. Cet environnement 3D a permis la formation de structures semblables à des tubules, positives aux marqueurs endothéliaux MMP9 et VEGFR-2, qui étaient qualitativement plus fréquentes sur les céramiques denses. La concentration en calcium et phosphore dans le milieu de culture était réduite environ de moitié en présence des céramiques microporeuses, en lien avec des phénomènes de dissolution-reprécipitation à la surface des CPCs. L'appauvrissement du milieu en calcium était délétère pour l'activité migratoire et proliférative des C166 lors de tests de fermeture de lésions du tapis cellulaire. Aucune influence majeure du dopage au silicium de l'HA sur le comportement des C166 n'a été détectée. Enfin, dans l'objectif d'établir un modèle biologique pertinent, les réponses cellulaires d'un modèle *in vitro* de co-culture de cellules endothéliales C166 et de cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 sc14 ont été étudiées à travers l'expression de marqueurs ostéogéniques et endothéliaux. Un réseau de structures tubulaires de type microcapillaires, positives au marqueur endothélial PECAM, a été observé dans un environnement 3D sur gel de fibrine. Il semble que les ratios 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 et 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 soient les plus pertinents pour favoriser conjointement l'angiogenèse et l'ostéogenèse. L'invasion vasculaire des CPCs poreuses reste essentielle à promouvoir. Ce travail va être poursuivi par des études avec des cultures primaires de cellules humaines endothéliales et ostéoblastiques, au comportement physiologique plus proche de celui des cellules *in vivo*. Des conditions de culture dynamiques en 3D en bioréacteur à flux par perfusion, fournissant un environnement contrôlé et optimisé pour la croissance, le maintien et la prolifération des cellules vivantes en culture, sont en cours de développement.

Mots-clés : céramiques phospho-calciques, vascularisation, tubulogenèse, cellules endothéliales, substitution chimique, microporosité, tissu osseux, ostéoblastes.

## Influence of the physicochemical surface properties of hydroxyapatite (HA)-based ceramics on endothelial cell behavior

The current challenge in bone tissue engineering is to develop a new generation of biomaterials, facilitating osteoconduction (passive property of a material to receive bone regrowth) and angiogenesis (formation of new blood vessels from pre-existing ones), to enable osteoinduction by offering the possibility of bone tissue formation over large losses of substance, thus promoting osseointegration (stable and functional integration into the surrounding bone) of implants. Calcium phosphate ceramics (CPCs), particularly those based on hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , are frequently used in surgery for bone repair. Lack of vascularization of implants seems to be the main factor in osseointegration failures of biomaterials. Incorporating silicate ions into CPCs and modifying their multi-scale porous architecture are two strategies for optimizing the vascularization of scaffolds. The response of endothelial cells to the chemical and physical surface properties of biomaterials is poorly documented, although essential. We sought to characterize the *in vitro* response of an endothelial cell line, C166, grown on the surface of CPCs varying either by their chemical composition (pure HA vs. silicon-doped HA) or microstructure (dense vs. microporous). The main aim of this work was to develop a cellular model relevant to the study of the biological properties of materials and to understand the living-materials interface. In this context, adhesion, metabolic activity and proliferation of endothelial cells in contact with bioceramics were studied. Cells behavior were significantly altered on the surface of microporous ceramics. In addition, a tubulogenesis assay, using a fibrin-based gel, was specifically developed. Two configurations were designed to dissociate the influence of chemistry from that of surface physical properties. This 3D environment enabled the formation of tubule-like structures, positive for the endothelial markers MMP9 and VEGFR-2, which were qualitatively more frequent on dense ceramics than on porous ones. The concentration of calcium and phosphorus in the culture medium was reduced by around half in the presence of the microporous ceramics, linked to dissolution-reprecipitation phenomena occurring at the surface of the CPCs. Calcium depletion was deleterious to C166 proliferation and migration in wound healing assays. No major influence of HA silicon doping on C166 behavior was detected. Finally, with the aim of establishing a relevant biological model, the cellular responses of an *in vitro* co-culture model of C166 endothelial cells and MC3T3-E1 sc14 osteoblastic cells were studied through the expression of osteogenic and endothelial markers. A network of tubular microcapillary-like structures, positive for the endothelial marker PECAM, was observed in a 3D environment on fibrin gel. The ratios 2C166 : 1MC3T3-E1 sc14 and 1C166 : 2MC3T3-E1 sc14 appear to be the most relevant for jointly promoting angiogenesis and osteogenesis. Vascular invasion of porous CPCs remains essential to promote. This work will be pursued by studies with primary cultures of human endothelial and osteoblastic cells, whose physiological behavior is closer to that of cells *in vivo*. Dynamic 3D perfusion flow bioreactor culture conditions, providing a controlled and optimized environment for the growth, maintenance and proliferation of living cells in culture, are currently being developed.

Keywords : calcium phosphate ceramics, vascularization, tubulogenesis, endothelial cells, chemical substitution, microporosity, bone tissue, osteoblasts

