



HAL
open science

MATRICES FIBRILLAIRES DENSES DE COLLAGÈNE : MATÉRIAUX POUR LA RÉPARATION OSSEUSE ET L'ÉTUDE D'OSTÉOBLASTES EN TROIS DIMENSIONS

Sylvain Vigier

► **To cite this version:**

Sylvain Vigier. MATRICES FIBRILLAIRES DENSES DE COLLAGÈNE : MATÉRIAUX POUR LA RÉPARATION OSSEUSE ET L'ÉTUDE D'OSTÉOBLASTES EN TROIS DIMENSIONS. Ingénierie biomédicale. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : . tel-00574654

HAL Id: tel-00574654

<https://theses.hal.science/tel-00574654>

Submitted on 8 Mar 2011

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Ingénierie Tissulaire

Présentée par
Mr. Sylvain VIGIER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

MATRICES FIBRILLAIRES DENSES DE COLLAGENE :
MATERIAUX POUR LA REPARATION OSSEUSE
ET L'ÉTUDE D'OSTEOBLASTES EN TROIS DIMENSIONS

Soutenue le jeudi 23 octobre 2008,

devant le jury composé de :

Mme. Marie-Madeleine GIRAUD-GUILLE	Directrice d'études à l'EPHE	Directrice de thèse
Mme. Karine ANSELME	Chargée de recherche au CNRS	Rapporteur
Mme. Anne PELLÉ	Professeur des Universités	Rapporteur
Mr. Pierre MARIE	Directeur de recherche au CNRS	Examineur
Mr. Jean-Louis SAFFAR	Professeur des Universités	Examineur
Mr. Germain TRUGNAN	Professeur des Universités, PUPH	Examineur

*A mes parents,
à mes grands parents
Je sais ce que je leur dois*

Choisir, c'est renoncer
Sky

PARCE QUE L'ON NE FAIT RIEN SEUL (REMERCIEMENTS)

Comme les romans d'aventure de ma jeunesse : « c'est par la fin que tout commence ». Les pages de remerciements que j'ai rencontré au cours de mes années d'études m'ont fait me transposer dans la peau du thésard dont la tâche est accomplie et trouve dans cette page libre, l'espace pour raconter son envers du décor. Comme les romans d'aventure de ma jeunesse, j'en arrive au stade « où [je suis] le héros », ça crispe tout de même un peu.

Je me dois tout d'abord de remercier la providence, de m'avoir fait quitter la brique (rose) pour le pavé (gris), puis délaissier la Montagne pour le Jardin. Elle apparaît souvent cruelle, mais on dirait qu'elle sait ce qu'elle fait.

Heureusement, l'humain prend toute sa part et je remercie très chaleureusement Mme Pascale Debey, professeur au Muséum d'Histoire Naturelle et directrice du DEA Activités Biologiques des Substances Naturelles, ainsi que Mr Jean Delettré, maître de conférence à l'Université Pierre et Marie Curie et Directeur de l'Ecole Doctorale Inter///Bio pour m'avoir tout les deux fait confiance.

La confiance, je l'ai également trouvée au sein du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris. Mon intégration a été des plus simple et rapide, et cela grâce à tous les membres du laboratoire, dont les plus éminents, le Directeur Mr Clément Sanchez et le Professeur Jacques Livage, Christian Bonhomme et François Ribot –car il y a de la vie au 4eme étage–, Thibaut Coradin, Capucine Sassoie et Laurence Rozes.

Dans ce couloir du LCMC je ne peux aucunement oublier les agents administratifs. Un énorme merci à Corine Pozzo di Borgo, Hélène Gervais, Alban Politi, et Brigitte Loir. Merci à vous pour votre patience, votre générosité et votre didactisme face à mon incompétence dans la rédaction des ordres de missions et autres commandes exotiques.

Avant de prendre l'ascenseur, je souhaite adresser un grand merci à Patrick Le Griel. Il n'y a pas d'appareil ou de mécanisme défectueux (ou en parfait état de marche avant mon passage) qui puisse lui résister.

La majeure partie de ce travail a été effectuée dans feu les locaux originels de l'Université Pierre et Marie Curie, au 12 rue Cuvier, au sein de l'équipe Matériaux du Vivant. C'est dans ce cadre et avec ses cadres que j'ai pu m'épanouir pleinement et mener au mieux de mes compétences ce projet.

Je veux remercier Marie-Madeleine Giraud-Guille, directrice de l'équipe et directrice de ma thèse. Merci Marie-Madeleine de m'avoir procuré un bien rare et précieux, mais qui m'est ô combien nécessaire : la liberté. Votre disponibilité a de plus réussi le tour de force d'en diminuer le coût sans en atténuer la valeur.

Au grès des couloirs, il y avait le lumineux et floral bureau de Gervaise Mosser. Gervaise, ton sourire, ton charme, ta créativité et tes gros-yeux-de-quand-t'es-pas-contente m'ont fait avancer scientifiquement et humainement. Pour cela, et tout le reste, un humble merci.

Aux côtés de Gervaise, on trouve souvent Anny Anglo, cela tombe bien. Son bureau-atelier spacieux, autant que son bocal à poisson, représentaient pour moi des lieux où le temps prenait un rythme salutaire. Ma chère Anny, tu m'as transmis un savoir que peu d'étudiants ont la chance de connaître. Discuter avec toi a toujours été un plaisir, tout comme tes élans maternels, car ma maman à moi n'a pas fait mai 68.

Fidèle lieutenant de Marie-Madeleine, et bientôt affranchi, je remercie le technico-thésard Christophe Hélyary, d'abord de son expérience et de ses compétences qu'il a pu me faire partager, mais également de sa présence à mes côtés dans la salle de manip, on se sent tout de suite moins seul.

Je ne voudrais pas paraître ingrat, car Paulo Peixto est un acharné de la paillasse et il a lui aussi participé au dynamisme des journées de manips. Cependant, ses origines brésiliennes lui ont donné la fâcheuse tendance à s'enfermer dans la pièce climatisée.

Corinne Illoul et Doriane Damo étaient également là pour la compagnie, qu'elles avaient la grâce de pousser jusqu'à celle de la cigarette, la précieuse.

Les absents ont toujours tort, mais Emmanuel Bélamie et Frédéric Gobeaux moins que les autres. Manu, le sérieux facétieux, la rigueur de raisonnement et des soirées déraisonnables, le football et le rugby. Ah ! si ce n'est un modèle, c'est au moins un objectif.

Mon copain Frédéric, c'est bien simple, je n'ai pas vu passer les trois années de thèse en ta compagnie. Je retiendrai cette phrase magique, où lors d'une de mes journées de dur labeur je t'expliquais que je m'amusais en travaillant, tu me rétorquas que cela pourrait être intéressant que je travaille en m'amusant. Pour toujours subtil et la syntaxe ciselée mon cher Frédéric.

D'un bureau à un autre, d'une pièce à une autre, plane la délectable fragrance de Nadine Nassif.

Merci donc à toute l'équipe pour ce que vous êtes et m'avez apporté. Je crois que je dois également vous remercier de m'avoir supporté, je sais, mon caractère n'est pas des plus simple, mais vous avez vu : j'ai mûri !

Dans la vie, pour faire son beurre, il faut des à côtés. J'ai toujours trouvé Renaud plein de vérité –de plus très drôle– et je me permets de lui emprunter ce vers, il est d'accord.

Mes à côtés à moi sont des plus variables et imprécis. C'est donc dans l'anarchie la plus totale que je voudrais remercier l'ensemble de mes camarades, amis, copains et potes pour les années qui viennent de s'écouler et qu'ils ont su rendre singulières.

Merci donc à Ariane, Marie, Catherine, Alain –la poutrelle du Valibou–, merci à Geoffrey, Makhoul, David, Stéphanie, Laure, Alberto et Anne, ne pas oublier Agnès, Clémence, Norbert Clément Cantat, François, Benjamin et Benoît, je suis entrain d'oublier Gilles, John, Thomas, Anne, Caroline, Julie, Amédée et Jordane.

J'oublie très certainement des personnes qui pourraient se sentir offusquées. Par avance, toutes mes excuses, mais j'avais prévu, ces remerciements sont quelques peu à l'emporte pièce.

J'adresse le plus profond des mercis à Paulette Boucard, dit tata Paulette. Paulette, merci pour tout ce que tu m'as donné, apporté, fourni et autre encore, parce qu'il y en a. Mes années d'études à Paris auraient été bien plus difficiles sans toi.

Les derniers seront les premiers. C'est avec cette tirade évangélique que j'adresse tout mes remerciements et mon respect aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je souhaite remercier les rapporteurs Mme Karine Anselme et Mme Anne Pellé qui ont pris la peine de lire ce manuscrit et dont les compétences dans l'ingénierie tissulaire de l'os et la chirurgie réparatrice sont une plus value pour ce travail.

Je remercie Mr Pierre Marie de participer à l'évaluation de ce travail, des conseils qu'il a pu nous apporter et de l'accès à son laboratoire qu'il nous a procuré. A ce titre, je remercie très fortement Olivia Fromigué pour ses compétences, les connaissances des ostéoblastes qu'elle a pu me transmettre et sa gentillesse.

Je suis également honoré de la présence de Mr Jean-Louis Saffar parmi les membres du jury. J'ai énormément apprécié le temps passé au sein de son équipe, dont je voudrais remercier les membres, et en particulier Marie-Laure Colombier, Brigitte Barouk et Annie Llorens.

Je suis heureux que Mr Germain Trugnan ai accepté de participer à ce jury, en tant que directeur de l'Ecole Doctorale, mais également comme une personne ayant suivi mon parcours de doctorant indépendamment de ses fonctions.

Tables des Matières

INTRODUCTION GENERALE	19
INTRODUCTION	23
I LE TISSU OSSEUX	25
1. ORGANISATION DU TISSU OSSEUX : ANATOMIE	25
2. LA MATRICE EXTRA CELLULAIRE DU TISSU OSSEUX	28
3. LES CELLULES DE L'OS	31
4. FORMATION, CROISSANCE ET REPARATION DE L'OS	35
II LA MOLECULE DE COLLAGENE	38
1. LE COLLAGENE : UNE FAMILLE DE PROTEINES DES MATRICES EXTRA CELLULAIRES	38
2. STRUCTURE ET BIOSYNTHESE DU COLLAGENE DE TYPE I	41
3. ORGANISATION DES MOLECULES DE COLLAGENE EN FIBRILLES ET FIBRILLOGENESE <i>IN VITRO</i>	44
III L'INGENIERIE TISSULAIRE APPLIQUEE A L'OS	48
1. CARACTERISTIQUES DES MATERIAUX DE REPARATION OSSEUSE	49
2. LES MATERIAUX INORGANIQUES	51
3. LES POLYMERES SYNTHETIQUES	52
4. LES POLYMERES NATURELS	55
MATERIELS ET METHODES	57
I PREPARATION ET CARACTERISATION DES MATERIAUX	59
1. OBTENTION DE SOLUTIONS DE COLLAGENE DE TYPE I	59
a) <i>Extraction du collagène de tendons de queues de rats</i>	59
b) <i>Détermination de la concentration en collagène I : dosage de l'hydroxyproline</i>	60
c) <i>Analyse qualitative des solutions de collagène</i>	61
2. ELABORATION DES MATERIAUX DE COLLAGENE	63
a) <i>Matrices fibrillaires de collagène</i>	63
b) <i>Eponges de collagène</i>	64
II TECHNIQUES DE MICROSCOPIE	66
1. MICROSCOPIE PHOTONIQUE EN TRANSMISSION ET A LUMIERE POLARISEE	67
a) <i>Principes de la microscopie photonique</i>	67
b) <i>Principes de la microscopie à lumière polarisée</i>	69
c) <i>Préparation des échantillons</i>	71
2. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE ET A DEUX PHOTONS	73
a) <i>Principes de la microscopie de fluorescence</i>	73
b) <i>Le système ApoTome</i>	74
c) <i>Principes de la microscopie de fluorescence excitée à deux photons:</i>	75
d) <i>Préparation des échantillons</i>	76
3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	77
a) <i>Principes</i>	77
b) <i>Préparation des échantillons</i>	79
4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	80
a) <i>Principes</i>	80
b) <i>Préparation des échantillons</i>	81

Tables des matières

III CULTURE D'OSTÉOBLASTES <i>IN VITRO</i>	83
1. LIGNEES CELLULAIRES ETUDIEES	83
<i>a) Ostéoblastes transformés (FHSO-6)</i>	83
<i>b) Ostéoblastes primaires (F27)</i>	84
2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	84
3. PREPARATIONS HISTOLOGIQUES A LA PARAFFINE ET COLORATIONS	85
4. IMMUNOHISTOLOGIE	86
5. MARQUAGE FLUORESCENT DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE.	87
IV MODELE DE CRANIOTOMIE CHEZ LE RAT	88
1. PREPARATION DES IMPLANTS CRANIENS	88
2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	90
3. ANALYSE DU CONTENU EN MINERAL PAR DENSITOMETRIE AUX RAYONS X	92
4. PREPARATIONS HISTOLOGIQUES AU METHYLE METHACRYLATE	94
5. ANALYSE HISTOMORPHOMETRIQUE	94
RESULTATS	97
CHAPITRE I	
CARACTERISATION DES MATERIAUX DE COLLAGENE	99
1. ANALYSE MACROSCOPIQUE	100
2. ANALYSE SUR SECTIONS HISTOLOGIQUES	101
3. ANALYSE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ET EN TRANSMISSION	103
4. NOTIONS ET MESURE DE POROSITE	108
5. INTERACTION OSTEOBLASTES-MATERIAUX DE COLLAGENE A COURT TERME : TEST D'ADHESION	109
6. CONCLUSIONS	111
CHAPITRE II	
ETUDE <i>IN VITRO</i> A LONG TERME D'OSTEOBLASTES HUMAINS SUR LES MATRICES FIBRILLAIRES	113
1. ANALYSE MORPHOLOGIQUE	114
<i>a) Lignée d'ostéoblastes humains transformés (cellules FHSO-6)</i>	114
<i>b) Lignée primaire d'ostéoblastes humains (cellules F27)</i>	119
2. MINERALISATION DES MATRICES EN PRESENCE D'OSTEOBLASTES	122
<i>a) Lignée d'ostéoblastes humains transformés (cellules FHSO-6)</i>	122
<i>b) Lignée primaire d'ostéoblastes humains: cellules F27</i>	125
3. EXPRESSION DES MARQUEURS MOLECULAIRES OSTEOBLASTIQUES	127
<i>a) Expression de la phosphatase alcaline</i>	127
<i>b) Expression du collagène de type I</i>	127
4. CONCLUSIONS	129
CHAPITRE III	
ESSAI <i>IN VIVO</i> DE REPARATION OSSEUSE DANS UN MODELE DE CRANIOTOMIE CHEZ LE RAT	131
1. ANALYSE DE LA MINERALISATION DU DEFAUT PAR DEXA	132
2. OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES	135
3. CONCLUSIONS	143
CHAPITRE IV	
TRANSITIONS MORPHOLOGIQUES DES OSTEOBLASTES DANS UN RESEAU FIBRILLAIRE DE COLLAGENE EN TROIS DIMENSIONS	145
1. MORPHOLOGIE DES OSTEOBLASTES DANS UN CONTEXTE TRIDIMENSIONNEL	146
2. FORMATION D'UN RESEAU DE CELLULES CONNECTEES	149
3. CONCLUSIONS	155

Tables des matières

DISCUSSION	157
I MATRICES FIBRILLAIRES DE COLLAGENE : DES IMPLANTS OSSEUX EN DEVENIR ?	160
1. APPORT DE LA NATURE FIBRILLAIRE POUR L'INGENIERIE OSSEUSE	160
<i>a) Mise en œuvre, aspect et manipulation des éponges et des matrices 5MG</i>	161
<i>b) Comportement Cellulaire</i>	163
2. BENEFICES D'UNE CONCENTRATION ELEVEE EN COLLAGENE	166
II MATRICES FIBRILLAIRES DE COLLAGENE : MODELE TRIDIMENSIONNEL DE MATRICE EXTRA CELLULAIRE	170
1. MIGRATION DES OSTEOLASTES DANS LES MATRICES FIBRILLAIRES	171
2. DIFFERENCIATION DES OSTEOLASTES EN OSTEOCYTES	173
CONCLUSION GENERALE	177
REFERENCES	
BIBLIOGRAPHIQUES	181
ANNEXE	197

Introduction Générale

Substituer un organe déficient d'un individu par un organe fonctionnel, préexistant ou reconstruit *ex vivo*, apparaît être un concept thérapeutique très ancien. Les découvertes archéologiques de crânes datés du V^e siècle avant J.C. montrent la présence de dents artificielles façonnées à partir de matériaux divers : dents de bétail ou humaines, bois, ivoire, métal, corail... (Legeros, 2002). De même, dans la célèbre représentation picturale de Fra Angelico, La guérison du diacre Justinien, saint Côme et saint Damien (III^e siècle après J.C.) réalisent la greffe hétérologue d'une jambe prélevée sur un cadavre (Dubernard, 2007). La médecine réparatrice et régénératrice s'est par la suite développée en une discipline dédiée à l'élaboration de prothèses externes, d'organes artificiels et de techniques de transplantation d'organes.

C'est au début des années 1990 qu'est apparu le concept « d'ingénierie tissulaire », défini lors d'une rencontre de la National Science Foundation comme « l'application des principes et des méthodes de l'ingénierie et des sciences du vivant pour la compréhension des fondements des relations structure-fonction dans les tissus sains et pathologiques des mammifères et le développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou augmentent les fonctions du tissu » (Langer et Vacanti, 1993). Ainsi, l'approche classique de l'ingénierie tissulaire a été d'ensemencer des supports plus ou moins dégradables avec des cellules, de les cultiver pour déclencher le développement d'un nouveau tissu puis de les implanter chez le patient. A ce jour, cette technologie est appliquée en clinique avec des résultats prometteurs pour le remplacement et la réparation de la peau, du cartilage et de l'os, et le champ d'investigation de l'ingénierie tissulaire s'est étendu à quasiment tous les tissus et organes du corps humain (nerfs, muscles, tissu adipeux, pancréas, foie, vaisseaux sanguins...) (Horch, 2008).

L'os est un tissu qui a les propriétés biologiques de pouvoir se reconstruire à la suite d'une fracture et retrouver sa structure, sa forme et ses fonctions mécaniques et métaboliques. Cependant de nombreuses pathologies (malformations, traumatismes, tumeurs...) nécessitent une intervention chirurgicale qui s'accompagne souvent d'une résection et qui fait de l'os le

Introduction générale

second tissu le plus transplanté après le sang (Giannoudis *et al*, 2005). Le vieillissement de la population (dans les pays de l'hémisphère nord) augmente la fréquence de ces interventions et les pathologies de l'os semblent à terme devenir des enjeux de santé publique et socio-économiques majeurs (Rose et Oreffo, 2002).

La solution du chirurgien face à une perte osseuse reste à ce jour l'autogreffe d'os et de cellules osseuses prélevés chez le patient. Cette technique de transplantation autologue est efficace mais limitée par la quantité d'os disponible et des effets secondaires qui peuvent avoir lieu à la suite d'une intervention chirurgicale sur un tissu sain. Des matériaux de comblement et de régénération de l'os, d'origine synthétique ou naturelle, sont proposés en alternative mais la recherche et le développement de tels substituts doivent être menés plus avant car aucun d'eux n'a permis d'obtenir de meilleurs résultats cliniques que l'autogreffe ou la greffe d'os congelé de cadavre (Burg *et al*, 2000 ; Logeart-Avramoglou *et al*, 2005 ; Cancedda *et al*, 2007).

La matrice osseuse est formée par une trame organique, constituée à 90% de collagène de type I, renforcée par une phase minérale de phosphate de calcium organisée en cristaux d'hydroxyapatite. La molécule de collagène est présente dans de nombreux tissus conjonctifs du règne animal. Cette protéine se présente sous la forme de triples hélices organisées entre elles de façon ordonnée pour former des assemblages supramoléculaires en fibrilles de collagènes d'environ 100nm de diamètre et de plusieurs microns de longueur (Woodhead-Galloway, 1980).

L'analyse ultrastructurale précise des arrangements suprafibrillaires du collagène dans la matrice de l'os compact a permis de mettre en évidence une organisation hélicoïdale particulière, qui s'apparente à une phase cristalline liquide stabilisée de type cholestérique, qui participe aux propriétés mécaniques de l'os (Giraud-Guille, 1988 et 1996). Cette architecture hélicoïdale a pu être reproduite *in vitro* avec des molécules de collagène extraites et purifiées de tissus animaux. Une forte concentration de collagène en solution acide induit par auto-assemblage une organisation en phases cristallines liquides cholestériques. Par une étape de fibrillogénèse, obtenue par neutralisation du pH, cette phase est stabilisée pour former un matériau constitué de fibrilles de collagène natives organisées selon une architecture similaire à celles des fibrilles dans la matrice de l'os compact (Besseau et Giraud-Guille, 1995 ; Giraud-Guille *et al*, 2003 ; Giraud-Guille *et al*, 2005). En parallèle, des matériaux à concentration élevée en collagène se sont avérés de très bons substrats pour

Introduction générale

l'étude du comportement de fibroblastes dans un modèle de cicatrisation cutanée ou comme matériaux proposés pour la reconstruction du tissu dermique (Hélary *et al*, 2005 et 2006).

C'est dans ce contexte, de la recherche de nouveaux matériaux pour la reconstruction osseuse et des apports des matrices denses en collagène comme support *in vitro* et *in vivo* pour les cellules conjonctives, que l'étude que nous présentons ici a été initiée. Ainsi des matrices fibrillaires de densité moyenne et élevée en collagène ont été élaborées dans le but d'évaluer leurs propriétés comme substrat pour les cellules responsables de la synthèse de la matrice osseuse et comme matériau pour la réparation osseuse.

Il a d'abord été entrepris une caractérisation structurale de ces matériaux par microscopie optique et par microscopie électronique en transmission et à balayage. Les paramètres structuraux une fois établis, deux lignées d'ostéoblastes humains ont été cultivées *in vitro* à long terme (4 semaines) sur ces supports. Leur morphologie et leur phénotype, à savoir l'expression de la phosphatase alcaline, la synthèse du collagène I et la minéralisation, ont été analysés. En parallèle, nous avons également préparé des éponges de collagène par lyophilisation de solutions acides de collagène. Actuellement, les éponges représentent le matériau de collagène le plus fréquemment utilisé (Glowacki et Mizuno, 2007), et c'est donc en tant que matériau de référence que nous avons étudié leur structure et le comportement *in vitro* des ostéoblastes.

Afin de valider les matrices fibrillaires comme substitut osseux, celles ci ont été implantées dans un modèle de craniotomie chez le rat. La réparation du défaut a été analysée après quatre semaines par histologie et densitométrie aux rayons X et comparée à la réparation spontanée.

Au cours des expériences de culture *in vitro* à long terme nous avons observé que les ostéoblastes qui pénétraient dans les matrices les moins concentrées subissaient une transition morphologique qui les rendaient fusiformes (lignée d'ostéoblastes transformés) ou dendritiques (lignée d'ostéoblastes primaires). La morphologie de ces dernières étant proche des ostéocytes, que l'on retrouve *in vivo* enchâssés dans la matrice osseuse, une analyse détaillée de leur morphologie par une approche combinée de techniques de microscopie a été réalisée. Cette dernière série de résultats montre un aspect prometteur des matrices denses de collagène comme substrats tridimensionnels.

Introduction générale

En introduction à ce manuscrit, sont présentées les données de la littérature permettant d'appréhender les fonctions, l'organisation et la constitution du tissu osseux ; les propriétés des molécules de collagène et leur rôle en tant que biomatériaux et les attentes, notamment du chirurgien orthopédique, quant aux matériaux de substitution osseuse.

Un large panel de techniques de microscopies a été utilisé, dont certaines plus confidentielles comme la microscopie en lumière polarisée ou la microscopie de fluorescence à deux photons. Nous détaillons les principes de fonctionnement, d'appareillage et de préparation des échantillons pour les différentes microscopies afin de pouvoir apprécier au mieux la portée des résultats.

En discussion, les résultats les plus significatifs de la thèse sont repris afin de conclure, au regard de la bibliographie, des propriétés ostéoréparatrices de nos matériaux et de l'éventualité d'une différenciation ostéoblaste-ostéocyte. La pertinence de l'utilisation des matrices fibrillaires en recherche clinique et/ou fondamentale est évaluée.

INTRODUCTION

I Le Tissu Osseux

Le squelette est l'organe de soutien et de la motilité de l'organisme. Les deux tissus essentiels de cet organe sont l'os et le cartilage. Le cartilage permet la croissance du squelette et la motilité des os entre eux, tandis que le tissu osseux assure les fonctions mécaniques de protection des organes vitaux (système cœur-poumon, cerveau) et d'ancrage des surfaces articulaires, des tendons et des muscles. A cette fonction mécanique bien connue de l'os il faut ajouter son rôle métabolique essentiel en tant que réservoir de minéraux (en particulier du calcium) mobilisables pour les besoins de l'homéostasie. L'apparente contradiction entre une fonction mécanique, qui requiert de la constance, et une fonction métabolique, qui suppose une certaine versatilité, fait de l'os un tissu complexe et extrêmement hiérarchisé. Sa structure est organisée sur une large échelle métrique, de l'échelle anatomique où chaque pièce osseuse possède une forme spécifique dédiée à sa fonction mécanique, à l'échelle sub-micrométrique de la matrice extracellulaire qui a la particularité d'être minéralisée. Cette hiérarchie de structure est maintenue par les cellules de l'os qui sont spécialisées soit dans la synthèse de l'os, les ostéoblastes, soit dans sa dégradation, les ostéoclastes. La balance entre synthèse et dégradation de la matrice osseuse est régulée finement par des facteurs systémiques et locaux en des points précis du tissu osseux qui permettent l'intégrité du squelette dans son ensemble. Ces différents aspects vont être à présent détaillés.

1. Organisation du tissu osseux : anatomie

On dénombre 206 pièces osseuses qui varient en forme et en taille afin de s'emboîter les unes aux autres pour permettre la mobilité du squelette dans son ensemble ou d'épouser la forme des organes qu'elles doivent protéger (Figure 1 A). Elles se classent selon trois groupes anatomiques définis par les rapports de leur géométrie : les os longs (fémur, humérus...), les os courts (métacarpes, métatarses...) et les os plats (sternum, os du crâne et de la face). Leurs faces sont marquées d'appendices et de dépressions qui portent les surfaces articulaires et participent à l'ancrage des tendons et des muscles.

Typiquement les os longs sont constitués dans leur partie médiane d'une diaphyse, plus ou moins cylindrique, et de deux épiphyses à leurs extrémités (Figure 1 B). Selon une coupe longitudinale, la diaphyse est constituée de parois d'os compact et d'une partie

médullaire constituée d'os spongieux (ou os trabéculaire) et rempli de moelle (osseuse ou jaune). Au niveau des épiphyses, la partie médullaire est occupée par de l'os spongieux alors que la couche d'os compact est plus mince qu'au niveau de la diaphyse. La jonction de la diaphyse aux épiphyses est matérialisée par la ligne épiphysaire constituée de cartilage de croissance qui se minéralisera à l'âge adulte. L'os est également un tissu richement vascularisé et innervé, les vaisseaux pénètrent par le foramen nourricier sur la diaphyse et se ramifient dans la longueur de l'os et vers la moelle osseuse.

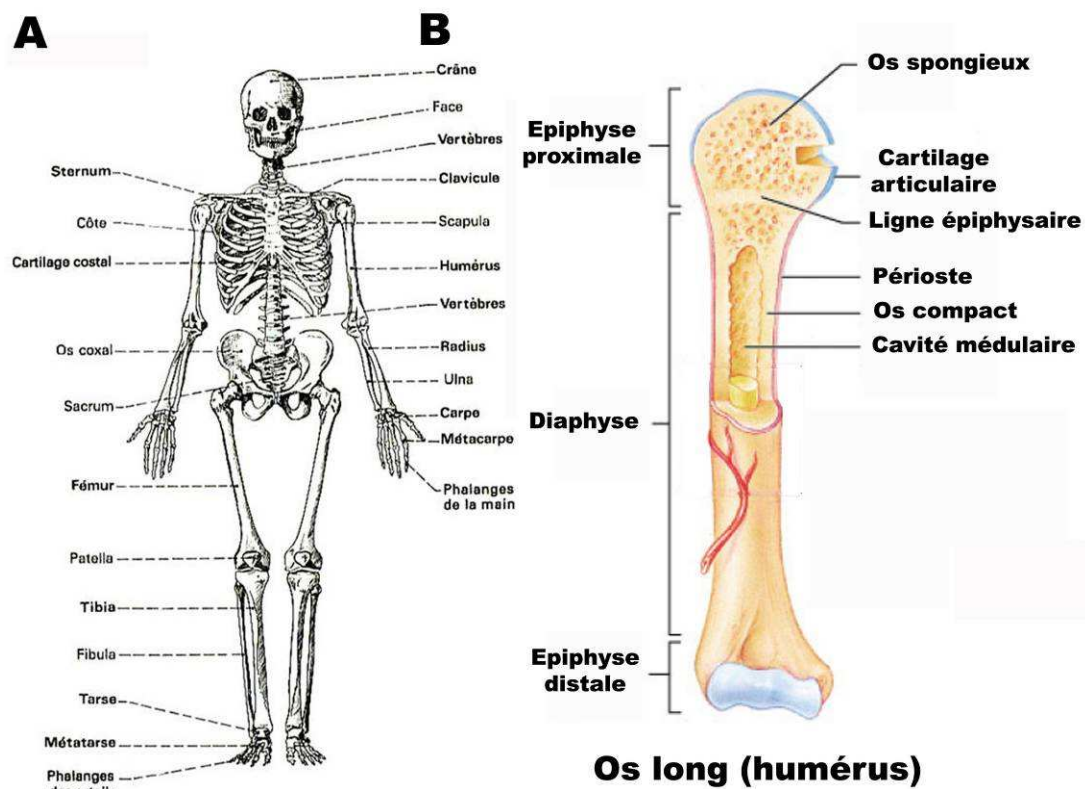


Figure 1 : Dessin anatomique du squelette humain et détail d'un os long. (Adapté de Benjamin Cummings, Pearson Education Inc, 2002)

(A) Reproduction picturale du squelette humain et de la diversité de forme de pièces osseuses. **(B)** Schéma d'un os long (humérus)

L'os spongieux est constitué de lamelles plus ou moins fines de matrice osseuse minéralisée, organisées en trabécules interconnectés. Les lamelles ne présentent pas de formes distinctes mais l'orientation de chacune d'elles converge suivant des lignes de force qui dissipent une partie de la contrainte mécanique qui s'applique sur la pièce osseuse (Figure 2 B). La perte osseuse liée à l'âge affecte surtout l'os trabéculaire qui voit couramment une diminution de ~50% de sa densité. Cependant cette perte osseuse se traduit par une diminution de ~70% de la résistance mécanique de l'os et indique la part majeure que semble jouer l'os trabéculaire dans la gestion de la contrainte mécanique (Mosekilde *et al*, 2000).

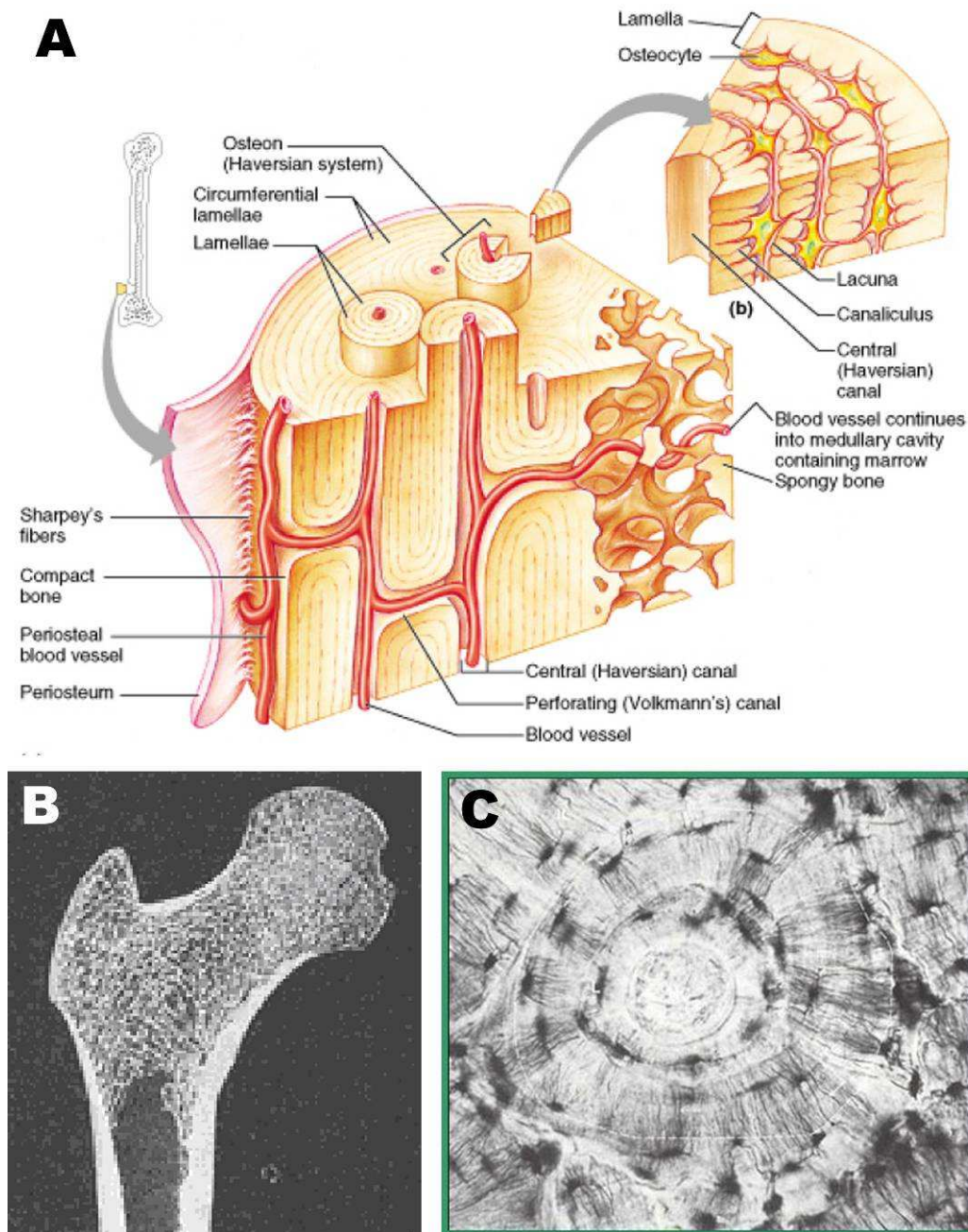


Figure 2 : Organisation de l'os compact et de l'os spongieux des os longs. (A, reproduit de Benjamin Cummings, Pearson Education Inc, 2002 ; B et C reproduit de Bloom et Fawcet, 1968)

(A) Reproduction picturale d'une coupe d'os compact et d'os spongieux. Les vaisseaux sanguins pénètrent dans la diaphyse et se ramifient dans l'os compact longitudinalement dans les canaux de Havers et latéralement en direction de l'os spongieux dans les canaux de Volkmann. **(B)** Coupe longitudinale de la diaphyse proximale d'un fémur. Les travées d'os spongieux forment une arche qui canalise les forces de compaction vers la matrice d'os compact. **(C)** Coupe transverse d'un système de Havers où l'on distingue le canal au centre et les lamelles osseuses concentriques percées des lacunes ostéocytaires et des canalicules.

Dans l'os compact, les lamelles osseuses sont plus larges et plus régulières que dans l'os trabéculaire (Figure 2 A). Elles s'étendent de façon ininterrompue sur la circonférence interne et externe de la diaphyse. Entre les lamelles externes et internes, elles s'empilent de

façon concentrique pour former des unités cylindriques nommées systèmes de Havers ou ostéones. Le cœur des ostéones délimite le canal de Havers où court longitudinalement un capillaire sanguin et parfois un nerf. Les canaux de Havers sont connectés entre eux, ils communiquent avec la surface de l'os et la moelle osseuse par des vaisseaux longitudinaux qui forment les canaux de Volkmann. Dans le volume de l'ostéone, un réseau radial d'orifices, les lacunes ostéocytaires, abritent les ostéocytes qui communiquent les uns les autres par de fins prolongements interconnectés dont l'empreinte forme les canalicules (Figure 2 C) (Bloom et Fawcett, 1968).

2. La matrice extra cellulaire du tissu osseux

La matrice osseuse se compose d'une trame de molécules organiques qui est renforcée par une phase minérale de phosphate de calcium organisée en cristaux d'hydroxyapatite. La présence de minéral rend cette matrice extra cellulaire (MEC) tout à fait particulière au regard des autres tissus conjonctifs.

La molécule de collagène de type I représente 90% de la masse organique de l'os. Les molécules de collagène I sont synthétisées par les ostéoblastes et s'organisent en fibrilles de plusieurs micromètres de long et qui apparaissent striées transversalement observées sur coupes en microscopie électronique à transmission. Les fibrilles de collagène procurent à l'os sa rigidité et sa résistance aux forces de tractions et de torsions. De nombreuses pathologies génétiques (*osteogenesis imperfecta*, ostéomalacie) ou liées à l'âge (ostéoporose) perturbent la molécule ou la fibrille de collagène et résultent en une perte effective de la résistance mécanique de l'os (Boskey *et al*, 1999). Globalement, les 10% restant de la matrice organique sont regroupés sous le nom de protéines non-collagéniques qui comprend l'ostéocalcine (OCA), l'ostéopontine (OPN), l'ostéonectine (OCN) et la *bone sialoprotein* (BSP). Leurs rôles dans la structuration et le remaniement de l'os ne sont pas à ce jour totalement résolus, mais leur présence au niveau du front de minéralisation du tissu ostéoïde semble les désigner comme régulateur de la formation de la phase minérale au sein des fibrilles de collagène (Roach, 1994). La distribution et la quantité de l'OPN et de la BSP varient en fonction de la maturité de l'os, et ces deux protéines sont également exprimées dans d'autres tissus que le tissu osseux, notamment dans les épithéliums et les cellules cancéreuses à caractère invasif (Nanci, 1999). Dans l'os, l'OPN est exprimée à la fois par les ostéoblastes et les ostéoclastes

et module la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (Mazzali *et al*, 2002). Aux protéines non collagéniques on doit également ajouter les protéoglycanes et les molécules osidiques qui ont une activité dans la différenciation ostéoblastique mais sont tout de même très minoritaires dans l'os par rapport à d'autres MEC (i.e. cartilage) (Parisuthiman *et al*, 2005).

La phase minérale est composée de phosphate de calcium qui représente ~65% de la masse sèche de l'os chez l'homme adulte (Bloom et Fawcett, 1968) et confère à l'os sa dureté. Au sein de cette phase, les minéraux sont organisés en cristaux d'hydroxyapatite (HA) de stoechiométrie $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cependant, la phase minérale s'avère souvent modifiée par rapport à sa composition idéale. Elle est régulièrement retrouvée carbonatée (CO_3), les atomes de calcium substitués par du magnésium ou du sodium et le groupement hydroxyle par des ions chlore ou fluor (LeGeros, 2002). Les cristaux de HA sont en forme de plaquettes de petite taille (50*25*5nm), déposés parallèlement à l'axe longitudinal des fibrilles de collagène qu'ils relient les unes aux autres latéralement (Weiner *et al*, 1999).

Dans l'os compact, les lamelles de matrice osseuse s'organisent de façon concentrique autour du canal de Havers pour former un ostéone (Figure 3 A). Lorsque l'on observe des ostéones sur coupes minces en lumière polarisée il apparaît une alternance de bandes sombres et brillantes qui reflète un changement dans l'orientation des fibrilles de collagène au sein même des lamelles osseuses (Figure 3 B). Dans les lamelles, les fibrilles de collagène sont organisées suivant des plans concentriques successifs où elles sont parallèles entre elles. En revanche, l'orientation des fibrilles entre chaque plan successif varie. Si l'angle que forment les fibrilles entre deux plans est proche de 90° les ostéones apparaissent en lumière polarisée totalement sombres ou totalement brillants. Si l'angle est faible et constant il en résulte une organisation hélicoïdale des fibrilles de collagène (Figure 3 C). Cette organisation hélicoïdale des fibrilles de collagène dans l'os compact a été comprise et révélée à partir de coupes obliques pratiquées dans la matrice osseuse décalcifiée et observées en microscopie électronique à transmission (Giraud-Guille, 1988 et 1996), et confirmée dans l'os calcifié, après cryofracture, en microscopie électronique à balayage (Weiner *et al*, 1999).

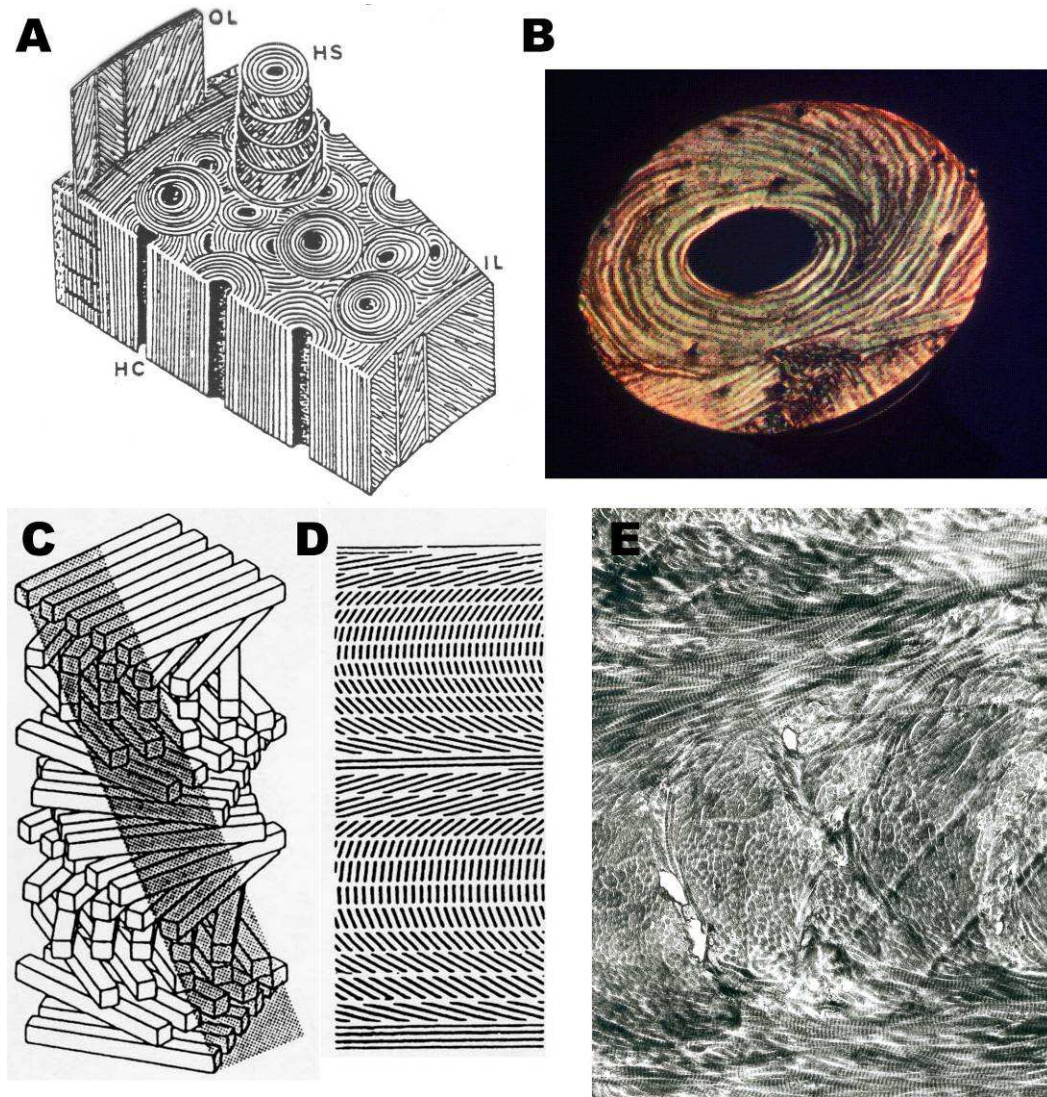


Figure 3 : Organisation des fibrilles de collagène dans l'os compact (A, C-E reproduit de Giraud-Guille, 1988)

(A) Schéma de Y. Bouligand des lamelles concentriques de l'os compact (OL : lamelle externe ; OL : lamelle interne ; HS : système de Havers ; HC : canal de Havers). (B) Alternance de lamelles sombres et brillantes dans un ostéone de type intermédiaire. (C et D) Représentation de l'organisation hélicoïdale des fibrilles de collagène dans la lamelle osseuse. La zone grisée montre le plan de coupe oblique et les arceaux qui résultent de cette coupe sont présentés en (D). (E) Coupe oblique dans la matrice d'os décalcifié où l'on observe un arceau formé par l'organisation hélicoïdale des fibrilles de collagène qui sont orientées longitudinalement, de part et d'autre de l'arceau, et transversalement à son sommet.

Une coupe oblique à travers la succession de plans hélicoïdaux fait apparaître des séries d'arceaux superposés dans le plan de coupe (Figure 3 D). Ces arceaux sont fictifs, ils ne sont pas formés par des fibres recourbées. Il s'agit d'une illusion d'optique générée par l'orientation continue des fibrilles dans le plan de coupe, longitudinale à la base des arceaux où l'on reconnaît très bien la striation, transverse au sommet et orientées à 180° d'un arceau à l'autre (Figure 3 E). Cette structure hélicoïdale s'apparente à une phase cristalline liquide

stabilisée, la phase cholestérique, que les molécules de collagènes peuvent adopter à forte concentration *in vitro* (Besseau *et al*, 1995 ; Giraud-Guille *et al*, 2005).

3. Les cellules de l'os

Rapporté à sa masse, la part cellulaire de l'os apparaît faible face à la matrice extracellulaire. Néanmoins, l'os est le siège d'une activité cellulaire importante et continue qui voit le renouvellement de l'intégralité de la matrice osseuse d'un individu en ~10 ans. Deux types cellulaires participent de façon directe au remaniement du tissu osseux : les ostéoblastes qui sont les cellules spécialisées dans la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse et les ostéoclastes qui vont résorber la matrice osseuse minéralisée. A ces deux cellules il faut ajouter les ostéocytes qui sont, en nombre, les cellules les plus importantes de l'os et correspondent à un stade ultime de différenciation des ostéoblastes.

Les ostéoblastes sont issus de progéniteurs mésenchymateux localisés dans le stroma médullaire de la diaphyse et dans les membranes conjonctives du périoste et de l'endoste. Ces cellules progénitrices sont indifférenciées et pluripotentes et donnent naissance, sous l'action de facteurs de transcriptions spécifiques, à la fois aux ostéoblastes mais également aux chondroblastes (cellules du cartilage), aux adipocytes et aux myoblastes (cellules musculaires striées) (Manolagas, 2000 ; Marie, 2001 ; Katagiri et Takahashi, 2002). Sous l'action du facteur de transcription PPAR γ 2, les progéniteurs mésenchymateux se différencient en adipocytes et en cellules ostéoprogénitrices. Ces dernières se différencieront en chondroblastes sous l'action spécifique du facteur de transcription Sox 9 alors que l'expression du facteur de transcription Cbfa1/Runx2 engagera ces cellules dans la voie de différenciation ostéoblastique (Figure 4 A). Le processus de différenciation ostéoblastique est continu. Progressivement la morphologie des cellules évolue d'une forme de type fibroblastique en des cellules cuboïdes possédant un large noyau et organisées à la surface de l'os en un épithélium d'ostéoblastes matures qui synthétisent le tissu ostéoïde. Ces transitions morphologiques s'accompagnent de l'apparition puis de l'augmentation de l'expression de certaines protéines qui reflètent le degré de maturité des ostéoblastes et parmi lesquelles on doit citer la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéocalcine et l'ostéopontine (Figure 4 B). En tant que cellules spécialisées dans la sécrétion de la MEC, les ostéoblastes

présentent en ultrastructure un réticulum endoplasmique abondant et associé aux ribosomes ainsi qu'un appareil de Golgi et un système vésiculaire bien développé (Mackie, 2003).

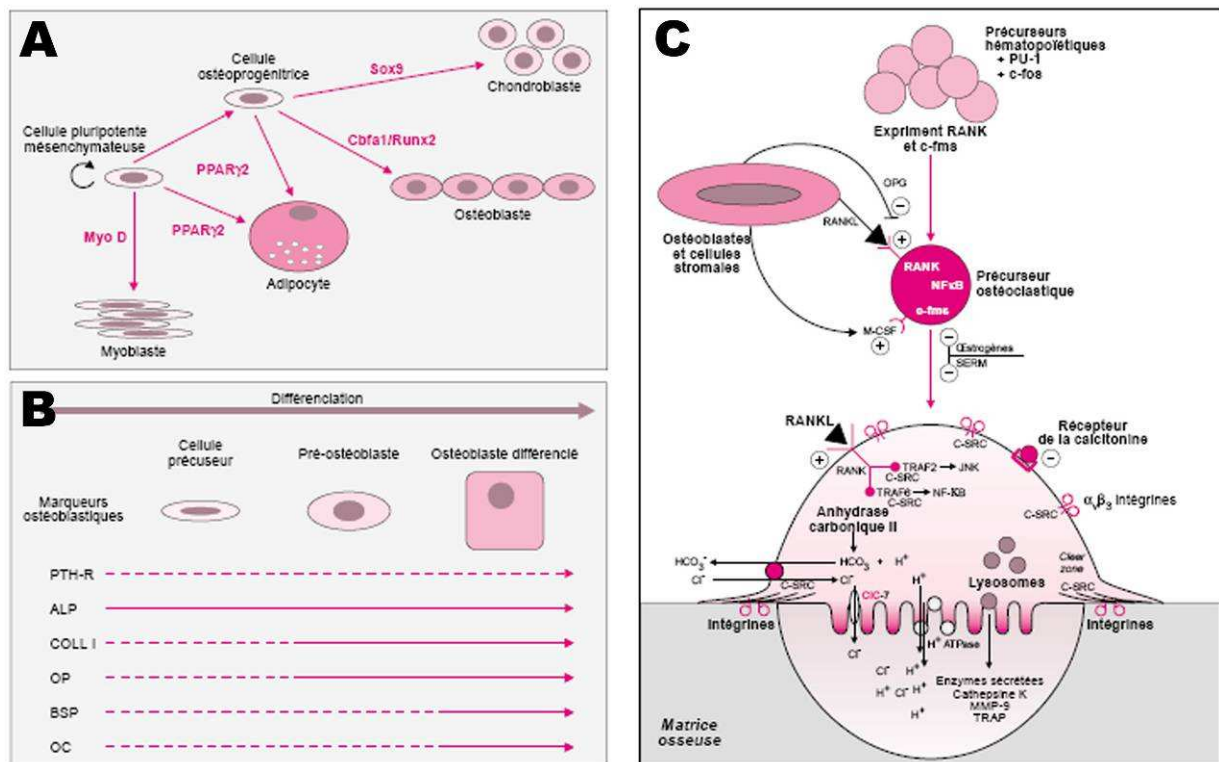


Figure 4 : Schéma de différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes

(A) Différenciation des ostéoblastes à partir des progéniteurs mésenchymateux pluripotents. On note la diversité de cellules que peuvent fournir ces précurseurs et l'interconnexion qui existe entre les voies de différenciation. (B) Schéma des transitions morphologiques et de l'expression des marqueurs ostéoblastiques au cours de la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes matures. (C) Schéma de la différenciation ostéoclastique et de l'activité lytique des ostéoclastes matures à la surface de la matrice osseuse minéralisée. Les ostéoblastes participent directement à la différenciation des ostéoclastes par des actions inductrices (RANK-L) et inhibitrices (OPG). Les ostéoclastes matures créent une zone étanche à la surface de la matrice osseuse qu'ils acidifient pour libérer la phase minérale puis digèrent la matrice organique par des enzymes spécifiques (Cathepsine K et MMP-9).

(A et B reproduit de Marie, 2001 ; C reproduit de Baron, 2001).

Les ostéoclastes sont pour leur part des cellules d'origine hématopoïétique. Ils se différencient à partir des précurseurs de la lignée monocyttaire présents dans la moelle osseuse (Figure 4 C). Certaines de ces cellules vont s'engager dans la voie de différenciation ostéoclastique par l'action de facteurs systémiques tels que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 et l'hormone parathyroïdienne (PTH) mais également sous l'action directe des ostéoblastes et des cellules stromales par la voie RANK/RANK-Ligand. Les précurseurs ostéoclastiques expriment à leur surface le récepteur RANK (*Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa B*) et les ostéoblastes expriment le ligand du récepteur RANK, ou RANK-L, qui est lui aussi

membranaire. La nature membranaire de ce système ligand-récepteur nécessite donc un contact direct entre les ostéoblastes et les ostéoclastes pour déclencher le signal de différenciation. La différenciation ostéoclastique est également inhibée par les ostéoblastes qui secrètent un analogue soluble de RANK, l'ostéoprotégérine (OPG). Celle-ci va se lier au ligand RANK-L présent à la surface des ostéoblastes et ainsi le rendre indisponible pour le récepteur RANK des ostéoclastes (Teitelbaum, 2000 ; Baron, 2001 ; Katagiri et Takahashi, 2002).

La matrice osseuse est constamment renouvelée afin d'assurer la constance de ses capacités mécaniques en maintenant sa composition biochimique et son organisation. On estime que ~10% du squelette est renouvelé chaque année et qu'une même zone est renouvelée tous les ~2-5 ans (Parfitt AM, 1994 ; Manolagas, 2000). Les ostéoclastes et les ostéoblastes vont agir de concert dans le renouvellement de la matrice osseuse au sein des BMU (*Basic Multicellular Unit*) qui sont des structures anatomiques microscopiques à la surface des lamelles osseuses (Hill et Orth, 1998 ; Riggs et Parfitt, 2005). Les ostéoclastes arrivent à la surface de la BMU par le système vasculaire qui irrigue l'intégralité de la pièce osseuse (Figure 5). Là, l'ostéoclaste s'ancre très fortement à la matrice osseuse minéralisée, via des intégrines, et crée une zone étanche bordée par sa membrane plasmique (Figure 4 C). Sur cette face, la membrane des ostéoclastes a une structure en brosse pour augmenter la surface de contact avec la matrice minéralisée. Des pompes à protons ATP-dépendantes vont acidifier le milieu et solubiliser le minéral de la matrice osseuse. Par la suite, la matrice organique est dégradée par des protéases dont notamment la Cathépsine K et la Matrix Metallo Proteinase 9 (MMP-9).

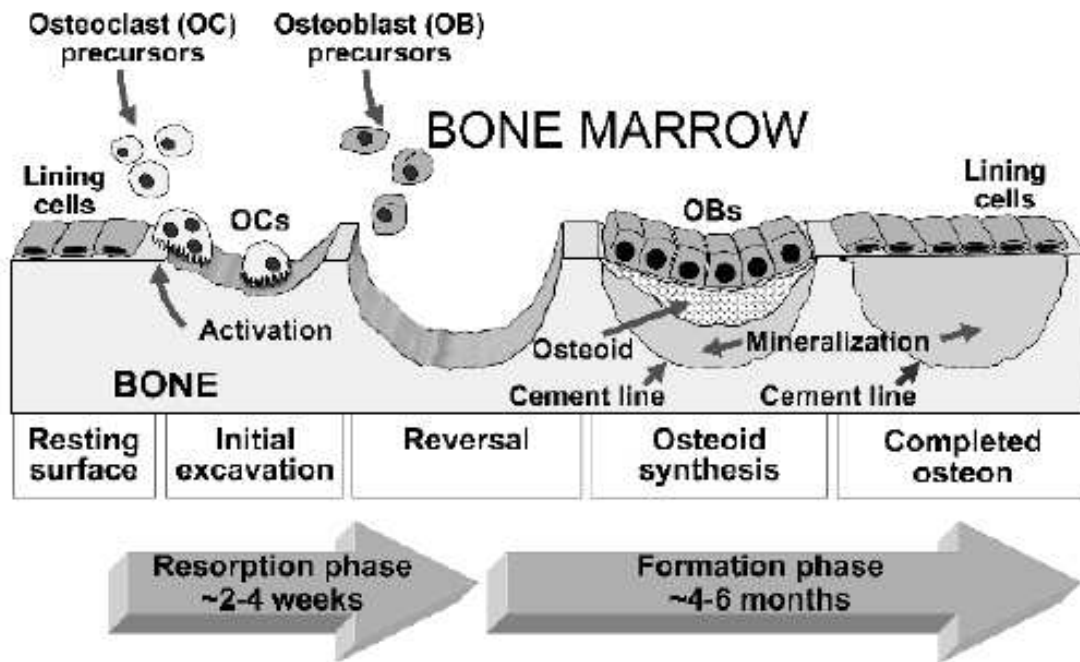


Figure 5 : Schéma du remodelage osseux au niveau d'une *Bone Multicellular Unit* (BMU).

La BMU est localisée dans l'espace et évolue dans le temps. Les cellules bordantes de l'os sont activées et se rétractent pour laisser la place aux précurseurs ostéoclastiques provenant de la moelle osseuse ou des cellules circulantes. Une fois activés, les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse minéralisée puis se déplacent vers une autre BMU ou bien, sont éliminés par apoptose. A la suite de la libération de la zone dégradée, les précurseurs ostéoblastiques la colonisent et se différencient en ostéoblastes matures qui vont progressivement la combler par du tissu ostéoïde qui se minéralise par la suite. Au cours de son comblement, des ostéoblastes vont se retrouver piégés dans la matrice osseuse et se différencier en ostéocytes. Une fois la lacune comblée, une partie des ostéoblastes meurent par apoptose et une autre se différencie en cellules bordantes pouvant être de nouveau activées pour initier un nouveau cycle de remodelage. (Reproduit de Riggs et Parfitt, 2005).

A la suite de la dégradation les ostéoclastes se détachent et migrent vers une autre zone à remanier. Les ostéoblastes matures succèdent aux ostéoclastes dans la lacune de résorption. Ils vont la combler par synthèse du tissu ostéoïde contenant les éléments organiques de la matrice osseuse qui est progressivement minéralisé avec un certain retard. Une fois la lacune comblée, la majorité des ostéoblastes sont éliminés par apoptose (Mackie, 2003). Une partie des ostéoblastes se différencie en cellules bordantes, ostéoblastes immatures pouvant être activés. Une autre partie va se retrouver enchâssée dans leur propre matrice et effectuer une étape ultime de différenciation pour devenir des ostéocytes (Knothe Tate *et al.*, 2004).

Les ostéocytes sont considérés comme les cellules de veille de l'os mais sont à ce jour mal connues quant à leurs fonctions et leur régulation. Elles sont ~10 fois plus nombreuses que les ostéoblastes et ont une durée de vie estimée à environ 25 ans (Franz-Ondendall *et al.*, 2006). Leur morphologie est drastiquement différente de leurs précurseurs ostéoblastiques.

Leur corps cellulaire est plus réduit autour du noyau et présente un système RE-Golgi moins développé associé à une activité de synthèse de matrice osseuse plus faible voir résiduelle. De plus, ils portent de longs prolongements cytoplasmiques qui comblerent les canalicules de la matrice osseuse en direction des ostéoblastes en surface, des ostéocytes environnant et de la moelle osseuse. Les prolongements sont terminés par des jonctions communicantes (*gap junctions*) formées par un assemblage moléculaire de connexines qui permettent le passage de petites molécules de masse moléculaire de 1-1,5kDa. Ainsi, il est réalisé dans toute la matrice osseuse un syncytium fonctionnel qui permet l'information et la communication des éléments cellulaires dans toute la pièce osseuse (Shapiro, 1997). Actuellement, on pense que les ostéocytes sont sensibles aux contraintes mécaniques par modification du fluide qui circule dans les canalicules. Leur fonction serait de recruter les ostéoblastes pour renforcer des zones profondes de l'os dont les capacités mécaniques seraient diminuées (Bonewald et Johnson, 2008).

4. Formation, croissance et réparation de l'os

Les pièces osseuses naissent de deux schémas embryologiques distincts. Les os plats, et notamment ceux du crâne et de la face, sont formés par ossification membraneuse (ou endoconjonctive) directement à partir des cellules mésenchymateuses. Celles-ci se condensent en des points de nucléations richement vascularisés et se différencient en ostéoblastes qui vont synthétiser la matrice osseuse. Il se forme des plaques osseuses fines qui croissent vers la périphérie et qui seront plus tard remaniées en lamelles osseuses (Bloom et Fawcett, 1968).

Les os longs sont formés à partir d'une ébauche cartilagineuse par ossification dite endochondrale (Bloom et Fawcett, 1968 ; Ortega *et al*, 2004). Tout comme lors de l'ossification membranaire, les cellules du mésenchyme se condensent mais, cette fois ci, se différencient en chondroblastes qui vont synthétiser une matrice cartilagineuse (collagène de type II) qui va être minéralisée (Figure 6 A). Les chondrocytes se différencient en chondrocytes hypertrophiques ce qui entraîne une élongation verticale de la matrice cartilagineuse par augmentation de leur volume.

Par le centre de la diaphyse (*Bonecollar*) des vaisseaux sanguins pénètrent la matrice cartilagineuse et entraînent avec eux les précurseurs ostéoclastiques, qui vont dégrader

l'ébauche cartilagineuse minéralisée, et les précurseurs ostéoblastiques qui vont apposer le tissu ostéoïde et le minéraliser.

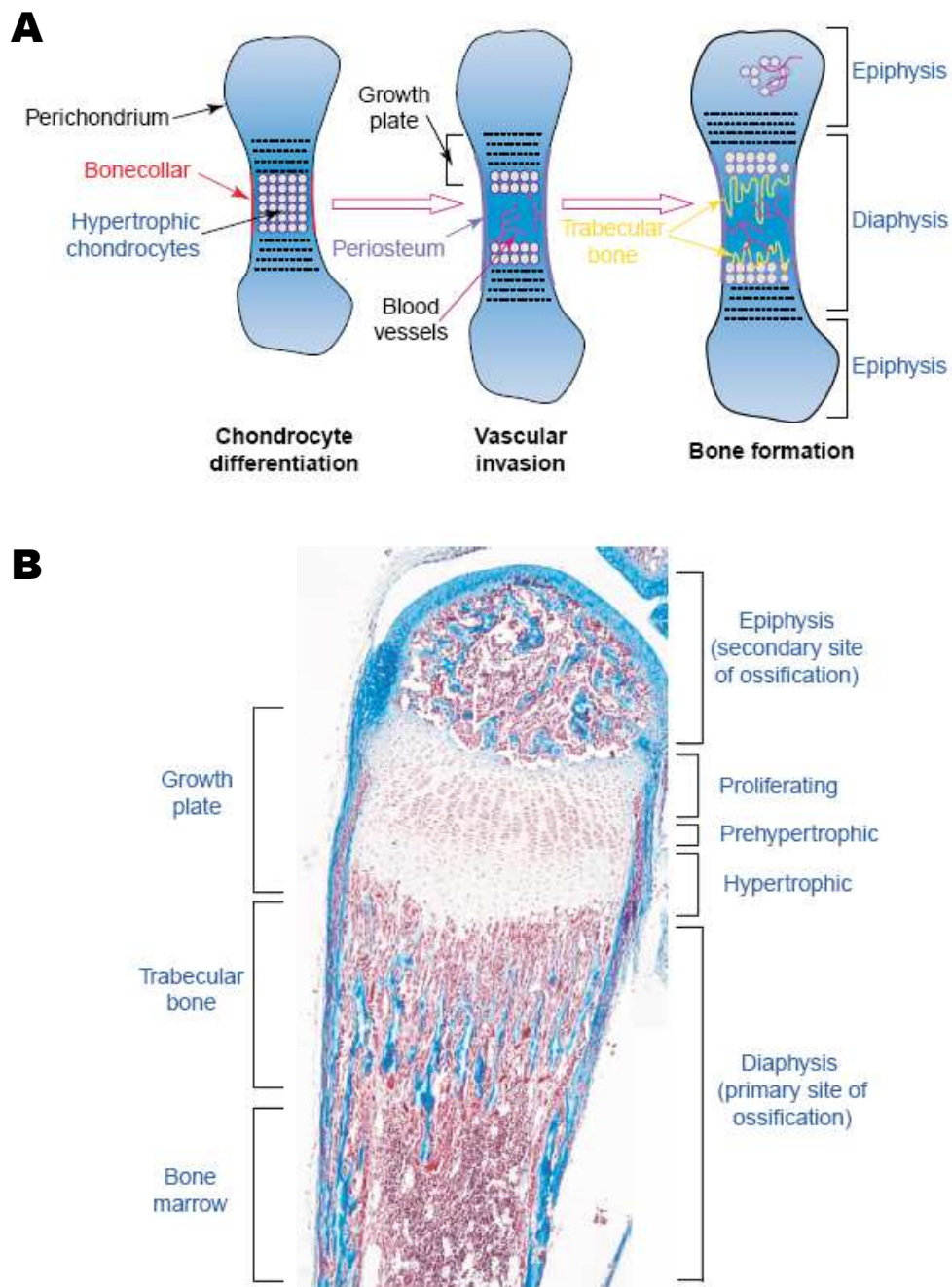


Figure 6 : Schéma des étapes de l'ossification endochondrale et vue en coupe de la plaque de croissance. (Reproduit de Ortega et al, 2004)

(A) Ossification endochondrale des os long. Une première ébauche de la pièce osseuse est formée à partir d'une matrice cartilagineuse minéralisée. Des vaisseaux sanguins pénètrent ce cartilage et entraînent avec eux les ostéoclastes et les ostéoblastes qui vont remanier l'ébauche cartilagineuse pour former un os minéralisé. **(B)** Coupe longitudinale d'un os en croissance. Au niveau de la plaque de croissance les chondroblastes prolifèrent et se différencient en chondroblastes hypertrophiques ce qui entraîne la croissance verticale de l'os. Progressivement la matrice cartilagineuse de la plaque de croissance est transformée en os minéralisée au niveau de la diaphyse et des épiphyses. A la fin de la croissance, la plaque de croissance est intégralement minéralisée pour donner la ligne épiphysaire.

Les chondroblastes sont repoussés vers les extrémités de la diaphyse, au niveau de la plaque de croissance, où ils vont continuer de synthétiser une matrice cartilagineuse. Des sites d'ossification secondaire indépendants de la diaphyse apparaissent au niveau des deux épiphyses qui vont donc être progressivement ossifiées.

La croissance de l'os se réalise verticalement (dans l'axe de la diaphyse) au niveau de la plaque de croissance (figure 6 B). Dans cette zone les chondroblastes se multiplient et se différencient en chondroblastes hypertrophiques ce qui repousse vers le haut et le bas les limites de la pièce osseuse. Au fur et à mesure, la matrice cartilagineuse de la plaque de croissance est convertie en os minéralisé au niveau de la diaphyse et des deux épiphyses. La matrice cartilagineuse de la plaque de croissance subsiste dans l'os jusqu'à l'âge adulte de l'individu (arrêt de la croissance osseuse) où elle sera totalement transformée en os minéralisé pour donner la ligne épiphysaire.

Le tissu osseux a la particularité de pouvoir se régénérer après une fracture ou une lésion limitée en taille. A la suite de la fracture, il se constitue un cal fibreux composé d'éléments sanguins coagulés et de tissu mésenchymateux informe qui relie les deux fragments d'os. Comme au cours de l'ossification endochondrale, le cal fibreux va être envahi par des chondroblastes qui vont synthétiser une matrice cartilagineuse en lieu et place du cal fibreux (Gerstenfeld *et al*, 2003). Progressivement, les ostéoclastes vont envahir le cal cartilagineux, le dégrader et remodeler les surfaces des pièces fracturées. A la suite des ostéoclastes, les ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice osseuse minéralisée pour former le cal osseux. A ce stade, les pièces osseuses sont raboutées et un dernier processus de remaniement réduira le volume du cal osseux pour redonner à l'os sa forme et sa composition biochimique d'avant le traumatisme.

II La molécule de Collagène

Le terme de « collagène » est à l'origine un néologisme de la langue française (de colle et gène : qui engendre la cohésion), utilisé au cours du XIX^e siècle par les histologistes pour la description de la substance fondamentale des tissus conjonctifs (van der Rest et Garrone, 1991). Le collagène consiste en une famille de protéines, largement répandue dans le règne animal, qui représente ~30% des protéines des vertébrés et est également rencontrée chez certains invertébrés. Le collagène est également ubiquitaire dans un nombre important de tissus d'un même organisme où il participe à la structuration des matrices extracellulaires et assure, en plus d'une protection mécanique, des points d'ancrages aux cellules environnantes. Longtemps considérées comme passives, on constate de plus en plus que les MEC ont un rôle actif dans la croissance et la différenciation cellulaire. Le réseau formé par les molécules de la MEC, dont les collagènes, piège les facteurs de croissances solubles qui pourront être ainsi progressivement libérés au cours du remaniement de la MEC. La digestion de la matrice entraîne également la libération de fragments peptidiques contenus dans les chaînes protéiques de ses constituants qui peuvent induire la différenciation ou la prolifération cellulaire (Davis *et al*, 2000).

Du fait de son abondance dans les tissus et de sa hiérarchie de structure, la molécule de collagène, et particulièrement le collagène de type I, a été très étudiée que ce soit d'un point de vue physicochimique, biochimique ou pour ses fonctions dans les tissus. Les données présentées ici ont été recueillies à partir des publications de référence de Ramachandran (1954 et 1967) ; Woodhead-Galloway (1980 et 1982), van der Rest et Garrone (1991), Kadler *et al*, (1996 et 2007), et de Canty et Kadler (2005).

1. Le collagène : une famille de protéines des matrices extra cellulaires

L'appartenance d'une protéine à la famille des collagènes se fait par la présence d'un motif d'acides aminés spécifique et d'un domaine en triple hélice dans sa structure tertiaire. La séquence primaire des molécules de collagène présente le motif répété Gly-X-Y, où à la position X on retrouve le plus souvent une proline et à la position Y une hydroxyproline. Chaque molécule de collagène est constituée de trois chaînes polypeptidiques, nommées chaînes α , structurées en une hélice gauche qui s'associent entre elles pour former une triple

hélice droite. Suivant la molécule de collagène considérée, la triple hélice peut être homotypique, c'est-à-dire formée par l'assemblage de trois chaînes α identiques, ou hétérotypique, résultant de l'association de au moins deux chaînes α différentes.

A ce jour 28 molécules de collagène ont été identifiées, réparties selon 7 groupes en fonction de leur structure primaire et de leur organisation supramoléculaire (figure 7).

Les collagènes qui s'organisent en fibrilles sont les plus fréquemment rencontrés dans les tissus et représentent ~90% de l'ensemble des collagènes. Dans ce groupe on peut citer les plus importants que sont les collagènes I, II, III et V. Le collagène I est un hétérodimère de 2 chaînes $\alpha_1(I)$ et 1 chaîne $\alpha_2(I)$, retrouvé majoritairement dans le derme, l'os, le tendon et la cornée, et de façon plus minoritaire dans d'autres tissus. Le collagène de type II est le composant majoritaire de la matrice cartilagineuse, il s'organise en un homotrimère de trois chaînes $\alpha_1(II)$ codées par le même gène. Le collagène V forme un hétérotrimère de trois chaînes $\alpha_{1-3}(III)$ différentes. Il a la particularité de s'associer en hétérofibrilles avec le collagène I et III, notamment dans l'os.

Les collagènes de la famille FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triplehelix) sont retrouvés à la surface des collagènes fibrillaires et semblent impliqués dans la régulation de leur diamètre. Leur structure, en triple hélice interrompue, les rend plus souples que les triples hélices pleines chaînes, ce qui augmente le nombre et la forme d'arrangements supra moléculaires potentiels. Dans cette famille, les collagènes XII et XIV sont retrouvés associés aux fibrilles de collagène I dans le périoste.

La famille des collagènes formant des réseaux est elle aussi très étudiée, notamment pour leurs rôles dans la constitution des membranes basales, essentielles en tant que support des épithéliums. Dans cette MEC, le collagène IV est majoritaire. Il possède la spécificité d'être codé par 6 gènes dont les produits s'associent pour former trois hétérodimères différents dont la forme $[\alpha_1(IV)_2 \alpha_2(IV)]$ est majoritaire et la mutation létale pour l'embryon (Gelse *et al*, 2003).

Les collagènes formant des filaments perlés (*beaded filament*), dont la molécule phare est le collagène VI, sont retrouvés dans un grand nombre de tissus où ils forment des liens structuraux avec les cellules. Les triples hélices de collagène VI (hétérotrimère) s'associent deux à deux pour former un dimère, qui s'associe avec un second dimère pour former un tétramère qui finalement, s'organiseront les uns à la suite des autres en microfibrilles flexibles présentant des excroissances latérales de leurs parties globulaires (apparaissant comme des perles).

Collagen Family	Collagen type	Genes	Supramolecular organization in tissues (where known)
Collagènes fibrillaires	I	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	Fibrils in tendon, bone, skin, cornea and blood vessel walls
	II	<i>COL2A1</i>	Fibrils in cartilage
	III	<i>COL3A1</i>	Forms heterotypic fibrils with type I collagen
	V	<i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i> <i>COL5A3</i>	Forms heterotypic fibrils with type I
	XI	<i>COL11A1</i> <i>COL11A2</i> <i>COL2A1</i>	Forms heterotypic fibrils with type II
	XXIV	<i>COL24A1</i>	Expressed in tissues containing type I collagen
	XXVII	<i>COL27A1</i>	Widespread expression particularly in cartilage
Collagènes formant des réseaux	IV	<i>COL4A1</i> <i>COL4A2</i> <i>COL4A3</i> <i>COL4A4</i> <i>COL4A5</i> <i>COL4A6</i>	Network in basement membrane
	VIII	<i>COL8A1</i> <i>COL8A2</i>	3D hexagonal lattice in Descemet's membrane in the eye
	X	<i>COL10A1</i>	Mat-like structure/hexagonal lattice in the hypertrophic zone of the growth plate
FACIT	IX	<i>COL9A1</i> <i>COL9A2</i>	Associated with type II collagen fibrils
	XII	<i>COL12A1</i>	Associated with type I fibrils
	XIV	<i>COL14A1</i>	Associated with type I fibrils
	XVI	<i>COL16A1</i>	Component of specialized fibrillin-rich microfibrils in skin and type II collagen fibrils in cartilage
	XIX	<i>COL19A1</i>	Radially distributed aggregates formed by association at one end in vitro
	XX	<i>COL20A1</i>	May be associated with type I collagen fibrils
	XXI	<i>COL21A1</i>	May be fibril associated, widespread expression pattern
XXII	<i>COL22A1</i>	Located in specific tissue junctions and may be associated with microfibrils	
Collagènes formant des filaments perlés	VI	<i>COL6A1</i> <i>COL6A2</i> <i>COL6A3</i>	Fine microfibrils with ubiquitous distribution (distinct from fibrillin-containing microfibrils)
	XXVI	<i>COL26A1</i>	Expressed in testis and ovary of adult tissues
	XXVIII	<i>COL28A1</i>	Associated with basement membranes around Schwann cells
Collagène d'ancrage aux épithéliums	VII	<i>COL7A1</i>	Forms anchoring fibrils in skin at the dermal/epidermal junction (basement membrane)
Collagènes transmembranaires	XIII	<i>COL13A1</i>	Transmembrane and possibly involved in cell adhesion
	XVII	<i>COL17A1</i>	Transmembrane component of hemidesmosomes (cell-cell junctions), which attach epidermis to basement membrane in skin
	XXIII	<i>COL23A1</i>	Transmembrane collagen identified in cell culture
	XXV	<i>COL25A1</i>	Transmembrane collagen, cleaved form present in Alzheimer's amyloid plaques in neurons
Collagènes partiellement identifiés	XV	<i>COL15A1</i>	Specialized basement membranes, cleaved to produce antiangiogenic fragment (restin)
	XVIII	<i>COL18A1</i>	Cleaved to produce antiangiogenic fragment (endostatin)

Figure 7: Présentation des 28 molécules de collagène identifiées à ce jour et organisées suivant les 7 groupes structuraux. (adapté de Canty et Kadler, 2005)

Les gènes codant pour les chaînes α de chacune des molécules sous la forme COLxAy où x représente le type de collagène et y le numéro de la ou les chaînes α qui le constitue.

2. Structure et biosynthèse du collagène de type I

La molécule de collagène I est synthétisée sous la forme d'un précurseur, le procollagène, composé de 2 chaînes pro- α_1 et d'une chaîne pro- α_2 qui résultent de la transcription puis de la traduction respective des gènes COL1A1 et COL1A2. Chaque chaîne α est composée d'environ 1400 acides aminés qui présentent une partie globulaire à leur extrémité N- et C-terminale de 10nm de long et le motif Gly-X-Y répété dans leur partie centrale sur une distance de ~300nm (figure 8 A). La présence de glycines, dont la chaîne latérale est composée d'un unique atome d'hydrogène, permet aux trois chaînes polypeptidiques de s'associer en une triple hélice. Les glycines vont se retrouver à l'intérieur de l'édifice et les résidus X et Y exposeront leurs chaînes latérales plus encombrantes à la surface de la triple hélice (figure 8 B).

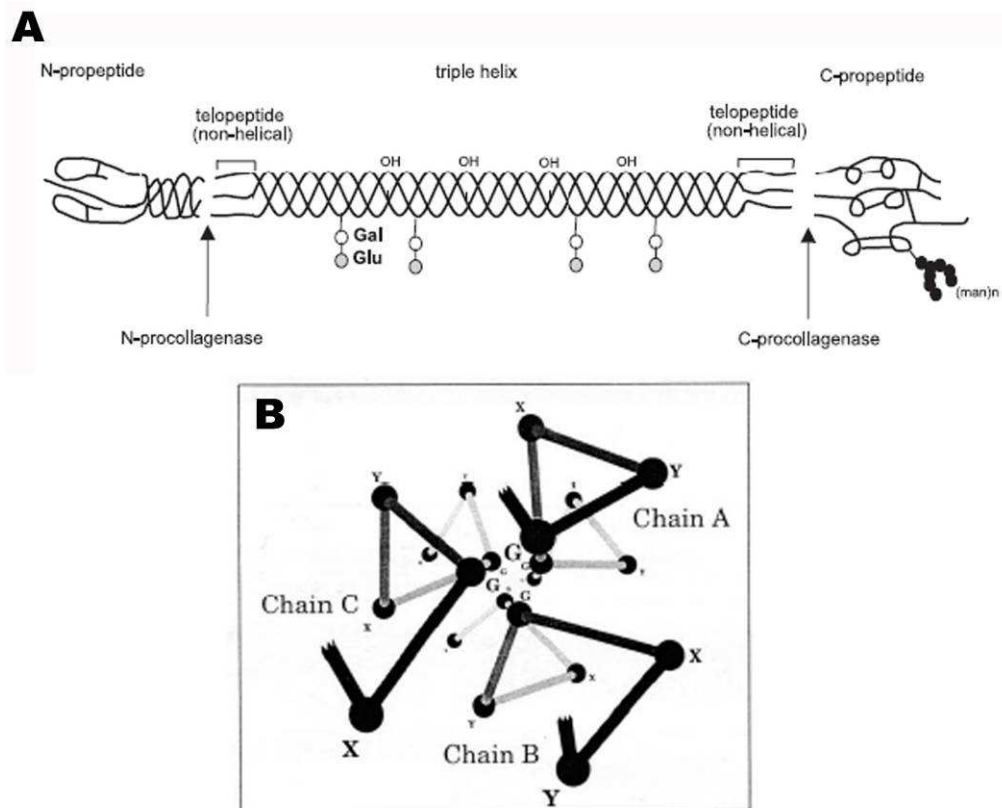


Figure 8 : Organisation des chaînes α de collagène I en triple hélice

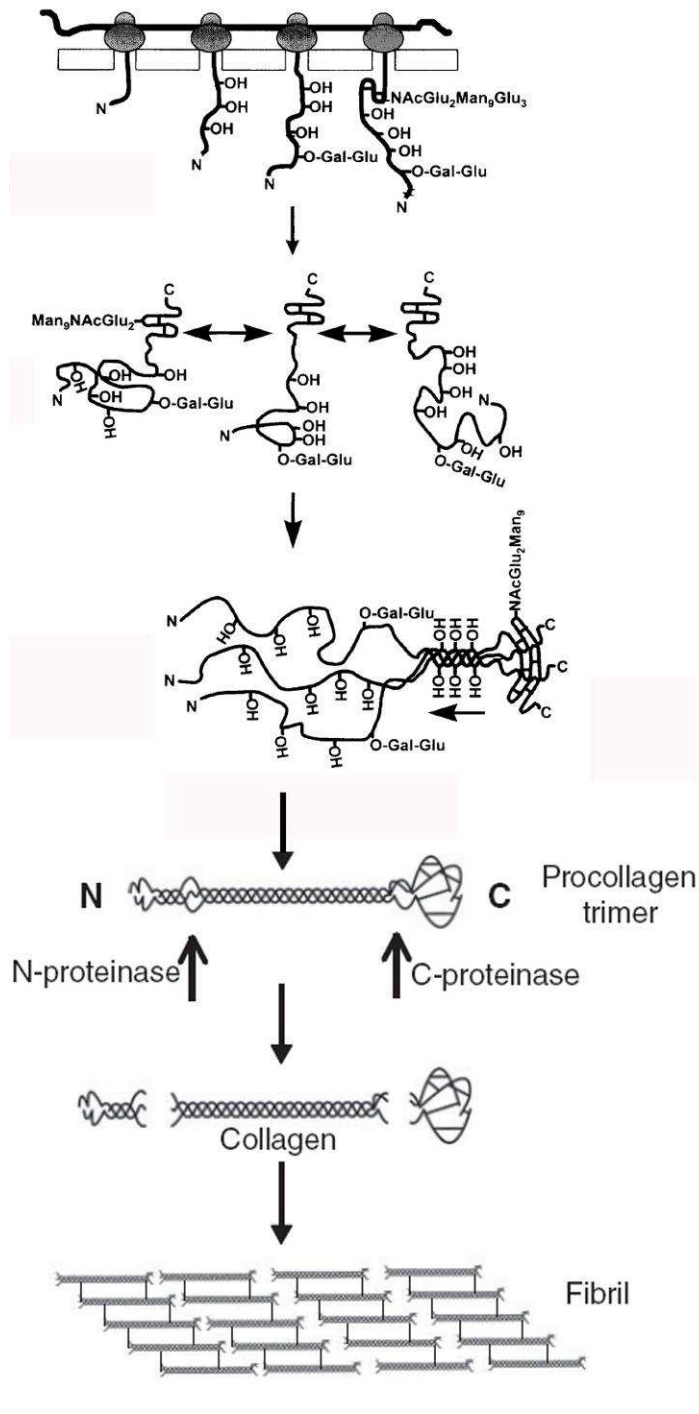
(A) Schéma de la structure moléculaire du procollagène I en vue latérale. Le domaine hélicoïdal central est modifié par l'ajout de sucres et l'hydroxylation de résidus proline et lysine lors de la synthèse de la protéine dans le RE. Figure reproduite de Gelse *et al*, 2003.

(B) Reproduction de l'organisation des trois chaînes α dans le domaine triple hélice de la molécule de collagène. Pour des raisons de moindre encombrement stérique les résidus glycines (G) sont présents au cœur de l'hélice. Les autres résidus se trouvent exposés à la surface de l'édifice et vont lui donner ses caractéristiques physicochimiques (charge et pH). Figure reproduite de van der Rest et Garonne, 1991.

La position X est très régulièrement occupée (environ une fois sur trois) par des prolines ou des lysines qui vont être hydroxylées par des enzymes spécifiques. Les prolines sont majoritairement hydroxylées sous la forme de 4-hydroxyprolines par la prolyl-4-hydroxylase. Les lysines sont modifiées en hydroxylysines par les lysylhydroxylases. Ces enzymes nécessitent comme co-facteurs des atomes de fer, du dioxygène et de l'ascorbate pour réaliser la réaction d'oxydation des acides aminés. L'hydroxylation des résidus prolines permet la création de liaisons hydrogènes entre les chaînes α ce qui stabilise la triple hélice et lui confère son caractère semi-rigide. L'hydroxylation des lysines crée des sites de O-glycosylation où sont greffés séquentiellement, et par des enzymes spécifiques, un galactose puis un glucose. La position Y est le plus souvent occupée par des lysines, dont le groupement amine libre permet l'ajout de groupement osidiques acétylés. Les ajouts de sucre lors du *processing* de la protéine dans le RE ainsi que le degré et la position des hydroxylations des résidus Pro et Lys est dépendant du type de cellules (et donc du tissu) qui sécrètent la molécule de collagène I.

Les trois chaînes α sont synthétisées et modifiées dans le réticulum endoplasmique indépendamment l'une de l'autre (figure 9). Par des processus encore mal connus et faisant appel à des protéines chaperonnes, les trois chaînes polypeptiques s'associent pour former une structure globulaire à leur extrémité C-terminale. Cette structure est stabilisée par des ponts disulfures intra et inter-chaînes et les motifs Gly-X-Y s'organisent pour construire une triple hélice selon un mode d'association en fermeture éclair (*zipper-like*) jusqu'à l'extrémité N-terminale, elle-même globulaire. A la sortie du réticulum endoplasmique, les triples hélices de procollagène I transitent par l'appareil de Golgi où elles sont concentrées dans des vésicules adressées à la membrane plasmique.

Les molécules de procollagènes sont solubles dans les vésicules de sécrétion. Leur relargage dans l'espace extracellulaire entraîne l'action des enzymes N et C propeptidases qui vont cliver spécifiquement les deux propeptides pour enfin former la molécule de collagène I native sous la forme d'une triple hélice de 300nm de long et de 1,5nm de diamètre portant à ses deux extrémités une courte structure non hélicoïdale nommée N et C télépeptides. La perte des propeptides diminue la solubilité des molécules d'un facteur 1000 (Wood et Keech, 1960) ce qui entraîne l'agrégation des molécules entre elles en un édifice supra moléculaire élaboré : la fibrille de collagène. La fibrille est stabilisée par des pontages covalents entre les résidus lysines et prolines hydroxylés des molécules qui la constitue.



Réticulum Endoplasmique

Synthèse des chaînes α polypeptidiques

hydroxylation des résidus Pro et Lys

-N et -O glycosylation des chaînes latérales des Lysines et Hydroxylysines

Trimérisation des chaînes α à l'extrémité C-terminale

Propagation de la triple hélice vers l'extrémité N-terminale suivant le modèle en fermeture éclair.

Appareil de Golgi

Adressage et sécrétion des trimères de procollagène dans l'espace extracellulaire

Espace extracellulaire

Clivage des N- et C- propeptides

Association des molécules de collagène en fibrilles

Figure 9 : Schéma de biosynthèse du collagène I.

Chacune des chaînes α de la molécule de collagène I est traduite de façon indépendante au niveau du RE. Au cours de leur synthèse certains résidus proline et lysine sont hydroxylés, des motifs osidiques sont greffés sur ces dernières. Dans la lumière du RE les trois chaînes α s'associent dans leur extrémité C-terminale pour former une super structure en triple hélice en direction de l'extrémité N-terminale selon un mode d'assemblage en fermeture éclair. Les trimères de procollagène ainsi formés transitent par le système golgien où il sont adressés vers l'espace extracellulaire dans des vésicules membranaires. A la suite de leur sécrétion, des enzymes spécifiques clivent les N et C propeptides ce qui entraîne une diminution importante de la solubilité des molécules qui s'agrègent en fibrilles de collagène qui sont stabilisées par des pontages covalents entre les résidus hydroxylés des molécules de collagène.

Figure adaptée de McLaughlin et Buleid, 1998 et de Canty et Kadler, 2005.

3. Organisation des molécules de collagène en fibrilles et fibrillogénèse *in vitro*

C'est sous sa forme fibrillaire que la molécule de collagène I réalise son rôle structural et mécanique dans la MEC. Les fibrilles de collagène représentent un assemblage multimoléculaire qui peut atteindre plusieurs micromètres de longs et 50 à 500 nanomètres de diamètre de selon le tissu considéré. Comme nous avons pu le voir précédemment (figure 7), seul certains collagènes s'associent en fibrilles, dont le collagène de type I. L'organisation des molécules de collagène au sein d'une fibrille a été déterminée par l'analyse de fibrilles reconstituées *in vitro* à partir de molécules de collagène purifiées ou par l'analyse de fibrilles extraites de tissus très majoritairement constitués de collagène de type I. Cependant les fibrilles *in vivo* sont le plus souvent hétérotypiques c'est-à-dire formées par l'association de plusieurs types de collagènes fibrillaires ce qui peut modifier l'organisation des molécules au sein de la fibrille par rapport au modèle proposé. Dans l'os, le collagène I forme des fibrilles hétérotypiques exclusivement avec le collagène de type V (Gelse *et al*, 2003).

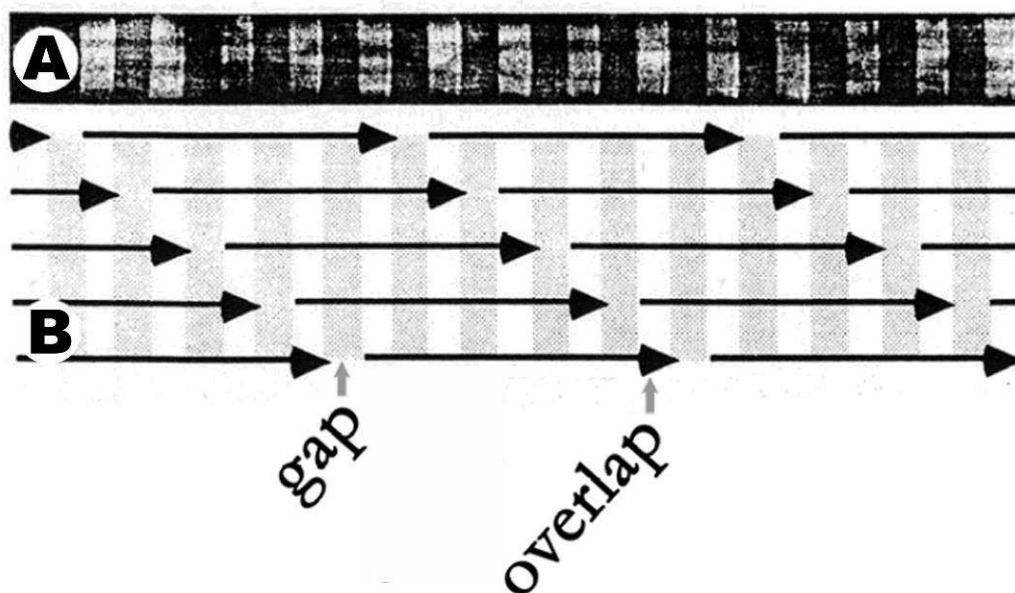


Figure 10 : Fibrille de collagène en coloration négative en MET et schéma d'organisation des molécules dans la fibrille.

(A) Fibrille de collagène en coloration négative observée en MET. La fibrille apparaît composée d'une succession de bandes sombres, riches en contrastant, et de bandes claires qui forment la période D de 67nm et lui donne un aspect strié caractéristique. **(B)** Modèle à deux dimensions de Hodge et Petruska de l'organisation des molécules de collagène au sein de la fibrille. En corrélation avec son aspect en MET, les bandes fortement marquées en colorant correspondent aux *gaps* de 47nm présent entre deux molécules successives dans l'axe longitudinal de la fibrille. Les zones claires, qui prennent moins le colorant, correspondent aux *overlaps* de 20nm entre deux molécules successives latéralement. Figure adaptée de Parry, 1988.

Observées en microscopie électronique à transmission en coloration négative, les fibrilles de collagène présentent une alternance de bandes claires et de bandes sombres, transversales à l'axe de la fibrille (figure 10). Ces bandes créent une périodicité axiale le long de la fibrille, définie comme la période D de 67nm. Si l'on rapporte la longueur d'une molécule de collagène (i.e. ~300nm) à la période D on obtient une valeur non entière de $4,47D$ ce qui indique que les molécules de collagène ne peuvent pas être disposées bout à bout suivant l'axe de la fibrille. Le model proposé par Hodge et Petruska en 1963, et globalement toujours en vigueur aujourd'hui, fait intervenir la présence de zones vides (*gap*) entre les molécules de collagène successives dans l'axe longitudinal de la fibrille. Latéralement, les molécules de collagène successives se recouvrent sur une distance de 20nm qui correspond au domaine N-terminal et au domaine C-terminal de la molécule adjacente.

Il résulte donc de ce model la présence de trous (*gap*) de 47nm de long qui vont retenir le contrastant utilisé pour l'observation en microscopie électronique et apparaître sombres, et des zones de recouvrement (*overlap*) de ~20nm de long qui du fait de leur encombrement seront plus faiblement contrastées par les sels d'atomes lourds et apparaîtront claires en microscopie électronique à transmission. La succession des *gaps* et *overlaps* forme la période D de ~67nm des fibrilles de collagène qui leur donne leur apparence striée caractéristique en MET.

A pH physiologique le domaine en triple hélice de la molécule de procollagène est faiblement chargé alors que les domaines globulaires N et C terminaux sont chargés négativement, notamment par la présence des résidus osidiques, ce qui rend les molécules de collagènes solubles. Le clivage des propeptides, lors de la sécrétion de la molécule dans l'espace extra cellulaire, entraîne une diminution drastique de sa solubilité et les molécules s'arrangent en fibrilles sous le contrôle des interactions électrostatiques et hydrophobes de leurs chaîne latérales.

Il est possible *in vitro* de dissocier les fibrilles de collagènes en modifiant l'état de charge des molécules. Ainsi, à pH acide les molécules sont fortement chargées positivement ce qui crée des interactions électrostatiques entre les molécules dans les fibrilles qui se dissocient et deviennent libres en solution (figure 11 A). La neutralisation du pH de la solution diminue l'état de charge des molécules, limitant ainsi leur répulsion, et elles vont de nouveau se réassocier en fibrilles natives (figure 11 B).

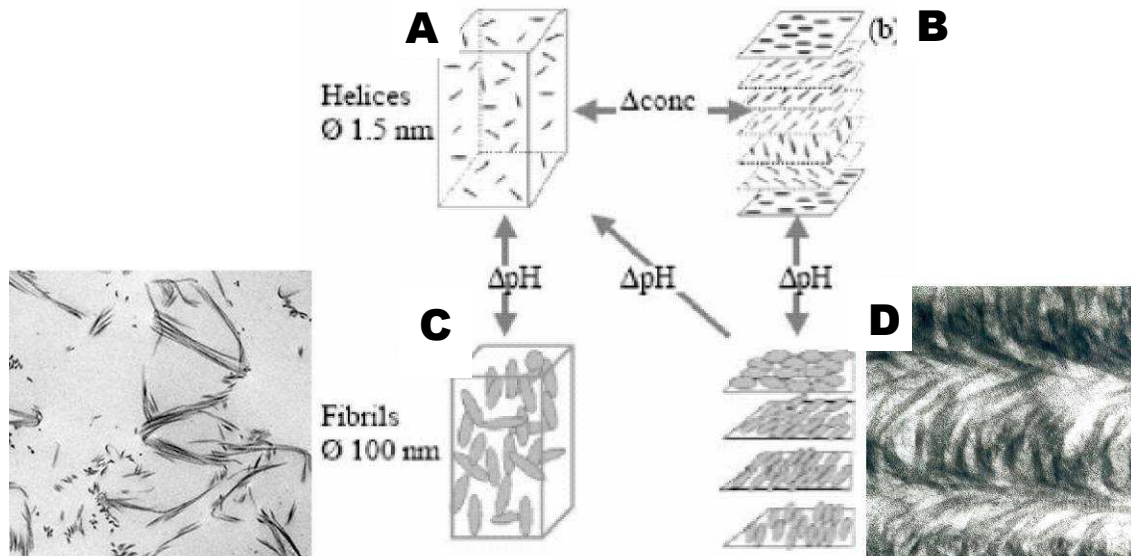


Figure 11 : Organisation des molécules de collagène en phases denses et fibrillogénèse *in vitro*.

(A) A pH acide les molécules de collagène sont chargées positivement et libres en solution. **(B)** Avec l'augmentation de leur concentration les molécules s'organisent en une phase cristalline liquide de type cholestérique. **(C)** Les molécules de collagène en solution acide peuvent être précipitées, par neutralisation du pH, sous la forme de fibrilles de collagène striées natives. Ainsi, on forme à partir d'une solution un gel fibrillaire de collagène. **(D)** Les phases cristallines liquides peuvent également être stabilisées en déclenchant l'association des molécules en fibrilles de collagène qui conservent l'organisation hélicoïdale des molécules en solution. Par ce procédé on obtient un gel de collagène dense et organisé comme le sont les fibrilles de collagène dans la matrice osseuse.

Figure adaptée de Eglin et al, 2005 et de Giraud-Guille et Besseau, 1998.

La triple hélice de collagène est une structure chirale et sa longueur (~300nm) lui donne une allure de bâtonnets semi-flexibles. Ces caractéristiques donnent aux molécules de collagène des propriétés d'autoassemblage en solution en fonction de leur concentration, ce qui les classe parmi les cristaux liquides de type lyotropes (à la différence des cristaux liquides de type thermotropes dont l'assemblage est modulé en fonction de la température). En concentrant les molécules en solution celles-ci s'organisent parallèlement entre elles selon des plans successifs. Entre chaque plan, l'orientation des molécules est modifiée d'un angle discret et constant. Cette organisation hélicoïdale des molécules en solution forme une phase cristalline liquide de type cholestérique (figure 11 C). Cette phase peut être stabilisée en neutralisant le pH de la solution ce qui entraîne l'association des molécules en fibrilles tout en conservant l'organisation cholestérique (figure 11 D). Des études récentes de diffusion des rayons X ont montré que la transition entre molécules en solution (acides) isotropes et molécules organisées en phase cholestérique était obtenue à partir d'une concentration en collagène de l'ordre de 60mg/mL (Gobeaux *et al*, 2007). Cependant on retrouve, en

ultrastructure, l'organisation cholestérique dans les solutions stabilisées par neutralisation du pH pour des concentrations supérieures à 100mg/mL (Gobeaux et al, 2008).

Ainsi, les propriétés d'organisation des molécules de collagène en fibrilles par neutralisation de pH permettent de former un matériau fibrillaire solide à partir d'une solution. De plus, les propriétés d'autoassemblage des molécules en solution en fonction de leur concentration permettent de structurer ce matériau selon des architectures microscopiques que l'on retrouve dans certains tissus conjonctifs dans la matrice osseuse.

III L'ingénierie tissulaire appliquée à l'os

Le médecin, et en particulier le chirurgien, a depuis toujours nécessité des outils et des concepts pour restaurer ou améliorer le fonctionnement de tissus et d'organes affectés par des malformations congénitales, des blessures, des maladies dégénératives et/ou liées à l'âge. Suivant le tissu ou l'organe à traiter, différentes stratégies ont été employées : la transplantation d'organes d'un individu à un autre ou d'origine animale (rein, foie, cœur, moelle...), l'utilisation de prothèses synthétiques (membres inférieurs et supérieurs, prothèses articulaires, dentaires...), l'introduction d'appareils externes ou internes qui augmentent ou supplantent la fonction de l'organe défectueux (appareils auditifs, dialyse extra corporelle, cœur artificiel...) (Sipe, 2002).

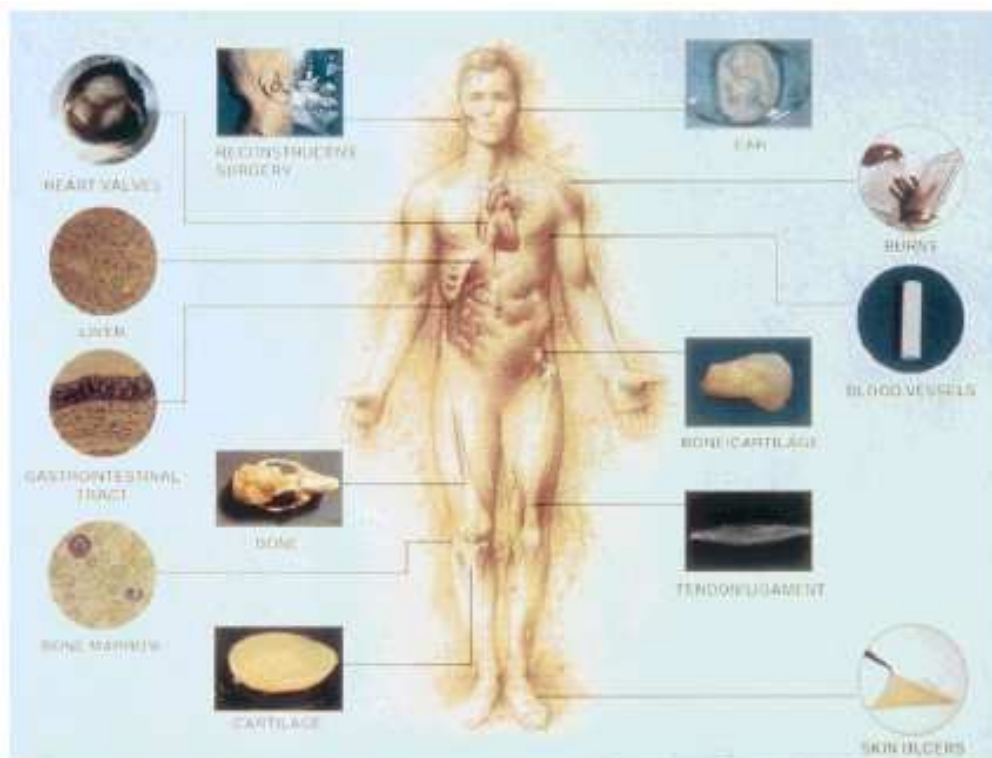


Figure 12: Organes et tissus reconstruits ou traités suivant les principes de l'ingénierie tissulaire. Reproduit de Bonassar et Vacanti, 1998

Les avancées de la biologie cellulaire des cinquante dernières années avec les découvertes des gènes et de leurs régulations, des effecteurs moléculaires clefs des différents types cellulaires, des cellules souches et de leur différenciation, associées aux techniques de culture *ex vivo*, d'analyse moléculaire et d'imagerie rendent possible la création *de novo* d'un organe prêt à être implanté chez le patient (Griffith et Naughton, 2002). Ce champ d'investigation de la médecine fait appel aux concepts de l'ingénierie et aux principes des

sciences du vivant. C'est sous le nom d'ingénierie tissulaire que les scientifiques des matériaux, de la biologie cellulaire et de la clinique se rejoignent dans le but de développer des substituts biologiquement actifs qui restaurent, maintiennent ou améliorent le fonctionnement des tissus (Chaikof *et al* ; 2002). Différents tissus, dont la reconstruction de peau pour les grands brûlés est le plus abouti, peuvent être reconstruits par l'utilisation de cellules combinées à des matériaux guidant leur croissance et de molécules chimiques favorisant leur fonctionnement (figure 12). Nous présentons ici l'état de l'art de l'ingénierie tissulaire osseuse en concentrant notre propos sur les attentes du point de vue du matériau.

1. Caractéristiques des matériaux de réparation osseuse

Le tissu osseux est perpétuellement renouvelé pendant toute la vie de l'individu et possède la capacité de se reconstituer après fracture. Pourtant, des malformations secondaires ou congénitales, la résection de tumeurs bénignes ou malignes, des infections, la non union des pièces osseuses fracturées représentent un nombre important de pathologies qui nécessitent une intervention chirurgicale pour permettre à l'os de recouvrir son intégrité (Bruder et Fox, 1999).

Desirable qualities of a bone tissue-engineering scaffold	
Available to surgeon on short notice	Promotes bone ingrowth
Absorbs in predictable manner in concert with bone growth	Does not induce soft tissue growth at bone/implant interface
Adaptable to irregular wound site, malleable	Average pore sizes approximately 200–400 μm
Maximal bone growth through osteoinduction and/or osteoconduction	No detrimental effects to surrounding tissue due to processing
Correct mechanical and physical properties for application	Sterilizable without loss of properties
Good bony apposition	Absorbable with biocompatible components

Figure 13 : Propriétés attendues des matériaux pour la reconstruction osseuse (Reproduit de Burg *et al*, 2008)

Face à ces cas cliniques, le chirurgien a besoin de solutions thérapeutiques, et notamment de substituts, pour assurer la continuité entre les parties saines de l'os, une fois les parties lésées éliminées. Ces substituts doivent répondre à des exigences structurales et fonctionnelles qui sont résumées dans la figure 13.

Au niveau fonctionnel, les matériaux doivent idéalement être (Logeart-Avramoglou *et al*, 2005) :

- ostéoconductifs, c'est-à-dire qu'ils fournissent un support sur lequel les cellules osseuses peuvent proliférer et exprimer leur phénotype.
- ostéoinductifs en favorisant la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques.
- ostéogéniques en possédant en leur sein des précurseurs ostéoblastiques pouvant se différencier en cellules osseuses matures.

Au niveau de leur structure, on attend idéalement des matériaux qu'ils possèdent (Cornell, 1998) :

- une forme et une taille qui permettent son intégration parfaite dans le défaut.
- des capacités mécaniques suffisantes pour supporter les contraintes de la fonction de l'os.
- une résorption progressive qui n'interfère pas avec le fonctionnement normal du tissu et dont les produits de dégradation ne sont ni immunogènes ni toxiques.
- un coût de production minimal et des quantités disponibles suffisantes.

Pour pouvoir répondre à ce cahier des charges la chimie de surface, la topographie, l'architecture tridimensionnelle et la porosité du matériau seront des paramètres cruciaux que l'élaborateur des matériaux s'efforcera de combiner au mieux à partir de la matière qui les constitue (Kneser *et al*, 2006).

La référence des matériaux de comblement osseux reste à ce jour la transplantation autologues d'explants osseux, amplifiés *in vitro* et réimplantés chez le patient. Ces explants proviennent généralement de la crête iliaque ou de la fibula. Ils sont ostéoconductifs, ostéoinductifs et ostéogéniques et, car ils proviennent directement du patient, ne sont pas immunogènes. Cependant, ces explants sont limités quant à leur quantité disponible et leur obtention nécessite une intervention chirurgicale sur un tissu sain, ce qui peut être délétère pour le patient (risques d'infection et de complications post-chirurgicale) (Rose et Oreffo, 2002). Une autre source de traitement est l'os déminéralisé de cadavre. Celui-ci possède également toutes les propriétés biologiques requises pour la reconstruction osseuse mais, à

nouveau, ses quantités disponibles sont limitées et il entraîne régulièrement de fortes réactions immunogènes et peut être vecteur d'agents infectieux.

De nouveaux substituts sous la forme de matériaux minéraux ou organiques, d'origine naturelle ou synthétique, sont développés pour pallier les déficiences de l'autogreffe et de l'hétérogreffe d'os.

2. Les matériaux inorganiques

Les matériaux inorganiques miment la matrice minérale de l'os formée par des cristaux d'hydroxyapatite (HA) de stoechiométrie théorique ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique et diffèrent entre eux par leur stoechiométrie et leur forme physique (particules, granules, blocs, coatings...) (figure 14). Ils représentent les matériaux de reconstruction osseuse les plus utilisés en clinique et existent déjà sous de nombreuses formes commerciales (LeGeros, 2002).

Matériaux de phosphate de calcium et noms commerciaux

Calcium phosphate ceramics, synthetic
 Calcium hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Calciite™, Durapatite™, Alveograf™, Osteograf™
 Beta-tricalcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Synthograf™, Augmen™
 Biphasic calcium phosphates, mixture of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate
Triosit™, MBCP™, Osteosynt™
 Calcium deficient apatite, unsintered
Osteogen™
 Calcium phosphates, from natural origin
 Freeze-dried or banked bones from cadavers
 Bovine bone derived
BioOss™, Endobone™, Trubone™, BonAp™
 Coral derived, coralline hydroxyapatite
Interpore™, Pro-Osteon™
 Calcium phosphate cements
BoneSource™, α-BSM™, Cementek

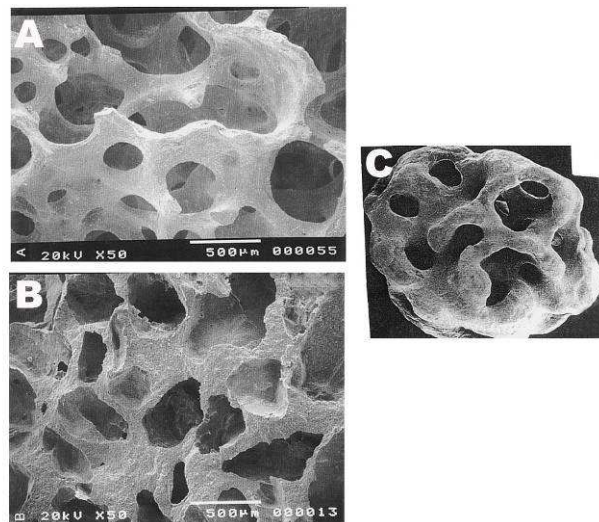


Figure 14 : Exemples de matériaux inorganiques utilisés en clinique pour la reconstruction osseuse. (A) os trabéculaire bovin. (B) Phosphate de calcium biphasique. (C) Corail. Reproduit de LeGeros, 2002.

Les matériaux inorganiques d'origine naturelle sont de l'hydroxyapatite qui provient de coraux (Porites) ou d'os bovin. Les coraux ont un exosquelette de carbonate de calcium (CaCO_3) qui est converti en HA par conversion hydrothermale. L'os bovin peut être, quant à lui, implanté avec ou sans sa matrice organique.

Les matériaux inorganiques synthétiques se présentent sous la forme de HA stœchiométrique, de HA substituée, de β -tricalcium phosphate (β -TCP de formule Ca_3PO_4 pouvant être converti en octacalcium) et de composites de HA et de β -TCP (phosphate de calcium biphasique).

Globalement ces matériaux sont poreux (figure 14 A-C) (même si les phosphates de calcium peuvent exister en des formes pleines), biocompatibles et ostéoinductifs. Cependant, suivant leur nature chimique et leur origine naturelle ou artificielle leurs propriétés mécaniques varient d'un matériau cassant (β -tricalcium phosphate) à un matériau qui se dégrade très lentement (HA synthétique) (Petite et al, 2000 ; Kamakura et al, 2006). Des études montrent la présence de matériaux à base de HA synthétique ou niveau du site d'implantation sept années après la reconstruction osseuse (Quarto et al, 2001 ; Marcacci et al, 2007 ; Cancedda et al, 2007). Bien que le traitement ait permis une reconstruction totale d'un défaut important (4cm) dans un os long (tibia), le maintien d'un matériau dont on ne connaît pas l'évolution de son comportement biologique et mécanique dans le temps reste problématique.

3. Les polymères synthétiques

La chimie de synthèse procure des polymères organiques extrêmement divers quant à leur longueur de chaînes, leur physicochimie et leurs capacités d'assemblages en architectures tridimensionnelles. Parmi l'ensemble des polymères étudiés comme substitut osseux les plus utilisés sont l'acide polyglycolique, l'acide polylactique ou les polycaprolactones (figure 15).

Synthetic Polymers

Poly (glycolic acid) (PGA), Poly (lactic acid) (PLA), Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly (ϵ -caprolactone) (PCL), poly (ethylene glycol) (PEG), poly (vinylalcohol) (PVA), poly (propylene fumarate) (PPF), poly(acrylic acid) (PAA), etc. *Peptide, DNA (artificially prepared natural polymers)

Figure 15 : Polymères synthétiques étudiés comme substituts osseux (reproduit de Lee et al, 2008).

En eux même les polymères synthétiques ne sont pas ostéoconductifs et permettent une adhésion cellulaire faible qui est en fait liée aux capacités des matériaux à lier les protéines circulantes. En revanche, par la maîtrise de leur chimie de surface des motifs d'adhésions (peptides RGD), des molécules ostéogéniques et angiogéniques (BMP, TGF, VEGF) ou des séquences de DNA codant pour ces facteurs peuvent être greffés à leur surface, de façon covalente ou par des liaisons faibles. Ainsi une réponse biologique peut être à la fois déclenchée et modulée dans le temps en fonction du type de greffage des molécules bioactives. Les polymères synthétiques ont également l'avantage de pouvoir être disponibles en quantité importante et à moindre coût (Giannoudis *et al*, 2005).

Leur origine synthétique limite très fortement la transmission d'agents pathogènes et facilite l'utilisation de procédés de stérilisation. Elle les rend également résistants à une grande gamme de procédés (compatibilité des solvants aqueux, organiques, résistance à la température...) qui permet d'obtenir des matériaux d'architecture complexe et contrôlée notamment grâce au développement de reconstruction assistée par ordinateur (figure 16). Parmi ces techniques directement issues de l'ingénierie des matériaux on peut citer le *Fused Deposition Modeling* (FDM) où le polymère est extrudé à partir d'une buse dont le diamètre est contrôlé et dont les mouvements dans le plan et en profondeur sont assistés par ordinateur afin de reconstruire un matériau par addition de couches successives (Hutmacher et Cool, 2007).

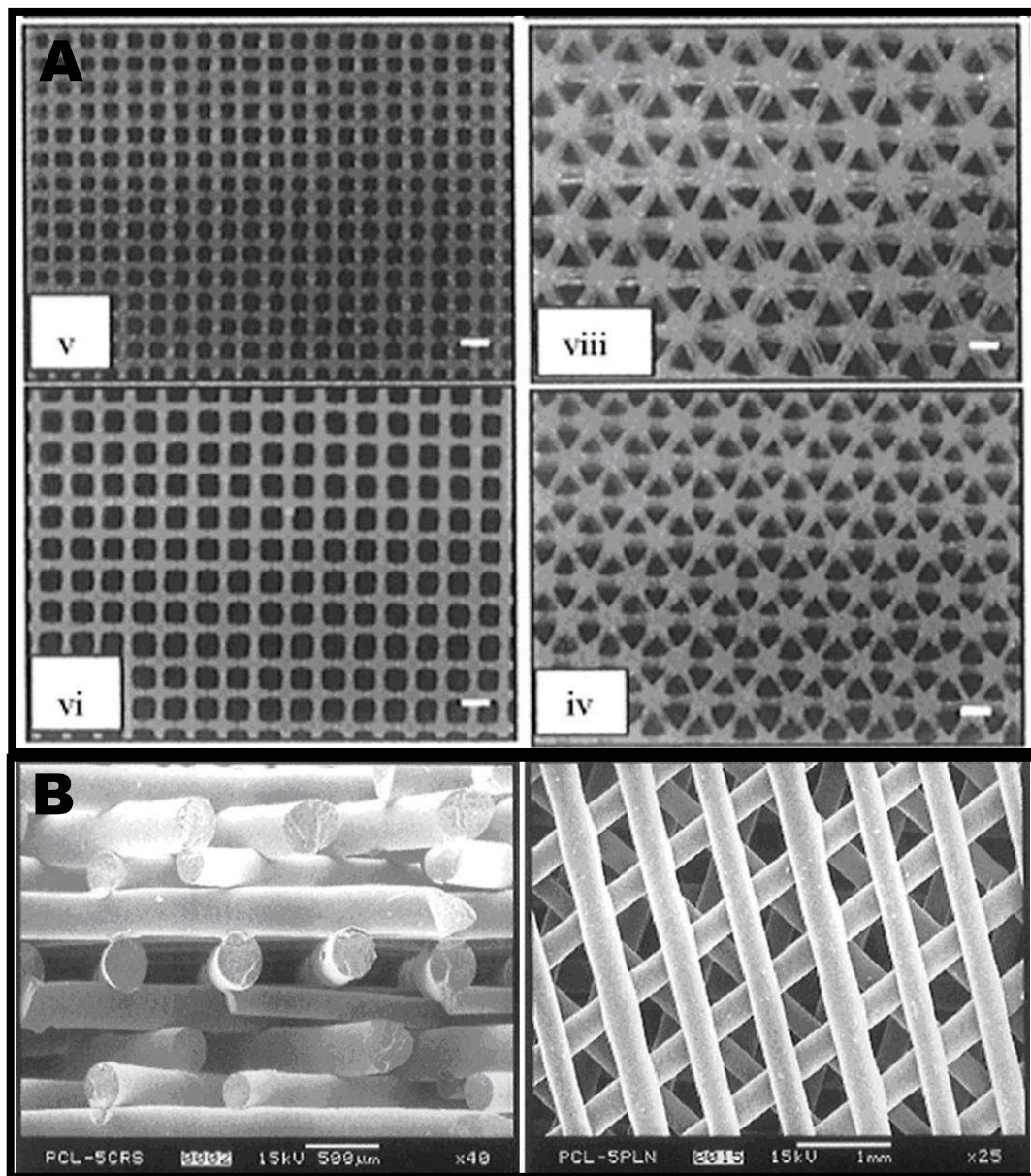


Figure 16: Diversité de structure pouvant être obtenue avec des polymères synthétiques.

(A) Assemblages 3D de fibres de caprolactones selon différentes géométries et porosités par technique de *Fused Deposition Modeling* (FDM). (B) Assemblage par FDM de fibres de caprolactones en une structure 3D en croisillons. Barres : 1mm. (Reproduit de Hutmacher, 2000)

Malgré la grande diversité des polymères synthétiques développés pour l'ingénierie de l'os peu d'entre eux ont été évalués *in vivo*, même chez le petit animal, du fait de leur manque de bioactivité intrinsèque (Logeart-Avramoglou *et al*, 2005). Les fonctions chimiques qui lient les monomères entre eux sont métabolisables par les enzymes de l'organisme ce qui rend ces matériaux très dégradables. Même si certains de ces polymères ont déjà été utilisés en clinique, notamment comme sutures résorbables, leurs produits de dégradation ne sont pas métabolisables par l'organisme et peuvent être toxiques à moyenne ou forte concentration (Griffith, 2002 ; Ciapetti *et al*, 2003).

4. Les polymères naturels

Les polymères naturels représentent *a priori* un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire car ils sont le substrat endogène sur lequel les cellules peuvent adhérer, proliférer et exprimer leur phénotype (Logeart-Avramoglou *et al*, 2005). Ils sont par nature biocompatibles, largement résorbables par l'organisme et possèdent des propriétés ostéoconduites. Les polymères biologiques utilisés pour l'ingénierie tissulaire sont majoritairement le collagène, la fibronectine et l'élastine pour les composés protéiques et le hyaluronane et le biglycane pour les composés de type glyco-amino-glycane. Ils sont utilisés seuls ou en combinaison les uns avec les autres ou avec des polymères synthétiques en fonction des propriétés que l'on souhaite augmenter (biocompatibilité, bioactivité, mécanique...) (Prestwich et Matthew, 2002 ; Ferdous et Grande-Allen, 2007).

Avantages et inconvénients de l'utilisation du collagène en ingénierie tissulaire

Advantages

Available in abundance and easily purified from living organisms (constitutes more than 30% of vertebrate tissues);
 Non-antigenic;
 Biodegradable and bioabsorbable;
 Non-toxic and biocompatible;
 Synergic with bioactive components;
 Biological plastic due to high tensile strength and minimal expressibility;
 Hemostatic — promotes blood coagulation;
 Formulated in a number of different forms;
 Biodegradability can be regulated by cross-linking;
 Easily modifiable to produce materials as desired by utilizing its functional groups;
 Compatible with synthetic polymers;

Disadvantages

High cost of pure type I collagen;
 Variability of isolated collagen (e.g. crosslink density, fiber size, trace impurities, etc.);
 Hydrophilicity which leads to swelling and more rapid release;
 Variability in enzymatic degradation rate as compared with hydrolytic degradation;
 Complex handling properties;
 Side effects, such as bovine spongiform encephalopathy (BSF) and mineralization

Figure 17 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du collagène pour l'ingénierie tissulaire. Dans la liste des avantages citons particulièrement les sources disponibles en grandes quantités, la biocompatibilité, la résorption et la très faible immunogénéicité. Un des inconvénients majeur à l'utilisation du collagène en clinique est son origine animale, et notamment bovine, qui le rend potentiellement vecteurs d'agents pathogènes. (Reproduit de Lee et al, 2001)

Le collagène de type I est une protéine ubiquitaire dans l'organisme et constitue 90% de la matrice organique de l'os. Elle est également très répandue dans le règne animal, les homologues de séquences entre espèces de mammifères sont fortes (Boot-Handford et Tuckwell, 2003) ce qui rend cette protéine faiblement immunogène notamment lorsque les télépeptides sont éliminés (Lynn *et al*, 2004). Les matériaux à base de collagène sont cependant très faiblement utilisés pour la reconstruction osseuse. Ils sont décrits comme ayant

des propriétés mécaniques faibles (Giannoudis *et al*, 2005) et, à ce titre, non compatibles avec les exigences du tissu osseux (figure 17).

Les matériaux à base de collagène pour la reconstruction tissulaire se présentent essentiellement sous la forme de solutions acido solubles lyophilisées connues par le nom d'éponges de collagène (Glowacki et Mizuno, 2007). Ces matériaux ont de très bons résultats pour la reconstruction de peau (derme et épiderme) chez les grands brûlés mais restent largement cantonnés aux rôles de compresses hémostatiques ou de transporteurs de molécules favorisant la réparation de défauts osseux de taille réduite (Geiger *et al*, 2003) ou comme adjuvant associé aux thérapies des défauts plus larges (i.e >1cm) (Kuklo *et al*, 2008). Le collagène est également formulé en hydrogels faiblement concentrés qui sont utilisés comme supports tridimensionnels pour la culture de cellules *in vitro* (Grinnell, 2003) mais comme avec les éponges, leurs faibles propriétés mécaniques limitent leur utilisation dans la reconstruction de l'os (Mizuno *et al*, 1998).

L'origine naturelle de ces polymères les rendent disponibles en grande quantité et à moindre coût. Cependant des réserves sont émises par les autorités sanitaires quant aux agents pathogènes qu'ils peuvent transporter (virus, prions...) et leur fragilité quant aux procédés de stérilisation (O'Grady et Bordon, 2003). Le développement de molécules biologiques fournies par le génie génétique pourrait limiter les risque d'infection mais augmente les coûts de production (Thoman *et al*, 2000).

MATERIELS ET METHODES

I Préparation et caractérisation des matériaux

Deux types de matériaux ont été préparés à partir de solutions acido solubles de collagène: des éponges lyophilisées et des matrices fibrillaires plus ou moins concentrées. Les molécules de collagène sont extraites d'un tissu animal (tendon), solubilisées à pH acide et purifiées par précipitation sélective. Les solutions obtenues sont analysées qualitativement et quantitativement pour être ajustées à une concentration stock (5mg/mL), qui sera la solution de collagène de base dans l'élaboration de l'ensemble des matériaux utilisés pour cette étude. La préparation des solutions et des matériaux s'est déroulée à 20°C, en poste de sécurité microbienne (PSM de type II) avec du matériel stérile. La préparation des solutions et des matériaux s'est déroulée à 20°C, en poste de sécurité microbienne (PSM de type II) avec du matériel stérile. Les matériaux préparés par la suite, que se soit pour une utilisation *in vitro* ou *in vivo*, n'ont pas subi de traitements de stérilisation spécifiques.

1. Obtention de solutions de Collagène de type I

a) Extraction du collagène de tendons de queues de rats

Les queues de rats nous ont été fournies à titre gracieux par le Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition (Université Paris VII). Les rats (mâles Wistar ; ~8 semaines) ont été sacrifiés après avoir subi un traitement blanc (contrôles négatifs) dans le cadre d'études liées à l'activité de ce laboratoire.

Les tendons sont prélevés des queues à l'aide de pinces et de ciseaux par désarticulation successive des vertèbres et traction des tendons qui glissent le long de la gaine cutanée de la queue. Ils sont ensuite lavés abondamment dans un grand volume de PBS à pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline : Na_2HPO_4 8,07mM ; NaH_2PO_4 1,47mM ; NaCl 137mM ; KCl 2,68mM). Placés dans un bain de NaCl 4M, la pression osmotique de la solution permet la lyse des cellules interstitielles. Après rinçage au PBS, les tendons sont solubilisés sous agitation pendant une nuit dans une solution d'acide acétique 0,5M (pH~3,5)

La solution est clarifiée des éléments non dissous par centrifugation (3000g, 15min) et les molécules de collagène sont précipitées par ajout de NaCl à une concentration finale de 0,7M. Les précipités sont séparés du surnageant par centrifugation (3000g, 15min) et solubilisés sous agitation pendant 24h dans une solution d'acide acétique 0,5M. Les sels et les protéines de petit poids moléculaire sont éliminés de la solution par dialyse à l'équilibre (membrane de dialyse cellulose, cut off : 3,5kDa) contre de l'acide acétique 0,5M. Les éventuels éléments insolubles résiduels sont éliminés par une dernière étape de centrifugation haute vitesse (41000g, 4h).

Les solutions obtenues sont dosées, apportées à une concentration finale en collagène de 5mg/mL et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

b) Détermination de la concentration en collagène I: dosage de l'hydroxyproline

Les solutions de protéines sont classiquement titrées par la technique colorimétrique de Bradford (Bradford MM, 1976). Le colorant (bleu de Coomassie) se fixe de façon non covalente aux chaînes latérales d'arginine et d'acides aminés hydrophobes ce qui entraîne un changement de son spectre d'absorption. Cette technique est sensible et spécifique des protéines mais peut entraîner des erreurs d'estimation si la proportion en acides aminés réactifs au colorant est différente entre la solution à titrer et la solution de la gamme étalon. Dans le cas du collagène le dosage de l'hydroxyproline donne des résultats plus spécifiques (Bergaman I and Loxley R, 1966). Cet acide aminé est présent en forte proportion dans la molécule de collagène (13% en masse) et n'est pas associée à un codon d'ARNt mais issu d'une modification post-traductionnelle de la proline lors du passage de la molécule de collagène dans le réticulum endoplasmique.

Trois aliquots des solutions de collagène à doser sont hydrolysés à 110°C pendant une nuit par une solution de HCl concentrée (6N) pour libérer les acides aminés. L'hydrolysate est séché sous vide (SpeedVac) et repris par 1mL d'eau déionisée. Les hydroxyprolines en solutions sont dosées par une réaction RedOx qui voit leur oxydation par la chloramine T et la formation d'un complexe chromogène par ajout de diméthylamino-4-benzaldéhyde (DMBA) à 60°C pendant 20min. L'absorbance de la solution est mesurée par spectrophotométrie à

$\lambda=557\text{nm}$. La quantité en hydroxyproline pour chacun des échantillons est déterminée à partir d'une gamme de concentration d'une solution étalon d'hydroxyproline.

A partir de la quantité en hydroxyproline (Q_{Hyp}) dans l'hydrolysate on revient aisément à la concentration en collagène des solutions (C_{coll}) par la relation :

$$C_{\text{coll}} = Q_{\text{Hyp}} * 7,7 / V_{\text{coll}}$$

Le facteur 7,7 représente l'inverse du pourcentage d'hydroxyproline par molécule de collagène (13%) ; le volume de collagène (V_{coll}) celui de l'aliquote hydrolysé.

Dans le cas de solutions de collagène concentrées qui sont difficiles à pipeter les aliquots à doser sont pesés à la balance de précision. La densité de ces solutions étant proche de 1 les volumes des aliquots sont assimilés à leur masse. Ainsi, les différentes solutions de collagène seront exprimées en milligrammes (mg) de collagène par millilitres (mL) de solution.

c) Analyse qualitative des solutions de collagène

L'intégrité des chaînes α de collagène et la présence d'éventuels contaminants dans la solution est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Cette technique classique de biochimie permet de séparer les constituants d'un mélange protéique en fonction de leurs masses moléculaires respectives. Les protéines sont dénaturées par le sodium dodécyl sulfate (SDS ; détergent anionique) et le β -mercaptoethanol (agent réducteur) et s'organisent ainsi en une structure tertiaire en pelotes statistiques chargées négativement. La migration induite par champ électrique emporte les protéines à travers un gel hydraté d'acrylamide/bis-acrylamide. La réticulation du gel, modulable suivant le taux acrylamide/bis-acrylamide, entraîne un retard de migration des protéines les plus volumineuses par rapport aux protéines les plus petites qui se jouent du maillage du gel. La dénaturation des protéines est donc essentielle dans ce procédé pour assurer une densité de charge identique entre elles et ainsi permettre leur séparation uniquement par leur encombrement stérique.

Dans les conditions utilisées, nous détectons sur des gels à 10% en acrylamide deux bandes de forte intensité à 100 et 95kDa identifiées comme les deux chaînes monomériques (α_1 I) et (α_2 I) de la molécule de collagène de type I (figure 18). La différence d'intensité entre les bandes des chaînes α_1 I et α_2 I reflète la stœchiométrie de la molécule de collagène ($[(\alpha_1$ I) $_2$ α_2 I]). Deux bandes de haut poids moléculaire de faible intensité sont visualisées sur le haut du gel. Nommées β_{11} et β_{12} , elles sont assimilées respectivement aux dimères des chaînes (α_1 I) $_2$ (200kDa) et (α_1 I α_2 I) (195kDa). L'absence de *smears* (traînées) indique que les chaînes α sont intègres et ne se sont pas hydrolysées en fragments de tailles variables au cours de la préparation. Deux bandes de très faible intensité sont observées au bas du gel et attribuées à l'élastine (66kDa) et l'albumine (55kDa). De tels contaminants sont classiques lors d'une extraction de protéines à partir de tissus conjonctifs d'origines animales mais restent très largement minoritaires dans la solution finale par rapport aux chaînes α du collagène I.

2. Elaboration des matériaux de collagène

a) Matrices fibrillaires de collagène

Trois types de matrices fibrillaires ont été préparées, chacune ayant une concentration spécifique en collagène, respectivement de 1mg/mL (matrices 1MG), 5mg/mL (matrices 5MG) et 40mg/mL (matrices 40MG). Les solutions à 1mg/mL sont préparées à partir des solutions stock à 5mg/mL diluées au cinquième dans l'acide acétique 0,5M. Les solutions à 40mg/mL sont obtenues à partir des mêmes solutions stock concentrées par évaporation du solvant sous une hotte à flux laminaire. Leur concentration est évaluée en première approximation par comparaison des masses des solutions avant et après évaporation du solvant. La concentration finale des solutions est déterminée par dosage de l'hydroxyproline, une variation de ~10% par rapport à la concentration cible a été observée (concentration finale des matrices 40MG: 36 - 44mg/mL).

Chacune des matrices 1MG, 5MG et 40MG est préparée suivant le même mode opératoire. Un volume de 0,5mL de collagène de concentration spécifique est coulé dans un moule de polypropylène cylindrique de 16mm de diamètre (plaque 24-puits). Pour obtenir des matrices uniformes et exemptes de défauts (notamment des bulles d'air) les solutions sont laissées une nuit à homogénéiser hermétiquement à 20°C. La concentration des molécules de

collagène rend les solutions visqueuses, et les solutions à 40mg/mL ont plus la consistance d'un gel mou que d'une solution fluide. De ce fait, ces solutions sont difficilement manipulables par une pipette, et c'est une masse de 0,5g (assimilée à un volume de 0,5mL) qui est introduite dans les moules à l'aide d'une spatule. De comportement rhéologique visqueux, les solutions concentrées se déploient lentement dans le moule. Leur étalement est facilité par une pression mécanique légère et continue d'un cylindre à fond plat du diamètre du moule et tapissé de téflon.

Les moules sont ensuite placés pendant 20h à 20°C sous une cloche en verre hermétiquement fermée et contenant une solution d'ammoniaque concentrée (~30%). L'ammoniaque est une molécule volatile dans ces conditions de température et de pression, un équilibre d'échange gaz/liquide va s'établir entre les vapeurs dans l'enceinte et la solution de collagène et entraîner une augmentation progressive du pH des solutions de collagène. La remontée du pH jusqu'à la neutralité induit l'agrégation ordonnée des molécules, libres en solution, en fibrilles de collagène, insolubles. Par cette étape de fibrillogénèse, qui s'apparente à un procédé sol/gel, un matériau solide est élaboré à partir d'un précurseur liquide. La remontée de pH par diffusion de vapeurs d'ammoniaque permet la neutralisation du pH des solutions de collagène sans les diluer. Ainsi nous obtenons *in fine* un matériau solide qui possède les mêmes caractéristiques de volume, et donc de concentration, que les solutions de collagène initialement introduites dans les moules.

Les matrices de collagène sont finalement rincées abondamment par du PBS pendant ~3 jours pour éliminer les résidus d'ammoniaque et conservées à 20°C dans du PBS jusqu'à leur utilisation.

b) Eponges de collagène

Les éponges de collagène constituent un ensemble de matériaux qui ont la caractéristique commune d'avoir été obtenus par lyophilisation. Elles représentent la grande majorité des matériaux de collagène utilisés en clinique ou en laboratoire à partir de tissus ou de solutions purifiées de collagène qui peuvent être supplémentées par d'autres molécules de la MEC ou des polymères synthétiques (Lee *et al*, 2001). Nous avons préparés des éponges de collagène pour les comparer aux matrices fibrillaires, en terme de structure et du comportement d'ostéoblastes en culture *in vitro*.

Pour notre étude, les éponges de collagène ont été préparées selon le mode opératoire suivant. Un volume de 1mL de collagène à 5mg/mL a été coulé dans les mêmes moules qu'utilisés pour les matrices fibrillaires puis congelé à -80°C pendant 4h. Les solutions sont ensuite placées dans l'enceinte d'un lyophilisateur (Alpha-2-4 LD, Martin Christ), et déshydratées pendant une nuit sous vide à -80°C par sublimation du solvant. Après cette étape, on obtient un matériau solide et sec qui conserve les caractéristiques de forme et de volume initiales des solutions dans le moule. Les éponges sèches sont conservées dans leur moule de façon hermétique à 20°C.

Leur utilisation avec du matériel biologique (donc en milieu aqueux) nécessite une étape de réhydratation. Pour que les conditions salines soient équivalentes à celles des matrices fibrillaires, les éponges sont réhydratées par une solution de PBS. Cette étape est délicate : les éponges se collapsent lors du contact avec la solution tampon et ont tendance à se replier sur elles-mêmes. Afin de conserver une surface la plus large possible, et équivalente à celle des matrices fibrillaires, les éponges sont d'abord décollées des parois du moule à l'aide d'un scalpel. Un volume de ~2mL de PBS est introduit dans le moule avec une pipette, la pointe en contact avec la paroi réalise le tour du moule pendant l'ajout du volume afin que les bords de l'éponge soit les premiers, et de façon plus ou moins simultanée, en contact avec la solution tampon.

II Techniques de Microscopie

Le terme microscope (du grec *micros* « petit » et *skopein* « examiner ») désigne toute une gamme d'instruments permettant d'obtenir une image agrandie d'un objet. Bien que la notion d'image soit étroitement associée à l'œil, elle n'est pas exclusive à la lumière mais peut être obtenue à partir de tout rayonnement ondulatoire. Ainsi la microscopie est une science de l'image qui couvre l'ensemble du spectre des ondes électromagnétiques.

Plus que le grandissement maximal qu'il peut fournir, le paramètre essentiel d'un microscope est son pouvoir séparateur, soit sa capacité à identifier deux points consécutifs dans l'échantillon. Ce paramètre est directement lié à la longueur d'onde λ du rayonnement, plus celle-ci est petite plus la résolution du microscope sera grande. Les qualités optiques du microscope sont également un facteur déterminant pour l'obtention d'un pouvoir séparateur élevé.

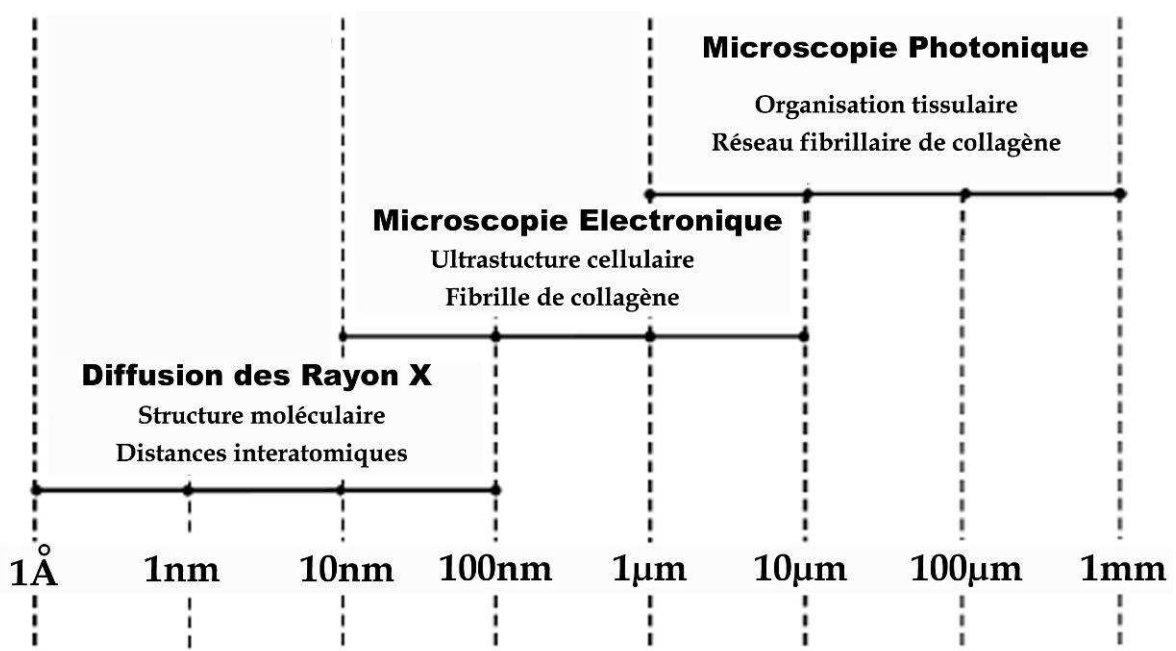


Figure 19: Echelles métriques accessibles avec les différents rayonnements électromagnétiques utilisés en microscopie.

Ci-dessus sont présentés les ordres de grandeur des résolutions couramment obtenues en fonction de l'onde électromagnétique utilisée. La microscopie optique, plus justement nommée photonique, avec une limite de résolution de l'ordre du micron est parfaitement adaptée à la description des tissus (échelle du millimètre) et de leurs composants cellulaires (échelle du micron). Les organites intracellulaires, les éléments du cytosquelette et les

complexes multimoléculaires sont, eux, observables avec la microscopie électronique (résolution nanométrique). Les microscopes qui utilisent le rayonnement X sont en cours de développement et proposent à ce jour une résolution de $\sim 100\text{nm}$. Leur essor sera très certainement bénéfique pour la biologie car cette microscopie permet l'étude d'organismes en vie (i.e. non fixés). Le rayonnement X est cependant utilisé dans l'étude structurale du vivant mais par des techniques de diffraction de la matière.

Pour cette étude nous avons utilisé les techniques de microscopie photonique en lumière blanche transmise, à lumière polarisée, de fluorescence, de fluorescence à deux photons et de microscopie électronique à transmission et à balayage. Nous avons ainsi obtenu des images spécifiques et complémentaires de nos échantillons sur une échelle du millimètre au nanomètre. Chacune des microscopies mise en œuvre repose sur un principe particulier et requiert un appareillage et une préparation spécifique des échantillons qui sont exposés ici.

1. Microscopie photonique en transmission et à lumière polarisée

a) Principes de la microscopie photonique

Le microscope photonique (optique) fournit une image agrandie du spécimen observé par un jeu de lentilles qui dévient et concentrent la lumière blanche qui le traverse (figure 20). On distingue trois organes essentiels du microscope : la source lumineuse, le condenseur et l'objectif. La source lumineuse doit être puissante, homogène (i.e. blanche) et associée à un diaphragme de champ qui limite l'éclairage de la préparation au champ observé en fonction de l'objectif. Le condenseur est constitué d'un ensemble de lentilles situées entre la source lumineuse et l'échantillon. Son rôle est de projeter dans le plan de la préparation l'image de la source lumineuse figurée par le diaphragme de champ, ce qui améliore la qualité de l'illumination.

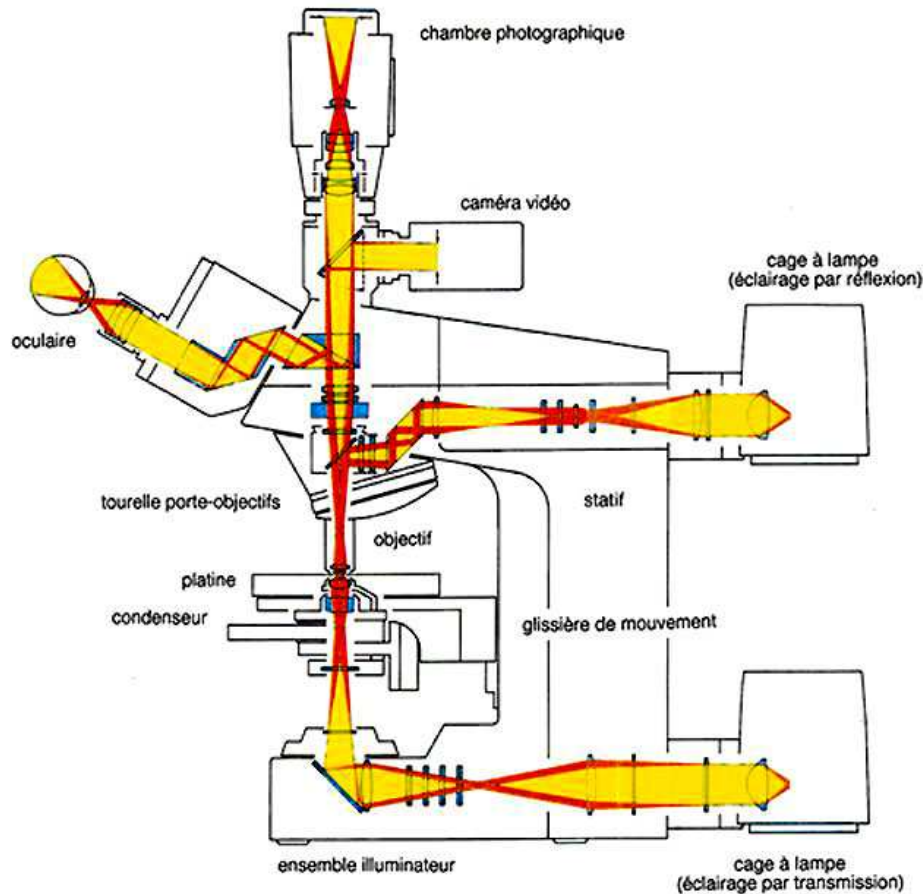


Figure 20: Schéma en coupe d'un microscope photonique

Le trajet de la lumière à travers les différents éléments du microscope est représenté en transmission et en réflexion. Par un jeu de miroirs, l'échantillon peut être observé à travers les oculaires ou son image enregistrée sur une caméra vidéo ou un film argentique.

Le condenseur est très souvent muni d'une lentille amovible qui permet de concentrer plus fortement la lumière sur l'échantillon et d'obtenir un regain d'illumination nécessaire pour les forts grossissements. A la suite de l'échantillon, se trouvent les lentilles objectives qui sont l'organe de formation et d'agrandissement de l'image. Les capacités de grossissement et de résolution sont directement liées aux qualités optiques des lentilles qui doivent limiter les aberrations sphériques (l'image d'un point donnant une tache) et les aberrations chromatiques (éclatement du spectre de lumière blanche). L'image fournie par les lentilles est finalement visualisée directement par l'expérimentateur à travers des lentilles oculaires qui rajoutent un facteur de grossissement, ou sur un écran de télévision par le biais d'une caméra vidéo.

b) Principes de la microscopie à lumière polarisée

La microscopie à lumière polarisée est plus confidentielle dans le milieu de la biologie. Elle utilise le microscope photonique classique supplémenté de filtres polarisants. Cette microscopie met en jeu les propriétés de la lumière dite « polarisée » et donne des informations sur l'organisation de la matière, de ce fait très utilisée par les minéralogistes et les chimistes (cristallographie).

Classiquement la lumière se propage à la même vitesse dans toutes les directions de l'espace à la vitesse $v = c / n$; où (c) représente la vitesse de la lumière dans le vide et (n) l'indice de réfraction du milieu traversé. Les corps où la lumière se propage à la même vitesse quelque soit sa direction sont nommés isotropes ou monoréfringents.

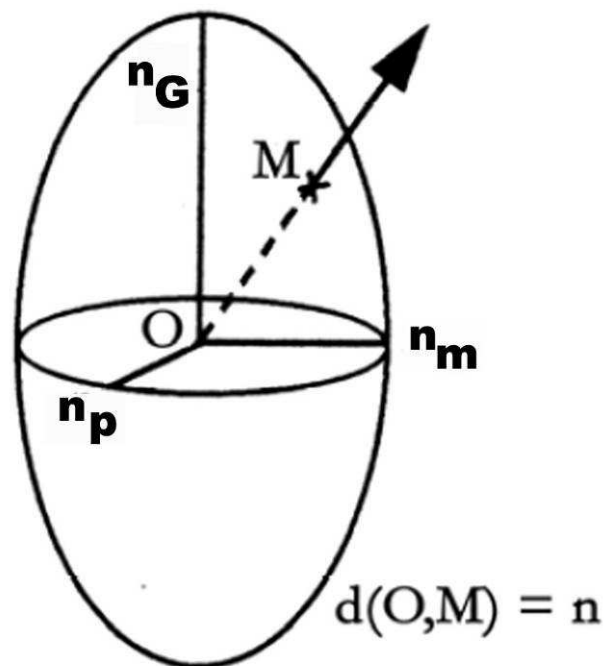


Figure 21 : Ellipsoïde des indices dans un milieu anisotrope (adapté de Bertrand et Roubaud, 1969)

L'ellipsoïde des indices schématise l'ensemble des indices de réfraction n que rencontrera un rayon lumineux qui pénètre dans un corps anisotrope en un point O suivant la direction (OM)

Certains corps, du fait de leur organisation, sont anisotropes à la lumière : la vitesse du rayon lumineux qui les traverse dépend de la direction prise par le rayon à travers le milieu. Ils ne sont donc plus caractérisés par un indice de réfraction unique mais par une multiplicité

d'indices en fonction du trajet de la lumière. Un tel corps peut être représenté schématiquement par un ellipsoïde où, en un point O quelconque du corps anisotrope, on définit l'ellipsoïde des indices comme l'ensemble de points M de sa surface où la distance OM est égale à n , indice de réfraction du milieu suivant la direction de propagation (OM) (figure 21).

L'ellipsoïde des indices est modelé par trois axes : n_G , direction du plus grand indice de réfraction ; n_p , définissant le plus petit indice ; n_m correspondant à un indice moyen (sans être la moyenne arithmétique de n_G et n_p). Les milieux anisotropes sont également nommés biréfringents car un rayon lumineux qui les traverse se décompose en deux rayons réfractés (contre un seul dans le cas d'un corps isotrope) d'égale intensité mais de directions différentes. De plus, les rayons réfractés sont polarisés à angle droit suivant la direction n_G et n_p . Si un tel rayon polarisé traverse de nouveau un corps anisotrope il se décomposera en deux rayons diffractés suivant les directions n_G et n_p mais cette fois-ci d'intensité différente pouvant aller jusqu'à l'extinction si le rayon incident est parallèle à n_G ou n_p .

Le microscope à lumière polarisée repose sur ce principe de polarisation et d'extinction de la lumière par des milieux anisotropes. Ce microscope possède deux prismes polarisants orientés à 90° l'un par rapport à l'autre. Le premier, nommé polariseur, est placé entre la source lumineuse et l'échantillon. Le second prisme, nommé analyseur, est placé à la suite de l'échantillon, en amont des oculaires (ou de façon plus générale, avant le système de prise de vue). Il résulte de ce montage, en l'absence d'échantillon ou en présence d'un échantillon isotrope, une extinction totale de la lumière transmise. En effet, le faisceau lumineux est polarisé par son passage à travers le polariseur. Sa polarisation n'est pas modifiée par son passage à travers l'échantillon isotrope ce qui va entraîner l'extinction de l'intensité lumineuse à la rencontre de l'analyseur dont le prisme est orienté à 90° du plan de polarisation du faisceau.

L'introduction d'un corps anisotrope entre les deux prismes va entraîner une nouvelle polarisation du faisceau lumineux incident qui rétablira la lumière après son interaction avec le filtre analyseur avec une intensité I' tel que :

$$I' = I \sin^2(2\alpha) \cdot \sin^2(\pi\delta/\lambda)$$

- où :
- I est l'intensité du faisceau lumineux à la sortie du polariseur
 - α est l'angle formé entre le polariseur et l'axe n_G de l'ellipsoïde des indices de l'échantillon
 - δ représente le retard de la composante de la vibration sur le polariseur par rapport à la composante de la vibration sur l'analyseur
 - λ la longueur d'onde du faisceau

Le retard δ est fonction du corps anisotrope observé (en particulier de son épaisseur), donc pour un même échantillon la composante $\sin^2(\pi\delta/\lambda)$ est une constante. L'intensité I' en sortie de l'analyseur sera donc fonction de l'angle α et prendra une valeur :

- maximale pour les valeurs de α tel que : $\sin^2(2\alpha) = 1$ soit $\alpha = \pi/4 (\pm \pi/2)$
- minimale et nulle pour les valeurs de α tel que : $\sin^2(2\alpha) = 0$ soit $\alpha = 0 (\pm \pi/2)$

Dans le cas des fibrilles (et des molécules) de collagène, l'axe n_G de l'ellipsoïde des indices de réfraction est parallèle à la direction longitudinale des fibrilles. Par rotation de l'échantillon sur la platine du microscope, l'alternance d'extinction et de récupération de la lumière permettra une description de l'orientation des fibrilles dans l'échantillon.

c) Préparation des échantillons

De façon évidente, pour obtenir une image en microscopie en transmission les échantillons doivent laisser passer la lumière. Dans le cas de tissus animaux, ou dans notre cas de matériaux épaisensemencés de cellules, ceux-ci doivent être débités en lames minces de quelques microns d'épaisseur (technique de microtomie). Les échantillons sont tout d'abord fixés pour figer le système et le conserver en l'état. Diverses techniques de fixations existent,

notamment par des agents chimiques (ethanol, paraformaldéhyde...) ou par le froid (cryofixation à l'azote liquide...). Ils doivent ensuite être imprégnés puis inclus par une substance capable de les durcir afin qu'ils puissent être découpés de la façon la plus nette et fine possible, sans déformer ni sa structure ni perturber son organisation. L'inclusion se fait le plus souvent par des résines de polymères qui ne sont pas miscibles dans l'eau. L'eau étant le solvant du vivant, les échantillons doivent donc subir une étape délicate de déshydratation où l'eau qui les compose est progressivement éliminée pour être finalement remplacée par la résine d'inclusion.

En fonction de l'origine de nos échantillons (matrices et éponges de collagène en culture *in vitro* ou explants de calvaria) des techniques de microtomie spécifiques ont été employées et sont détaillées dans les chapitres correspondants.

Les coupes de tissus sont en générales claires et sans contraste. Une étape de coloration est donc nécessaire pour visualiser et différencier les éléments cellulaires et moléculaires. Il existe un très grand nombre de colorations histologiques qui utilisent un à trois colorants différents en fonction du tissu observé et des cellules et molécules que l'on veut révéler. Le principe des colorations histo-chimiques repose sur les interactions chimiques (hydrophobicité, acidophilie, basophilie...) entre colorants et molécules du tissu. Un autre procédé de coloration (coloration histo-enzymologique) révèle la présence spécifique de protéines par le biais de leur activité enzymatique. Pour notre étude nous avons utilisé les colorations présentées ci-après, suivant les recommandations de Martoja et Martoja-Pierson (1967):

- Hémalun de Masson : donne une teinte bleue violacée aux noyaux et membranes plasmiques des cellules.

- Picosirius : colorant spécifique du collagène lui conférant une teinte rouge vive. Le colorant se fixe le long des molécules de collagènes organisées en fibrilles ce qui augmente le signal de biréfringence.

- Trichrome de Prenant selon la variante de Gabe : combinaison d'une coloration à l'hémalun de Masson suivit d'une coloration par une solution alcoolique d'éosine-vert lumière. Cette coloration donne une teinte verte au collagène et un contraste bleu violet aux membranes et noyaux cellulaires.

- Coloration de von Kossa : cette technique révèle les ions calcium précipités sous la forme de phosphate, carbonates et oxalates de calcium. Par une solution aqueuse de nitrate d'argent les ions calcium sont solubilisés et substitués par des ions argent. Les sels d'argents ainsi créés sont révélés par un révélateur photographique sous la forme de précipités noirs.

- Bleu de toluidine : forte coloration bleue des noyaux et membranes cellulaires. Les matrices extra cellulaires prennent également le colorant avec une intensité proportionnelle à leur densité.

- Détection de l'activité phosphatase alcaline : un substrat de naphtylphosphate est clivé en naphtol par l'activité phosphatase de l'enzyme. Le produit de la réaction est révélé sous la forme d'un précipité bleu complexé à des sels de diazonium (*blue RR*).

Les observations en microscopie photonique en lumière blanche et en lumière polarisée ont été effectuées sur un microscope Nikon E600 POL.

2. Microscopie de fluorescence et à deux photons

a) Principes de la microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est devenue une technique très exploitée en biologie. Elle utilise un faisceau de lumière monochromatique pour exciter un fluorophore qui émet un photon d'une longueur d'onde plus grande, donc d'une couleur différente. Le couplage covalent d'anticorps ou de molécules interagissant spécifiquement avec des molécules biologiques (exemple de la phalloïdine) à des molécules fluorescentes (Alexa 488, couleur verte ; rhodamine, couleur rouge...) ou les protéines de fusion avec des protéines fluorescentes (green/yellow fluorescent protein) ont permis, par l'utilisation de la microscopie à fluorescence, de visualiser spécifiquement une molécule d'intérêt au sein des tissus et des cellules.

Les microscopes à fluorescence diffèrent peu des microscopes photoniques classiques. Ils possèdent des filtres pour obtenir la longueur d'onde d'excitation adéquate. De plus, le signal n'est plus obtenu en transmission mais en réflexion, ce qui nécessite des lentilles objectifs

spécifiques capables de focaliser le faisceau d'excitation sur l'échantillon puis de récupérer et d'agrandir le faisceau fluorescent émis par l'échantillon (figure 20).

b) Le système ApoTome

L'opticien Carl Zeiss a développé pour ses microscopes à fluorescence un système qui permet d'enregistrer uniquement les éléments focalisés d'une image. Un tel système peut s'avérer extrêmement utile lorsque l'échantillon possède une certaine épaisseur, et permet de réduire fortement le bruit de fond de l'image lié aux éléments hors du focus ou à l'autofluorescence de l'échantillon. Le système ApoTome fonctionne sur le principe de l'illumination structurée qui repose sur les phénomènes d'interférence de la lumière (Roos et Brady, 1982 ; Bauch et Schaffer, 2006). Une grille d'interférence est placée sur le trajet optique de la source d'excitation de fluorescence, dans le plan focal image du diaphragme de champ, et l'image de cette grille est projetée sur l'échantillon. Trois images de l'échantillon sont prises avec trois orientations différentes de la grille d'interférence et assemblées par traitement numérique. Par sa position au plan focal image du diaphragme, l'image projetée de la grille apparaît visible sur l'échantillon uniquement au niveau des zones focalisées. Le changement d'orientation de la grille d'un angle par rapport à l'horizontal la déplace en avant et en arrière du focus de l'image (d'où les trois images acquises). A partir de ces trois plans le logiciel reconnaît les zones focalisées et défocalisées, et élimine ces dernières.

Bien que ce procédé soit très performant pour extraire les plans focaux d'une image, notre expérience nous permet d'émettre certaines réserves quant à son utilisation pour des échantillons épais (i.e. $>1-0,5\text{mm}$). Une des limites majeures à son utilisation est que ce système ne fonctionne que si la grille d'interférence est extrêmement bien focalisée sur l'échantillon. Dans le cas de nos préparations, il a été bien souvent difficile de visualiser la grille projetée sur le plan focal ce qui entraînait, lors de la prise de vue, des images mal reconstruites où la grille d'interférence était visible sur l'échantillon.

c) Principes de la microscopie de fluorescence excitée à deux photons:

La microscopie de fluorescence à deux photons repose également sur la capacité des fluorophores à absorber l'énergie du rayon incident puis de réémettre une partie de cette énergie sous la forme d'un photon de plus faible énergie (λ plus grande). En revanche, elle se distingue de la précédente par son mode d'excitation non linéaire, où se sont deux photons et non un seul qui sont absorbés simultanément par la molécule à détecter. Cette technique nécessite un appareillage particulier présenté à la figure 22 A. En effet, un tel phénomène est possible si l'échantillon est excité par un champ laser suffisamment intense. Le fluorophore est excité par absorption simultanée de deux photons peu énergétiques (de grande λ) fournis par un laser délivrant des impulsions extrêmement brèves (100 femto secondes) dans le proche infrarouge (700 – 1200 nm) plutôt que par l'absorption d'un photon unique fourni par un laser émettant dans le visible.

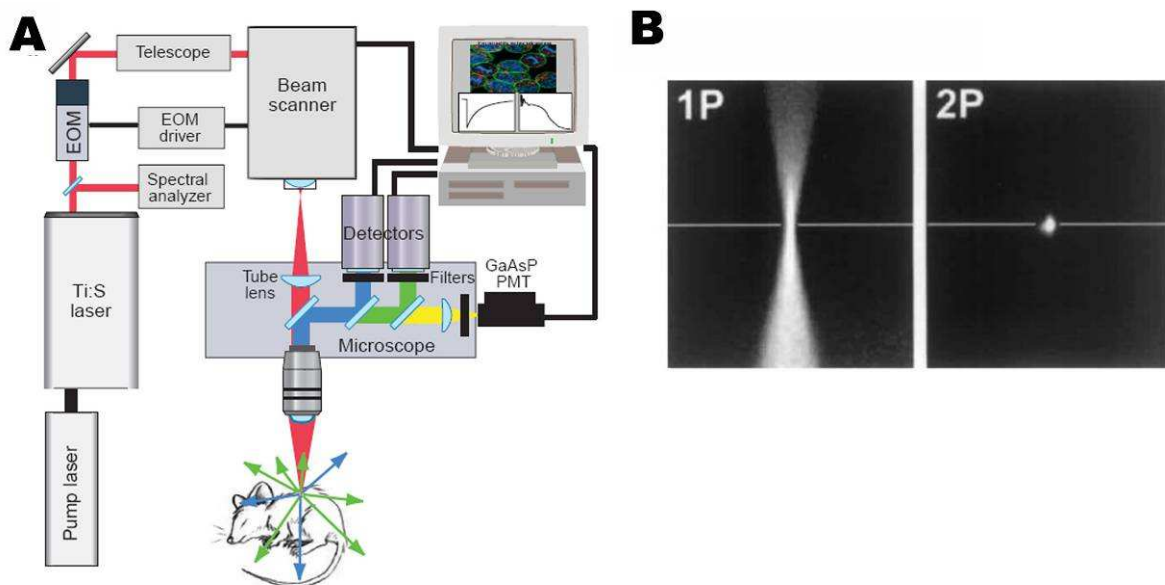


Figure 22 : Schéma et principe de fonctionnement du microscope à deux photons. (Reproduit de Rubart, 2004)

(A) L'échantillon est balayé par un faisceau laser pulsé et le signal de fluorescence est recueilli par la lentille objectif et dirigé vers les capteurs CCD qui donnent une image sur un écran. (B) Comparaison de la diffusion en profondeur de l'émission de la fluorescéine excitée par un (1P) et deux (2P) photons.

La substitution d'une excitation en régime continu par un train d'impulsions intense mais brèves permet d'appliquer une intensité lumineuse élevée tout en limitant l'énergie incidente sur l'échantillon, ce qui limite fortement la dégradation de l'échantillon et du

fluorophore (phénomène de *quenching*). Le phénomène d'adsorption multiple simultané ne se produit qu'au voisinage du plan focal de l'objectif, là où l'intensité lumineuse est suffisante.

Ainsi, ce mode d'excitation permet d'obtenir un volume d'excitation de faible profondeur (figure 22 B ; 2P) et de limiter la diffusion du point focal par le tissu environnant comme habituellement observé avec une excitation monophotonique classique (microscopie plein champ ou confocal) (figure 22 B ; 1P).

Suivant la lentille objectif utilisée, la technique de microscopie de fluorescence à 2 photons permet une résolution tridimensionnelle de l'ordre de $2*0,5*0,5 \mu\text{m}$ (Débarre *et al*, 2006). Associée à une motorisation de la platine porte objet, cette technique est très adaptée pour imager à l'échelle subcellulaire des tissus dans leur volume. D'autres phénomènes d'optique non linéaire sont également exploitables en plus du phénomène de fluorescence (génération de seconde et troisième harmonique) qui permettent l'imagerie de structures tissulaires et cellulaires organisées tels les tissus riches en fibres de collagène ou les membranes lipidiques.

d) Préparation des échantillons

La technique de microscopie de fluorescence (à un ou plusieurs photons) nécessite la présence de molécules capables d'absorber l'énergie du faisceau lumineux et de réémettre des photons. En l'absence de fluorescence endogène de l'échantillon étudié ou pour la détection de molécules spécifiques il est donc nécessaire d'introduire un fluorophore dans l'échantillon. Il existe un grand nombre de fluorophores commerciaux qui diffèrent entre eux par leur spectre d'absorption, d'émission et par leur affinité pour les différents constituants tissulaires ou cellulaires.

Pour notre étude nous avons utilisé la phalloïdine, qui se lie spécifiquement aux fibres du cytosquelette d'actine, couplée au fluorophore Alexa-488 qui réémet des photons de couleur verte. Les noyaux des cellules ont été identifiés par marquage au DAPI qui est un agent intercalant de l'ADN et qui émet dans le bleu. Le protocole expérimental est détaillé au chapitre correspondant.

Les observations de microscopie de fluorescence linéaire ont été réalisées sur un microscope fluorescent Zeiss AxioImager.

3. Microscopie électronique à transmission

a) Principes

La microscopie électronique à transmission est strictement identique sur le principe à la microscopie optique. Un faisceau de « lumière » est concentré sur l'échantillon, interagit avec lui et le faisceau lumineux transmis est dévié par un jeu de lentilles pour former une image agrandie de l'échantillon.

La différence réside dans la source lumineuse : un faisceau d'électrons remplace le faisceau de photons. On constate ainsi qu'il est plus justifié de parler de microscopie photonique que de microscopie optique pour la distinguer de la microscopie électronique. La figure 23 présente le schéma d'un microscope électronique à transmission. Les électrons sont émis au niveau du canon par chauffage de la cathode et accélérés par l'anode.

La longueur d'onde des électrons émis est inversement proportionnelle à la tension d'accélération ; la résolution du microscope dépendra donc de la tension à laquelle il est capable de fonctionner. Pour permettre une émission et une propagation homogène du faisceau d'électrons il est essentiel que l'ensemble de la colonne soit sous un vide poussé. Le faisceau est rendu cohérent par le passage à travers le diaphragme de champ avant sa concentration sur l'échantillon par les lentilles condenseurs. Les lentilles d'un microscope électronique sont des lentilles magnétiques qui focalisent les particules chargées, que sont les électrons, par modulation du champ magnétique. Arrivés sur l'échantillon, les électrons vont interagir avec la matière qui le constitue et être plus ou moins absorbés et diffractés.

C'est le faisceau issu des ces interactions qui va servir à la formation d'une image agrandie par les lentilles objectifs situées en bas de la colonne à la suite de l'échantillon. Le matériel biologique est essentiellement formé d'éléments atomiques légers qui interagissent peu avec les électrons. Il devra être contrasté par des métaux lourds pour pouvoir être observé.

Les électrons n'étant pas visible à l'œil, l'image est formée sur un écran phosphorescent ou par l'intermédiaire d'une plaque photographique ou d'un écran associé à une caméra CCD.

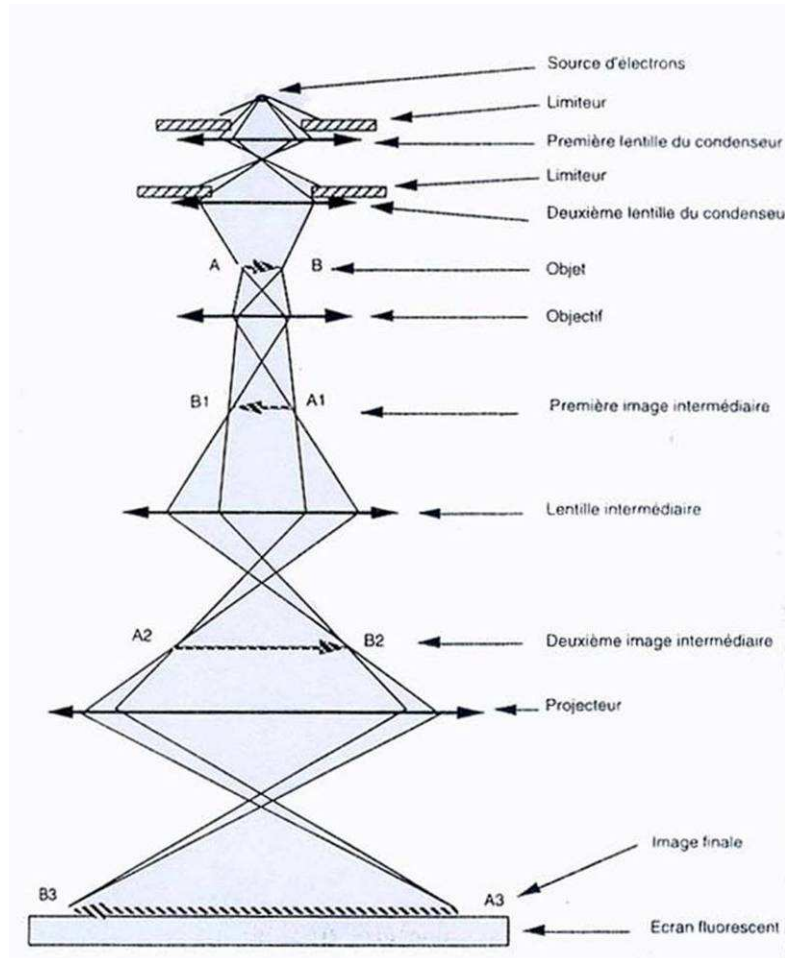


Figure 23 : Schéma d'un microscope électronique et du trajet des électrons dans la colonne.

La source lumineuse est rendue cohérente (i.e. faisceau d'électrons de même longueur d'onde et de même direction) par un diaphragme de champ, puis est concentrée sur l'objet par les lentilles condenseurs. Le faisceau d'électron transmis par l'échantillon est agrandi par une série de lentilles objectives qui projettent l'image sur un écran fluorescent ou une caméra CCD pour une observation directe, ou sur une plaque photographique afin d'enregistrer l'image. Il est intéressant d'observer que la schématisation du trajet optique des électrons dans la colonne du microscope électronique à transmission est similaire à celui des photons dans un microscope optique (cf. figure 20), montrant les analogies entre ces deux techniques.

Les observations de nos échantillons ont été réalisées avec un microscope électronique Philips CM12 fonctionnant avec une cathode en hexaborure de lanthane (LaB_6) sous une tension d'accélération de 120kV. Les images sont recueillies sur des plans films photographiques Kodak S0163, développés dans du révélateur D19 (Kodak) et numérisées au format JPEG à 1200 dpi (*dots per inch*) de résolution.

b) Préparation des échantillons

Les principes de fonctionnement du microscope électronique requièrent des échantillons suffisamment minces pour transmettre le faisceau d'électrons et résistants au vide de la colonne. Pour cela, les échantillons sont fixés par des agents chimiques et inclus dans une résine pour être débités en coupes très minces par techniques d'ultramicrotomie.

Les échantillons sont fixés 1h à 4°C par une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate de sodium (0,033M pH 7,4). Le fixateur est rincé par trois bains de 10min dans un mélange cacodylate de sodium / saccharose (0,05M / 0,3M pH 7,4) et une post fixation des échantillons est réalisée par le tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 2% dans un tampon cacodylate de sodium / saccharose (0,1M / 0,3M pH 7,4) pendant 1h à 4°C. Le fixateur est de nouveau rincé par trois bains de 10min dans un mélange cacodylate de sodium / saccharose (0,05M / 0,3M pH 7,4). Les échantillons sont déshydratés par des solutions d'éthanol de degrés croissant puis par un mélange 1/1 d'éthanol 100% et d'oxyde de propylène et finalement par l'oxyde de propylène pur.

Fixés et déshydratés, les échantillons sont imprégnés dans la résine d'inclusion. Celle-ci se compose d'un mélange de résine araldite CY212 (20mL), d'un durcisseur Anhydride Dodécényl Succinique (DDSA, 22mL) et d'un catalyseur Benzyl Dimethyl Amine (BDMA, 1,1mL). L'imprégnation se fait par un premier bain de 1h à 4°C de mélange oxyde de propylène/résine 2 :1, un second pendant une nuit par un mélange oxyde de propylène/résine 2 :1 puis un dernier bain de 1h à température ambiante dans la résine.

L'inclusion des échantillons dans la résine est réalisée dans une étuve à vide à 45°C en procédant à des dégazages réguliers. Les échantillons sont finalement disposés dans des moules alvéolaires remplis de résine et polymérisée pendant 3 jours à 60°C.

Les échantillons sont coupés en sections fines (~0,5µm) par un diamant histologique (Diatome) monté sur un ultramicrotome motorisé (Ultracut Reichert Young). Les coupes sont colorées au bleu de toluidine et observées au microscope photonique. Des coupes ultra fines (~70nm) sont ensuite réalisées sur les échantillons à l'aide d'un ultramicrotome monté d'un diamant ultracut (Diatome).

Les coupes sont déposées sur des grilles en cuivre et contrastées par une solution alcoolique à 1% d'acide phosphotungstique ou par une solution saturée d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb. L'acide phosphotungstique apporte un bon contraste aux fibres de

collagène, notamment de la striation transverse. Le contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb révèle parfaitement les éléments membranaires des cellules (membrane plasmique, réticulum endoplasmiques, vésicules...).

4. Microscopie électronique à balayage

a) Principes

La particularité de ce microscope est de donner une image des électrons réfléchis par l'échantillon. Cette technique permet de s'affranchir de la nécessité d'un échantillon mince permettant la transmission des électrons et ainsi de pouvoir imager la surface des échantillons avec une certaine profondeur de champ.

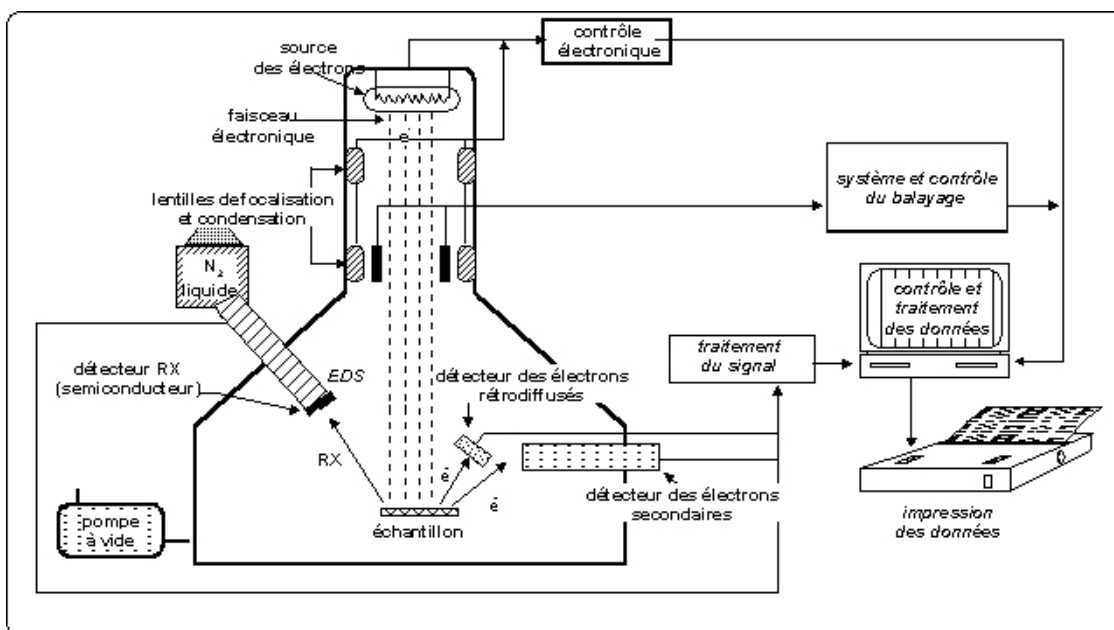


Figure 24 : Schéma d'un microscope électronique à balayage.

Le faisceau d'électron est focalisé sur la surface de l'échantillon par un jeu de deux lentilles magnétiques. Entre ces lentilles condenseur et objectif se trouve un système de déflecteurs électroniques qui vont entraîner le balayage de la surface de l'échantillon par le faisceau. Le grandissement d'un MEB est déterminé par le diamètre du faisceau d'électrons et par la distance entre le faisceau et l'échantillon. L'image MEB est formée par l'interaction des électrons avec la matière de l'échantillon qui peuvent soit être rétrodiffusés soit générer l'émission d'électrons secondaires ou de rayons X.

On remarque sur la figure 24 que la colonne du MEB est plus courte et plus simple que celle du MET. Les électrons sont émis et accélérés sous vide avec une faible tension et focalisés par la lentille condenseur et objectif qui se situent toutes les deux en amont de

l'échantillon. En fait, le grandissement d'un MEB est obtenu par la diminution du diamètre du faisceau d'électrons qui balaye l'échantillon c'est pourquoi il prend souvent le nom de sonde. Le grandissement est modulé par la distance entre le faisceau focalisé et l'échantillon (qui définit la distance de travail ou WD pour *Working Distance*) et par la sensibilité des capteurs électroniques qui vont recueillir les signaux émis après interaction des électrons avec l'échantillon.

Entre les deux lentilles se trouve un système de déflecteurs électromagnétiques qui entraîne le faisceau d'électrons dans un mouvement de balayage de la surface de l'échantillon selon une trame standard de télévision. La chambre du MEB contient différents détecteurs.

Les images topographiques de l'échantillon sont obtenues par le détecteur d'électrons secondaires qui résultent de l'interaction directe du faisceau d'électrons émis par le canon (électrons primaires) avec le cortège électronique des atomes en surface de l'échantillon. Il est également possible d'imager la composition atomique de l'échantillon par enregistrement des électrons rétrodiffusés, ou par le rayonnement X émis par l'échantillon sous le faisceau d'électrons primaires.

Les observations en MEB ont été réalisées avec un microscope JEOL JSM-5510 LV sous une tension d'accélération de 10kV et une distance échantillon détecteur de 12-15mm.

b) Préparation des échantillons

Les échantillons devant être introduits dans une enceinte sous vide, ils nécessitent d'être secs (i.e. dépourvus de liquides). Les échantillons sont fixés 1h à 4°C par une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate de sodium (0,033M pH 7,4). Après un rinçage par trois bains de 10min dans un mélange cacodylate de sodium / saccharose (0,05M / 0,3M pH 7,4), les échantillons sont déshydratés par des solutions d'éthanol de degrés croissants jusqu'à une solution d'éthanol 100%. L'alcool absolu est remplacé par du CO₂ liquide qui sera éliminé par transition au point super critique (31,1°C ; 73,8 bars). Cette technique de séchage au point super critique permet d'éliminer le liquide de l'échantillon tout en conservant sa structure macroscopique et microscopique, en réalisant une transition de phase liquide-gaz sans passer la barrière de changement d'état qui est très souvent dommageable pour les structures poreuses. Ainsi les volumes et distances observés par MEB

correspondent à ceux de l'échantillon fixé et hydraté. Le séchage super critique a été réalisé avec un appareil Bal-Tec 030.

Pour limiter l'accumulation de charges électriques sur l'échantillon qui entraîne une saturation de l'image, il est nécessaire que l'échantillon soit conducteur électriquement. Le matériel biologique l'étant très faiblement, il est rendu conducteur par dépôt, après séchage, d'une fine couche d'or de ~2nm d'épaisseur.

III Culture d'ostéoblastes *in vitro*

1. Lignées cellulaires étudiées

Nous avons utilisé deux lignées d'ostéoblastes humains au cours de cette étude. Toutes les deux sont d'origines fœtales mais la première a eu son génome modifié par un oncogène viral afin d'augmenter ses capacités prolifératives *in vitro* (cellules transformées). La seconde est une lignée dite primaire, obtenue à partir d'un explant osseux. Les modalités de leur obtention ainsi que leurs caractéristiques principales sont ici présentées.

a) Ostéoblastes transformés (FHSO-6)

Ces cellules proviennent du stroma d'un fémur de fœtus recueilli à la suite d'un avortement volontaire (fœtus de 8-12 semaines) (Fromigué *et al*, 1998). Les cellules du stroma médullaire sont récupérées et mises en culture *in vitro* dans un milieu de différenciation ostéogénique pendant 48h contenant, en plus du milieu nutritif Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), de l'acide ascorbique (50µg/mL), 3mM de NaH₂PO₄ et de la dexaméthasone (10⁻⁸ M). Les cellules sont ensuite amplifiées dans un milieu de culture standard contenant du DMEM et 10% de SVF. Les cellules à confluence sont perméabilisées par électroporation et transfectées par un plasmide recombiné avec le génome du Simian Virus 40 (SV40). Le génome du virus, dont l'origine de réplication est inactive (bloquant ses capacités de multiplication), va s'intégrer de façon permanente au génome des cellules stromales. L'expression de la protéine virale antigène grand T, qui lie spécifiquement les protéines de régulation du cycle cellulaire eucaryote p53 et pRB, va engager les cellules transfectées dans une voie proliférative. Deux semaines après transfection, la colonie cellulaire qui a montré la plus forte prolifération et la plus grande activité phosphatase alcaline, indiquant son engagement dans la voie de différenciation ostéoblastique, est sélectionnée pour donner la lignée FHSO-6 (Fœtal Human Stromal Osteoblastic cells, clone number 6).

Les cellules de la lignée FHSO-6 cultivées sur boîte de Pétri à confluence présentent une activité phosphatase alcaline qui est augmentée de manière dose dépendante par ajout de dexaméthasone (0,1-100nM), de 1,25-dihydroxyvitamine D (0,1-100nM) ou de BMP-2

recombinante (rhBMP-2 ; 0,1-100ng/mL). Ces cellules expriment également le mRNA de l'ostéocalcine et secrètent du collagène de type I.

b) Ostéoblastes primaires (F27)

Ces cellules proviennent d'explants d'os sain prélevés sur le crâne d'un nouveau né de 27 semaines au cours d'une opération chirurgicale (Debiais *et al*, 1998 ; Hay *et al*, 1999). Les fragments de calvaria sont lavés au PBS, découpés en morceaux de $\sim 1\text{mm}^3$ et digérés pendant 2h à 37°C par une solution de collagénase de type I à 0,25%. Les explants sont ensuite abondamment lavés par du DMEM supplémenté de 10% de SVF, de pénicilline (100 IU/mL) et de streptomycine (100 $\mu\text{g/mL}$). Les cellules sont récupérées du milieu de lavage par centrifugation, remises en suspension par du DMEM et multipliées en boîtes de culture de 25cm² à 37°C dans du DMEM contenant 10% de SVF. La population cellulaire obtenue par ces conditions est essentiellement composée de cellules indifférenciées présentant des caractéristiques pré-ostéoblastiques (de Polak *et al*, 1997).

Les cellules utilisées pour notre étude proviennent de deux explants osseux d'un même individu, l'un proche de la suture pariétale et le second à proximité de la suture pariéto-occipitale. Ces cellules ont montré un comportement identique au cours de notre étude. Avant leur ensemencement sur les matériaux de collagène ces cellules sont soumises à un *pulse* de différenciation de 48h par l'ajout de dexaméthasone à 10⁻⁸M dans le milieu de culture.

2. Dispositif expérimental

Afin d'équilibrer les concentrations en sels et en glucose dans la globalité de leur volume, les matrices fibrillaires et les éponges sont rincées puis incubées pendant une nuit dans du DMEM. Le lendemain, le DMEM est remplacé par un milieu de culture complet composé de DMEM, 10% de sérum de veau fœtal (SVF), d'un antibiotique et d'un antifongique (respectivement, pénicilline à 100 unités/mL et streptomycine à 10 $\mu\text{g/mL}$), 50 $\mu\text{g/mL}$ d'acide ascorbique et 3mM de NaH₂PO₄. L'acide ascorbique est nécessaire pour une bonne biosynthèse du collagène de type I, le phosphate inorganique (PO₄³⁻) est requis

pour la formation de minéral par les ostéoblastes. Ajoutées au milieu de culture, ces molécules le rendent propice à l'expression des gènes ostéoblastiques.

Les cellules sont déposées à la surface des matrices et des éponges à une densité de 1700 cellules/cm² puis placées dans un incubateur à 37°C sous 100% d'humidité et 5% de CO₂. Nous avons choisis d'ensemencer les cellules sur la surface des matrices fibrillaires qui était à l'interface collagène / air lors de l'étape de fibrillogénèse. Ce choix a été motivé par l'idée d'un système « prêt à l'emploi » (*ready to use*), où les matrices fibrillaires pourraient être formées, rincées, imbibées puis finalementensemencées en un nombre limité d'étapes. De façon à ce que des comparaisons puissent être faite plus facilement, les éponges de collagène ont également été ensemencées sur leur face supérieure.

Les cellules sont cultivées pendant 4 semaines sur les matrices et les éponges, les échantillons sont prélevés et analysés tous les 7 jours. Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours, conservé à -20°C pour être ensuite analysé. Classiquement, chaque série d'expériences comportait 4 échantillons par points de mesures et par type de matériau. Quatre expériences indépendantes de culture sur 28 jours ont été réalisées avec les cellules FHSO-6, deux avec les cellules primaires.

Pour la mise en évidence de la transition morphologique des ostéoblastes primaires à l'intérieur des matrices fibrillaires le même dispositif expérimental a été utilisé. Les échantillons ont été fixés pour être préparés pour la microtomie, l'ultramicrotomie et la microscopie de fluorescence et à deux photons après 3, 5, 7 et 10 jours de cultures. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées.

3. Préparations histologiques à la paraffine et colorations

Au jour choisi pour leur analyse, les matériaux en culture sont rincés 3 fois au PBS et fixés pendant 24h par une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS. Les échantillons sont de nouveau rincés au PBS puis déshydratés de façon progressive par un bain d'éthanol à 70% dans l'eau pendant 24h puis de 2 bains successifs de 3h dans l'éthanol 95% et l'éthanol 100%. Les échantillons sont ensuite préparés pour l'inclusion à la paraffine par un bain de 48h dans du butane-2-ol. Afin d'éliminer toutes traces résiduelles d'alcool, la

paraffine n'étant pas miscible dans ce solvant, les solutions de butanol sont changées régulièrement. Les échantillons sont inclus dans la paraffine liquide pendant 3h à 60°C, puis placés dans des barres de Leuckart et coulés dans la paraffine pour obtenir après refroidissement un bloc cubique solide qui sera débité en sections de 10µm d'épaisseur par un microtome manuel.

Les colorants utilisés étant des solutions aqueuses, les coupes microtomes sont déparaffinées par deux bains de 10min de toluène puis progressivement réhydratées par des bains d'alcool de degré décroissant jusqu'à un dernier bain d'eau distillée de 5min.

Les coupes sont colorées 5min par une solution d'hémalun de Masson puis rincées à l'eau courante. Pour la triple coloration de Prenant selon la méthode de Gabe, les coupes sont colorées à l'hémalun de Masson comme décrit précédemment, puis colorées pendant 10min par une solution alcoolique d'éosine vert-lumière et finalement rincées à l'éthanol absolu.

Pour la coloration de von Kossa, les coupes ont été incubées à l'obscurité dans une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) à 3% pendant 45min. Toujours dans des conditions d'obscurité, les coupes sont ensuite rincées trois fois pendant 5min à l'eau distillée. Les sels d'argent substitués aux sels de phosphate de calcium sont mis en évidence par un bain de révélateur photographique et la réaction est stoppée par un rinçage rapide à l'eau distillée et une solution de fixateur photographique. Les coupes sont contre colorées au rouge nucléaire.

Quelque soit le type de coloration, les coupes colorées sont de nouveau déshydratées par des bains de degré croissant d'alcool et deux bains de 5min de toluène pour être finalement montées à l'Eukitt entre lame et lamelle.

4. Immunohistologie

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées comme décrit ci-dessus, puis sont soumises à un bain de 10min dans du PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 5min à température ambiante dans une solution aqueuse de pepsine à 0,2% et d'acide acétique 10%, rincées au PBS puis incubées dans une solution de glycine à 1% dans du PBS pendant 30min. Après un nouveau rinçage au PBS, les sites d'adhésion non spécifique des anticorps sont bloqués pendant trente minutes à température ambiante par une solution de PBS contenant

0,05% de Tween-20, 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 10% SVF. Les anticorps primaires (anti-phosphatase alcaline humaine et anti-collagène I humain) sont dilués suivant les recommandations du fournisseur dans une solution de PBS contenant 0,05% de Tween-20 et 1% de BSA et laissé en interaction avec les coupes dans cette solution pendant une nuit à température ambiante dans une enceinte humide. Des coupes contrôles sont préparées selon les mêmes conditions sans anticorps primaires. Les coupes sont rincées trois fois 5min au PBS puis les anticorps primaires sont révélés pendant 45min à température ambiante par une solution d'anticorps secondaires couplés à la rhodamine et finalement rincées par du PBS. Les noyaux des cellules sont colorés pendant 15min par une solution de DAPI à 300mM dans du PBS, une dernière fois rincées par trois bains de PBS puis montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage aqueux.

Les observations sont effectuées sur un microscope fluorescent Zeiss AxioImager.

5. Marquage fluorescent du cytosquelette d'actine.

Le jour de l'observation, les matrices fibrillaires en cultures avec les ostéoblastes sont rincées par du PBS et fixées pendant 1h par une solution de PFA à 4% dans du PBS. Le fixateur est éliminé par trois bains de 5min de PBS et les cellules sont perméabilisées pendant 20min par une solution de Tween-20 à 0,5% dans du PBS. Les matrices sont à nouveau rincées par trois bains de PBS de 5min. Les filaments d'actine sont marqués par une solution à 10mM dans du PBS de phalloïdine couplée à l'Alexa-488, les matrices sont rincées au PBS puis les noyaux cellulaires sont marqués pendant 15min par une solution de DAPI à 300mM dans du PBS. Après un dernier lavage au PBS, les matrices sont déposées sur une lame de verre et recouvertes par une goutte de PBS et une lamelle. La préparation des échantillons pour l'observation en microscopie de fluorescence standard ou à deux photons est identique.

IV Modèle de craniotomie chez le rat

L'expérimentation animale des matrices a été réalisée en collaboration avec le Dr Marie-Laure Colombier et le Pr Jean-louis Saffar au Laboratoire sur la Réparation et Remodelage Oro-faciaux de l'Université Paris V à Montrouge. Cette équipe a développé un modèle de plaie crânienne standardisée chez le rat (Blanquaert *et al*, 1995 ; Colombier *et al*, 1999) que nous avons employé pour évaluer le comportement des matrices fibrillaires 5MG et 40MG *in vivo* et leurs propriétés de réparation osseuse.

1. Préparation des implants crâniens

Les matrices fibrillaires 5MG et 40MG implantées chez les rats trépanés ont été préparées suivant le même mode opératoire que décrit précédemment (Matériels et Méthodes, §I.2). Les modifications dans le protocole apparaissent dans le choix du moule pour obtenir *in fine* un matériau de la taille du défaut à combler, soit 5mm de diamètre et 1mm d'épaisseur.

Un volume de 0,8mL de solution de collagène à 5mg/mL a été coulé dans une boîte de Pétri de 3cm de diamètre, laissé reposer pendant une nuit à 20°C, puis fibrillé sous vapeurs d'ammoniaque. A l'aide d'un punch à main pour biopsies dermiques de 5mm de diamètre, les matrices à implanter sont découpées dans le moule, rincées abondamment par du PBS et conservées à 4°C dans ce même tampon jusqu'au jour de l'opération.

Pour obtenir les implants 40MG, une masse de 0,8g de collagène à 40mg/mL est déposée au centre d'une boîte de Pétri de 3cm de diamètre. Un premier étalement de la solution est réalisé par un *pulse* de centrifugation (1400g) en plaçant la boîte de Pétri contenant le collagène dans le porte tube d'un rotor à balanciers libres. L'étalement est complété par une pression mécanique manuelle progressive et continue à l'aide d'un disque de 3cm de diamètre recouvert de téflon. Comme pour les matrices 5MG, après une nuit de repos à 20°C la solution est fibrillée sous vapeurs d'ammoniaque et les matrices 40MG à implanter sont découpées au punch à main de 5mm de diamètre, rincées et conservées dans du PBS à 4°C avant leur implantation chez l'animal. Les matrices 5MG et 40MG à implanter sont présentées sur la figure 25 (A et B).

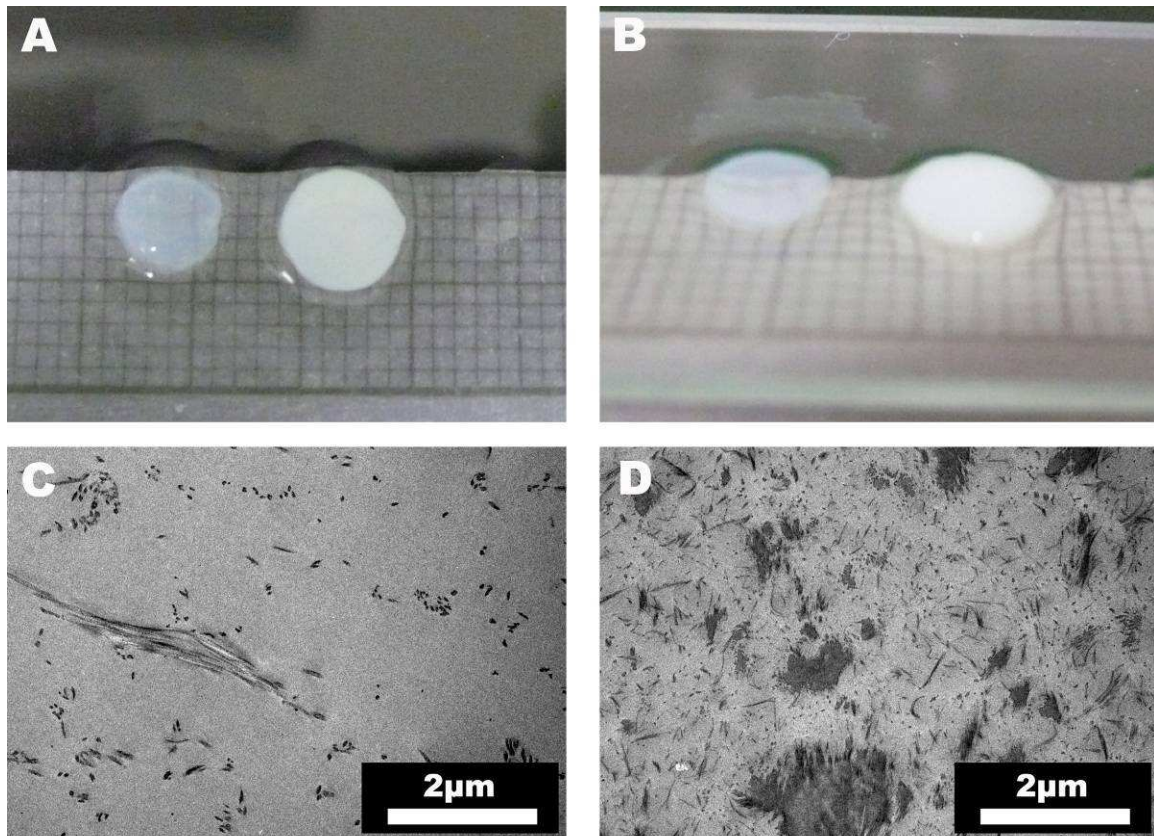


Figure 25 : Vue macroscopique et en coupe par MET des matrices 5MG et 40MG implantées dans un défaut crânien chez le rat.

(A) Vue de dessus des matrices 5MG (gauche) et 40MG (droite) implantées chez le rat. **(B)** Vue de côté. **(C)** Coupe d'une matrice 5MG implantée observée en MET. **(D)** Coupe d'une matrice 40MG implantée observée en MET.

La découpe des matrices 5MG par le punch à main a quelque peu réduit leur diamètre effectif par rapport à celui des matrices 40MG qui sont plus rigides et ont mieux résisté à la contrainte mécanique du punch. Vue de côté, les deux matrices présentent une épaisseur similaire de ~1mm comme attendu (figure 25 A et B).

Afin de s'assurer que les matrices implantées possèdent les mêmes caractéristiques structurales que celles utilisées *in vitro*, nous les avons analysées par MEB (non présenté ici) et par MET. Comme décrit précédemment, les matrices fibrillaires 5MG apparaissent en coupe au MET formées par un réseau lâche de fibrilles striées de diamètre homogène (figure 25 C). De même, les matrices 40MG présentent un réseau de fines fibrilles dans lequel se trouvent de larges faisceaux de fibrilles striées (figure 25 D).

2. Protocole expérimental

L'expérience a été réalisée avec 25 rats mâles Wistar de 8 semaines d'un poids médian de ~240g. Afin d'assurer une bonne acclimatation, les rats sont reçus à l'animalerie une semaine avant l'expérimentation et sont pesés la veille.

Le jour de l'expérimentation, les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution aqueuse de chloral (8%) à raison de 5mL/kg de masse corporelle. Le crâne étant une zone très sensible, un endormissement profond des rats est nécessaire pour éviter leurs mouvements lors de la trépanation. Les rats ont été anesthésiés par groupe de cinq dans la salle de chirurgie pour limiter leur état d'anxiété, la profondeur du sommeil est évaluée par un pincement fort de la patte arrière. Dans certains cas, une dose supplémentaire de chloral a été nécessaire pour obtenir un complet endormissement. A la suite de l'anesthésie, 24 rats ont été préparés pour la trépanation, un est mort asphyxié suite à l'anesthésie.

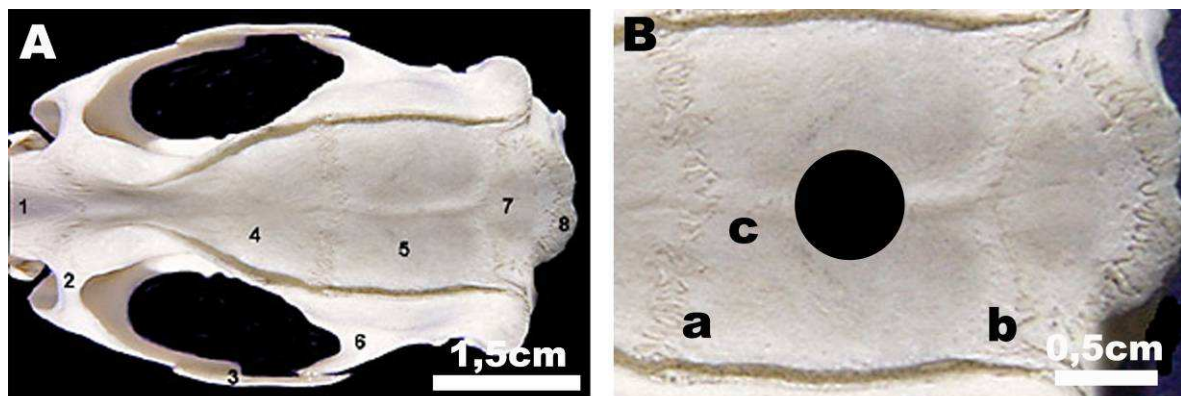


Figure 26: Présentation d'un crâne de rat et localisation de la zone trépanée

(A) L'os pariétal (5) est localisé sur la face dorsale du crâne, encadré en avant par l'os frontal (4), en arrière par l'os interpariétal (7) et latéralement par l'os temporal gauche et droit (6). (B) L'os pariétal est délimité en avant par la suture pariéto-frontale (a) et en arrière par la suture pariéto-occipitale (b). Le défaut a été réalisé au centre de l'os pariétal (disque noir) sur la suture sagittale (c).

Le crâne rasé, les animaux sont disposés à plat sur le ventre, la tête tendue vers l'avant, les membres antérieurs et postérieurs étalés le long du corps. Une incision sagittale (médiane) de ~4cm de long est pratiquée avec un scalpel sur la peau du crâne recouvrant la calvaria. L'os pariétal est ainsi exposé (figure 26 A ; 5), il est reconnaissable à la suture sagittale qui le partage en deux parties égales (figure 26 B ; c) et aux sutures qui le délimitent en avant avec l'os frontal et en arrière avec l'os interpariétal (figure 26 B ; a et b). La fine membrane de périoste qui recouvre le crâne est incisée sagittalement, décollée de l'os pariétal à l'aide d'un décolleur et rabattue sur les côtés.

Une lésion circulaire est réalisée au milieu de l'os pariétal, centrée sur la suture sagittale (figure 26 B, disque noir), par un trépan à bords francs de 5mm de diamètre (Praxis, France) monté sur un microtour basse vitesse (1500 tours/min). Le microtour est disposé verticalement, trépan dirigé vers le bas, sur un système de presse verticale qui permet d'ajuster à la main la hauteur du trépan. Lors de la trépanation, la plaie est constamment humidifiée par du sérum physiologique pour permettre une bonne rotation du trépan et pour éviter la dégradation des tissus par la chaleur générée par le frottement du trépan. Le fragment de calvaria trépané est retiré délicatement à l'aide d'une aiguille, laissant apparaître la dure mère et le cerveau surmontés par le sinus veineux sagittal qui court le long de la suture sagittale.

A ce stade, les 24 rats trépanés sont divisés en trois groupes :

- 8 rats dont la lésion est comblée par une matrice 5MG
- 8 rats dont la lésion est comblée par une matrice 40MG
- 8 rats dont la lésion est laissée vide (Sham)

Les deux matériaux, conservés dans du PBS, sont implantés dans le défaut crânien à l'aide d'une spatule. Leur manipulation est relativement aisée, chaque matrice est déposée sur la plaie puis enfoncée par le plat du décolleur. Pour chaque groupe, le périoste rejeté sur les côtés est ramené vers le centre du crâne, les bords de la plaie cutanée sont ensuite rapprochés et suturés.

A la suite de l'opération, les rats sont placés dans des cages individuelles tapissées de litière dans une pièce à température constante (24°C) et sous un cycle circadien normal et reçoivent nourriture et eau *ad libitum*

Quatre semaines après la trépanation, les rats sont pesés puis anesthésiés par injection intrapéritonéale de chloral (8% dans l'eau ; 5mL/kg de masse corporelle). Les animaux sont sacrifiés par exsanguination au niveau de l'oreillette cardiaque droite. La calvaria trépanée est récupérée sous la forme d'un explant de environ 1cm * 1,5cm autour du défaut à l'aide d'un disque diamanté monté sur un microtour. Les explants sont rincés par du sérum physiologique puis fixés à l'alcool 70% à 4°C. Ils seront par la suite analysés par densitométrie aux rayons X puis préparés pour une analyse histologique.

3. Analyse du contenu en minéral par densitométrie aux rayons X

Le système PIXImus (LUNAR, USA) permet d'imager des petits rongeurs et apporte des informations quantitatives sur les tissus mous, adipeux et minéralisés par la technique densitométrique de DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry). Cette analyse a été réalisée en collaboration avec Valérie Geoffroy dans l'unité U606 à l'hôpital Lariboisière.

Les explants de calvaria sont déposés par huit sur le plateau de la machine en deux groupes de quatre parallèles entre eux. Les échantillons sont balayés par un faisceau de rayons X de moyenne énergie (40kev) puis par un second de plus haute énergie (70kev) et les quantités de rayonnement transmis sont enregistrées point par point. Le logiciel (version 1.4) discrimine à partir des données de rayonnement transmis le tissu osseux, les tissus mous et adipeux et image leur territorialisation dans le plan des échantillons par projection de l'épaisseur.

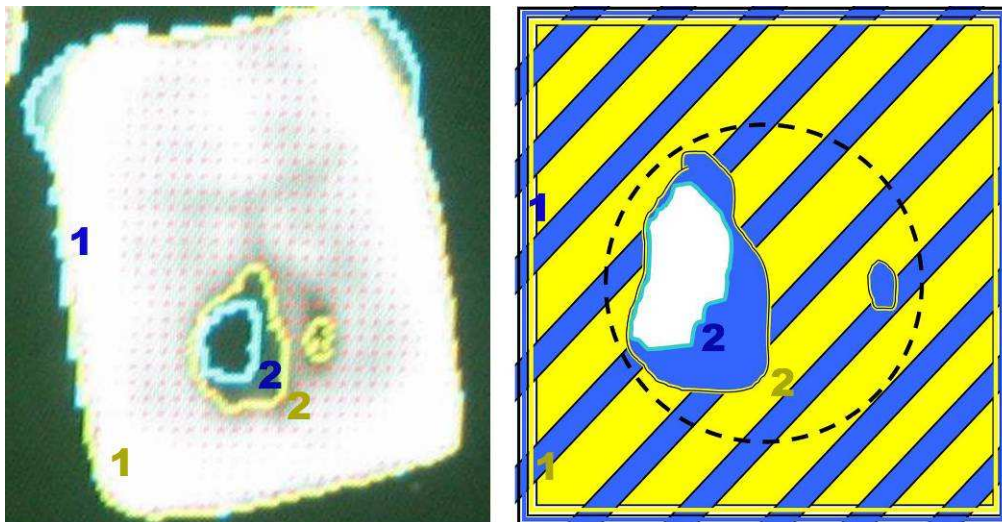


Figure 27 : Territorialisation des tissus mous et osseux par analyse DEXA

Une image DEXA d'un des explants de calvaria trépané est présentée comme exemple et schématisée. L'analyse DEXA permet de discriminer le tissu minéralisé délimité entre les lignes jaunes extérieures (1) et intérieures (2) de l'ensemble des tissus (lignes bleues extérieures (1) et intérieures (2)). Sur la représentation schématique, les surfaces bleues représentent le tissu dans son ensemble. La surface de tissu minéralisé présente dans l'explant est représentée en jaune. La surface blanche correspond à une zone décrite par le logiciel comme n'étant pas un tissu (transmission maximale du faisceau de rayons X).

Un exemple d'image DEXA obtenu avec un de nos échantillons est présenté et explicité sur un schéma (figure 27). Comme avec une radiographie X classique, les zones minéralisées apparaissent grisées (faible transmission des rayons X) et les zones non minéralisées noires. Le tissu osseux est compris entre les lignes jaunes extérieures (1) et intérieures (2), les lignes bleues extérieures (1) et intérieures (2) délimitent l'ensemble des

tissus sans distinction (minéralisé, charnu, adipeux). Ainsi pour cet exemple d'image DEXA, le défaut (pointillés noirs) a été minéralisé à l'exclusion des domaines délimités en jaune dans le défaut. Ces domaines sont cependant reconnus comme un tissu mou. Le domaine délimité en bleu dans le défaut est décrit par l'appareil DEXA comme n'étant ni du tissu minéralisé ni du tissu mou mais des zones plus ou moins « transparentes » aux rayons X.

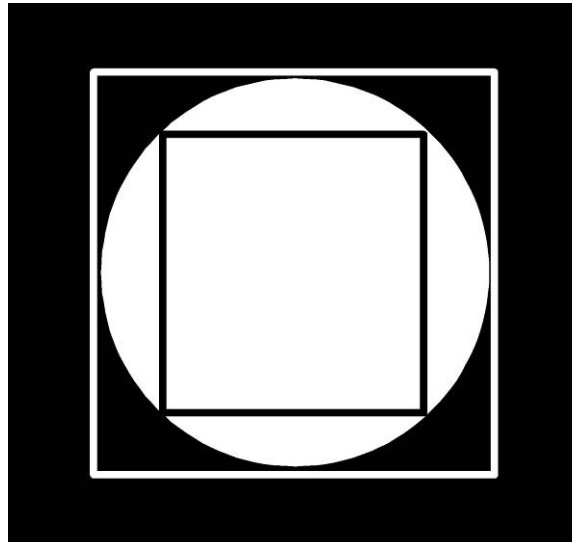


Figure 28 : Schéma des régions d'intérêt étudiées dans le défaut osseux de la calvaria.

Le disque blanc représente le défaut osseux dans la calvaria qui est schématisée en noir. Le carré blanc correspond à la ROI du carré exclu au cercle du défaut, le carré noir à la ROI du carré inclus au cercle du défaut.

En plus de l'image, l'analyse par DEXA apporte des données chiffrées des échantillons dont notamment la surface osseuse (*Bone Area*) et la densité en minéral dans l'os (*Bone Mineral Density*, BMD). Une ROI (*Region Of Interest*) est dessinée autour du défaut pour recueillir les données exclusivement sur cette zone. La version du logiciel de l'appareil que nous avons utilisé n'autorise que des ROI de la forme d'un parallélogramme. Ainsi un premier enregistrement des données a été réalisé avec une ROI de 31*31 pixels (taille du pixel : 0,18 μ m) correspondant au carré exclu au cercle (carré ext.) représenté par le défaut (figure 28, carré bordé de blanc). Un second enregistrement des valeurs de *Bone Area* et de BMD est fait dans une ROI de 21*21 pixels qui correspond au carré inscrit au cercle (figure 28, carré bordé de noir).

Les résultats de *Bone Area*, de pourcentage de comblement du défaut et de BMD présentés, correspondent pour chaque valeur à la moyenne des échantillons (n = 8) dans chaque groupe plus ou moins la déviation standard à la moyenne. Le pourcentage de comblement du défaut

par du tissu osseux a été obtenu par division de la *Bone Area* mesurée dans chaque ROI par la surface de la ROI. Un test t de Student a été réalisé sur les valeurs de *Bone Area* et de pourcentage de comblement du défaut par comparaison deux à deux de l'ensemble des valeurs de chaque groupe. Les résultats sont estimés significativement différents pour $p < 0,001$.

4. Préparations histologiques au méthyle méthacrylate

Les échantillons ont été préparés pour être analysés sur coupes histologiques. La trame minérale des échantillons osseux les rend très durs, et l'inclusion dans de la paraffine n'est plus suffisante pour obtenir des coupes minces de quelques microns. Pour surmonter cette limite technique, les pièces osseuses peuvent être déminéralisées (et incluses dans la paraffine) ou incluses dans une résine plus dure. Pour permettre la meilleure évaluation de l'os néoformé dans les défauts crâniens, nous avons inclus les explants dans du méthyle méthacrylate sans les déminéraliser.

Après fixation les pièces osseuses sont déshydratées par des bains successifs d'alcool de degré croissant. Les échantillons sont ensuite imprégnés dans du xylène, puis dans un mélange de xylène et de méthyle méthacrylate avant d'être inclus dans la résine composée d'un mélange de méthyle méthacrylate et de butyle méthacrylate supplémenté d'un catalyseur de la polymérisation (bensoyl peroxide). La polymérisation de la résine est réalisée à -20°C pendant trois jours.

Une fois inclus dans la résine polymérisée, les échantillons sont tronçonnés dans le plan frontal aux environs du diamètre le plus large du défaut. Les blocs sont ensuite placés sur un microtome K de Jung et débités en coupes sériées de $4\mu\text{m}$ d'épaisseur.

5. Analyse histomorphométrique

Les coupes sont déplastifiées par trois bains successifs de 20min dans du 2-ethoxyethylacetate puis réhydratées par des solutions d'éthanol de degré décroissant jusqu'à un bain terminal de 5min dans l'eau distillée. Pour leur analyse, les coupes déplastifiées ont été colorées par le Trichrome de Prenant et par une solution acide de bleue de toluidine à 1%, puis déshydratées et montées entre lame et lamelle à l'Eukitt.

Une coloration enzymatique de l'activité phosphatase alcaline des cellules a également été réalisée. Les coupes sont placées dans un tampon Tris à pH 9 en présence de $MgCl_2$ et incubées pendant 30min à 37°C en présence de naphthol ASTR, substrat synthétique de l'enzyme. Le naphthol métabolisé par la phosphatase alcaline est révélé par le Fast Blue RR. Il en résulte une pigmentation bleue au niveau des sites enzymatiques (majoritairement à la membrane plasmique). Les coupes sont rincées au PBS et montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (Immunomont).

En plus d'une description histologique des tissus et des cellules observées dans la plaie, une analyse quantitative de l'os néosynthétisé et des résidus des matrices fibrillaires a été réalisée dans l'épaisseur de la coupe. Concrètement, l'épaisseur d'os et de matrice résiduelle a été mesurée sur une même coupe en trois points correspondant au quartile droit, médian et gauche du défaut. Pour chaque coupe, les valeurs des trois points de mesures sont moyennées. Les résultats sont présentés comme la moyenne de trois coupes distantes de ~40µm pour l'ensemble des échantillons d'un même groupe, plus ou moins la déviation standard. Du fait de l'hétérogénéité de la réparation dans le groupe d'animaux non traités (Sham) il n'a pas été réalisé de mesure d'épaisseur d'os néoformé. Le pourcentage de dégradation des matrices est calculé suivant la formule :

$$[(E_o - E_r) / E_o * 100]$$

où E_o est l'épaisseur originelle de la matrice introduite dans le défaut (1mm)

E_r est l'épaisseur résiduelle de matrice mesurée sur les coupes

Le pourcentage de comblement du défaut est calculé par le ratio de l'épaisseur d'os néoformé sur l'épaisseur originelle du matériau (1mm).

RESULTATS

Chapitre I

Caractérisation des Matériaux de Collagène

Trois types de matrices fibrillaires de concentration spécifique en collagène ont été préparés et utilisés au cours de cette étude dans l'optique de démontrer leurs propriétés de substrat tridimensionnel pour des cellules osseuses humaines. Des éponges de collagène ont également été préparées et analysées en tant que matériau de référence.

Les matrices 5MG et 40MG, préparées respectivement à partir de solutions acido solubles de collagène à 5mg/mL et 40mg/mL, sont développées dans le contexte de la réparation tissulaire osseuse. Leurs propriétés d'induction et de maintien du phénotype ostéoblastique seront analysées en culture à long terme *in vitro* en parallèle avec des éponges de collagène. Elles seront également implantées *in vivo* dans un modèle de craniotomie chez le rat.

De plus, des matrices à 1mg/mL (matrices 1MG) seront présentées dans un dernier chapitre comme pouvant servir de modèle de matrice extracellulaire en trois dimensions.

Les matrices fibrillaires et les éponges de collagène ont été obtenues à partir des mêmes solutions de collagène. Les différences éventuelles de comportements des ostéoblastes sur ces matériaux seront donc liées, non à leur composition biochimique, mais à leur organisation structurale. Nous avons donc premièrement procédé à la caractérisation de l'ensemble des matériaux utilisés au cours de cette étude par des techniques de microscopie photonique et électronique. En première approximation, les propriétés d'interaction de ces matériaux avec des cellules sont évaluées par un test d'adhésion d'ostéoblastes humains transformés.

1. Analyse macroscopique

L'observation visuelle distingue déjà les matériaux les uns des autres (figure 29). Les matrices fibrillaires 1MG, 5MG et 40MG apparaissent sous la forme de gels élastiques et hydratés aux dimensions du moule dans lequel les solutions de collagène ont été coulées. Les matrices 1MG et 5MG sont plus ou moins translucides, l'augmentation de la concentration en collagène diminue leur transparence jusqu'à devenir blanc opaque comme observé pour les matrices 40MG.

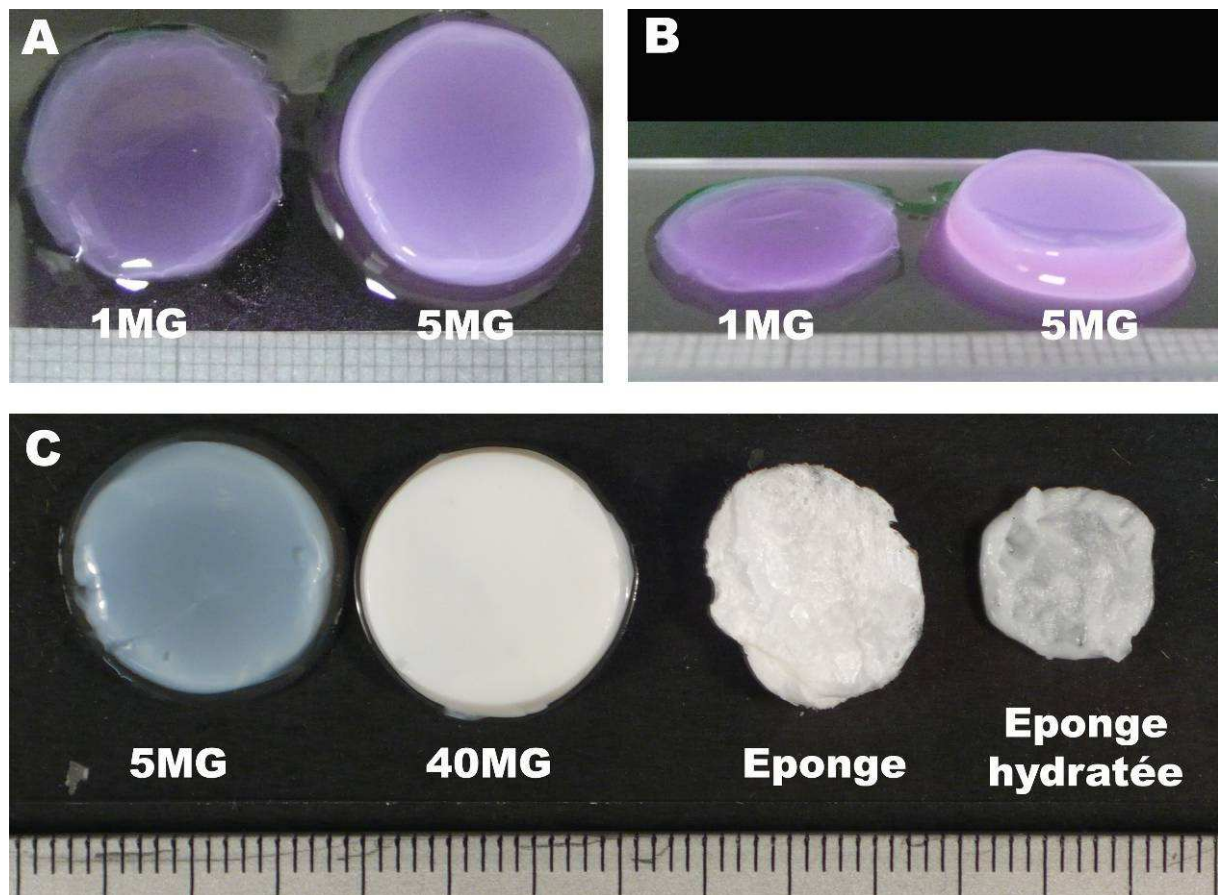


Figure 29 : Vue macroscopique des matrices fibrillaires et des éponges de collagène. (A) Vue de dessus ; les matrices 1MG et 5MG apparaissent translucides et hydratées **(B)** Vue de côté ; on observe l'affaissement des matrices 1MG et le maintien en épaisseur des matrices 5MG. **(C)** Vue de dessus ; les matrices 5MG et 40MG présentent une surface homogène macroscopiquement et s'opacifient avec la concentration en collagène. La face supérieure des éponges est irrégulière et rigide. On observe un fort rétrécissement des éponges, essentiellement dans l'épaisseur, après leur réhydratation.

La tenue mécanique des matrices évolue également avec l'augmentation de leur concentration comme observé en vue latérale (figure 29 B) où l'affaissement des matrices 1MG est évident alors que les matrices 5MG (tout comme les matrices 40MG) conservent leur épaisseur

initiale de ~2,8mm, soit la hauteur d'un volume de 0,5mL dans un moule cylindrique de 16mm de diamètre. De plus, les matrices 5MG présentent un ménisque sur leur face supérieure (interface collagène/air) lié à la capillarité de la solution de collagène sur les bords du moule qui n'est pas observé sur les matrices 40MG du fait de la nature visqueuse du collagène à cette concentration.

Les éponges de collagène sont par nature un matériau sec (lyophilisation d'une solution de collagène) qui nécessitent une étape de réhydratation avant leur utilisation dans un contexte biologique. Après lyophilisation les éponges conservent la forme initiale des solutions de collagène dans le moule. Elles présentent une face supérieure (interface collagène/air) brillante, comme nacrée, irrégulière, formée de pics et de creux, et plus rigide que le corps du matériau (figure 29). D'un point de vue mécanique, les éponges sont molles, non élastiques et extrêmement fragiles. Elles doivent être manipulées avec précaution afin d'éviter d'être déchirées ou écrasées, ce qui explique leur aspect irrégulier (i.e pas tout à fait cylindrique) sur la figure 29 lors du transfert de leur moule sur la lame de verre pour la prise de vue. Leur hydratation provoque un affaissement qui entraîne une perte d'à peu près 50% en volume, essentiellement dans l'épaisseur. Cette rétraction aboutit *in fine* à un matériaux plus rigide et donc plus facilement manipulable.

2. Analyse sur sections histologiques

Sur coupes histologiques colorées au picrosirius les matrices 1MG et 5MG présentent toutes les deux une pigmentation rouge spécifique du collagène (figure 30 A et C). Leur structure fibrillaire apparaît homogène et plus ou moins dense sur la coupe avec la présence de nombreux interstices non pigmentés. Observées en lumière polarisée entre polariseurs croisés à angle droit, les matrices 1MG présentent une biréfringence quasi nulle qui témoigne de leur faible concentration tandis qu'un signal un peu plus important est obtenu avec les matrices 5MG qui indique une augmentation du nombre de fibrilles de collagènes. En revanche, aucune orientation privilégiée des fibrilles dans les deux matrices ne ressort de cette analyse par lumière polarisée.

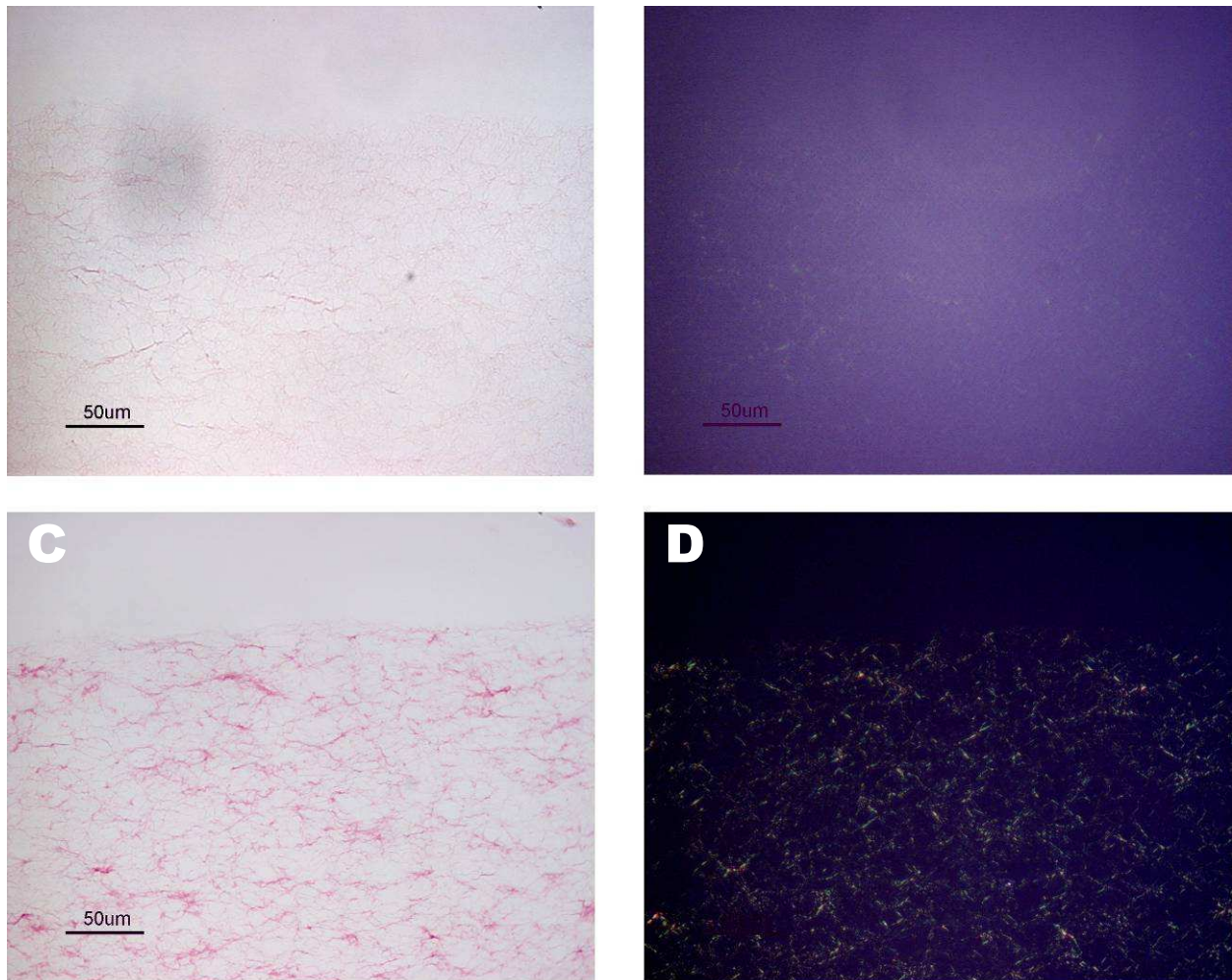


Figure 30 : Coupes histologiques des matrices 1MG et 5MG colorées au picrosirius

(A) matrice 1MG en lumière transmise ; une légère coloration rouge révèle les fibrilles de collagène organisées en un maillage lâche. **(B)** matrice 1MG en lumière polarisée ; entre polariseurs croisés l'extinction de la lumière est totale, aucun signal de biréfringence n'est observé. **(C)** matrice 5MG en lumière transmise ; la pigmentation apparaît plus franche et révèle un maillage plus dense. **(D)** matrice 5MG en lumière polarisée ; entre polariseurs croisés un faible signal de biréfringence est obtenu qui rend compte de la densité plus grande des molécules de collagène.

A l'inverse, les matrices 40MG présentent en coupes histologiques une structure compacte et homogène sans interstices distinguables (figure 31A). En lumière polarisée de larges domaines de biréfringence homogène de plusieurs dizaines de microns apparaissent (figure 31B). Ces domaines biréfringents indiquent la présence d'amas denses de fibrilles parallèles entre elles et orientées de 45° à 90° au faisceau de lumière selon leur intensité.

Les éponges de collagènes apparaissent dans leur section très différentes des matrices fibrillaires. Elles sont constituées de feuillets denses, séparés par de larges interstices (figure 31 C). La taille et l'épaisseur des feuillets ainsi que la distribution des espaces libres entre et

dans les feuillets apparaissent désordonnées. En lumière polarisée les feuillets émettent un fort signal de biréfringence qui témoigne de leur densité élevée en collagène (figure 31 D).

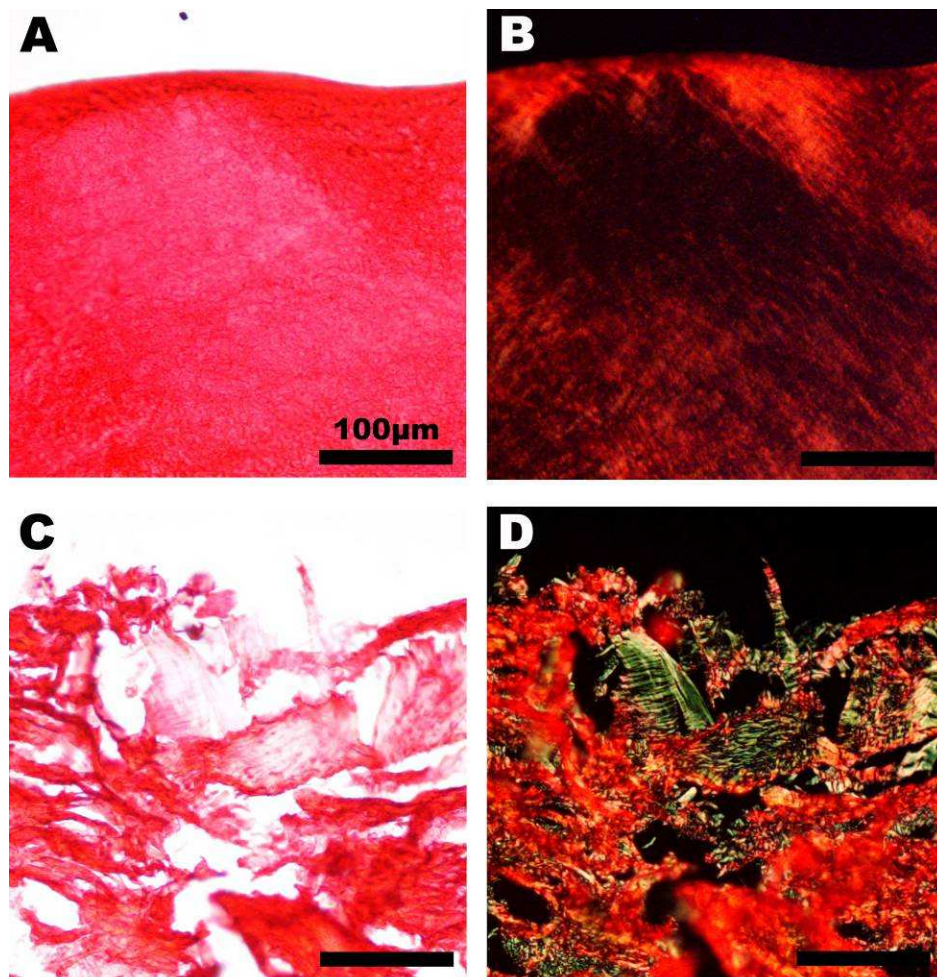


Figure 31 : Coupes histologiques des matrices 40MG et des éponges colorées au picrosirius (A) matrice 40MG en lumière transmise ; les matrices apparaissent dans une teinte rouge vive dense et homogène. (B) matrice 40MG en lumière polarisée ; entre polariseurs croisés il apparaît de larges domaines organisés de collagène qui émettent un signal de biréfringence. (C) éponge de collagène en lumière transmise ; les éponges apparaissent constituées de feuillets fortement colorés séparés par de larges pores. (D) éponge de collagène en lumière polarisée ; entre polariseurs croisés les feuillets présentent un fort signal de biréfringence qui témoigne de leur densité en collagène.

3. Analyse par microscopie électronique à balayage et en transmission

Observées en microscopie électronique à balayage (MEB) les matrices 1MG et 5MG présentent une structure similaire sous la forme d'un enchevêtrement fibrillaire désordonné (figure 32 A et C). A plus fort grossissement on distingue une différence de densité entre les deux réseaux, les matrices 5MG présentent une densité de fibrilles plus élevée que les

matrices 1MG, concrétisation de la différence de concentration des solutions de collagène initiales (figure 32 B et D). On remarque également sur ces images un diamètre équivalent des fibrilles de collagène entre les deux matrices, de l'ordre de la centaine de nanomètres. Plus spécifiquement, les matrices 1MG se présentent sous la forme d'un réseau fibrillaire lâche avec des interstices d'une dizaine de microns. Au même grandissement, les matrices 5MG sont formées d'un réseau fibrillaire plus complexe, avec une distance entre fibrilles dans le plan de quelques microns. Certaines études mesurent la taille de pores de réseaux fibrillaires à partir d'images en microscopie à balayage. La profondeur de champ qu'offre cet appareil montre que si deux fibres sont espacées dans un plan, l'espace créé peut être obstrué par les fibres des plans inférieures. Nous reviendrons sur la notion de pores et sur leur mesure dans le paragraphe suivant.

Les images de coupes ultrafines des matériaux en microscopie électronique en transmission (MET) confirment la structure en réseau fibrillaires des matrices 1MG et 5MG (figure 33 A et C). On constate que les fibrilles de collagène reconstituées des matrices possèdent la striation transverse caractéristique des fibrilles natives et un diamètre homogène de 100nm (figure 33 B et D).

La surface des matrices 40MG apparaît dense et compact en MEB, composée d'un assemblage de domaines rectangulaires desquels émergent de larges fibres (figure 32 E). Avec un grandissement plus élevé on constate que ces formes correspondent à des faisceaux de fibrilles plus ou moins fusionnés et séparés par un réseau fibrillaire sous-jacent fin et compact (figure 32 F). Ces structures décrites en surface sont également observées par MET au cœur du matériau en coupe ultrafines (figure 33 E). De larges agrégats denses aux électrons, de $\sim 1\mu\text{m}$ de section, font échos aux formes rectangulaires observées en surface. Autour d'eux on trouve des éléments fibrillaires fins et peu structurés. A fort grandissement, les agrégats apparaissent sous la forme de faisceaux de fibrilles striées d'environ 200 à 700nm de diamètre. Les fins éléments fibrillaires alentours ont globalement un diamètre de 10nm et ne présentent pas de striations (figure 33 F).

Les éponges de collagène apparaissent en MEB sous la forme d'un empilement de feuillets de collagène plus ou moins ondulés séparés par de nombreux et larges pores (figure 32 G). Si les feuillets au cœur de l'éponge peuvent être connectés entre eux, on remarque que

la face supérieure de l'éponge est constituée d'un feuillet dense, homogène et sans orifices. Cette différence entre la surface et le cœur de l'éponge était déjà décrite par l'observation macroscopique et est confirmée à l'échelle microscopique. On constate que la taille des pores est hétérogène, couvrant une gamme de taille de la dizaine à plusieurs centaines de microns. De même, la taille des feuillets de collagène est disparate. A un plus fort grossissement on remarque qu'ils forment des murs épais (~100nm) et extrêmement denses autour des pores (figure 32 H). En coupe par MET, on constate que la totalité des molécules de collagène est concentrée dans les feuillets leur conférant une structure extrêmement dense alors que les pores sont vierges de matériel (figure 33 G). Avec un grossissement plus important, on distingue les constituants des feuillets des éponges qui sont formés d'une accréation de molécules de collagène sous la forme de micro fibrilles d'un diamètre maximum de ~20nm à l'interface avec les pores (figure 33 H).

Figure 32 (page suivante): Matrices fibrillaires et éponge en microscopie électronique à balayage après séchage super critique.

(A) et (B) matrice 1MG ; apparaît constitué d'un entrelacement non structuré de fibrilles homogènes en diamètre et distantes de plusieurs microns. **(C) et (D)** matrice 5MG ; elle présente la même structure fibrillaire entrelacée que les matrices 1MG avec un diamètre de fibrilles similaire et homogène. A plus fort grossissement le réseau fibrillaire apparaît distinctement plus dense. **(E) et (F)** matrice 40MG ; composée d'un assemblage de formes cubiques desquelles émergent de larges fibres. Ces formes cubiques correspondent à des faisceaux de fibrilles plus ou moins fusionnés et séparés par un réseau fibrillaire sous-jacent fin et compact. **(G) et (H)** éponge ; formée d'un empilement de feuillets de collagène séparés par de nombreux et larges pores. Les feuillets constituent des murs épais autour des pores.

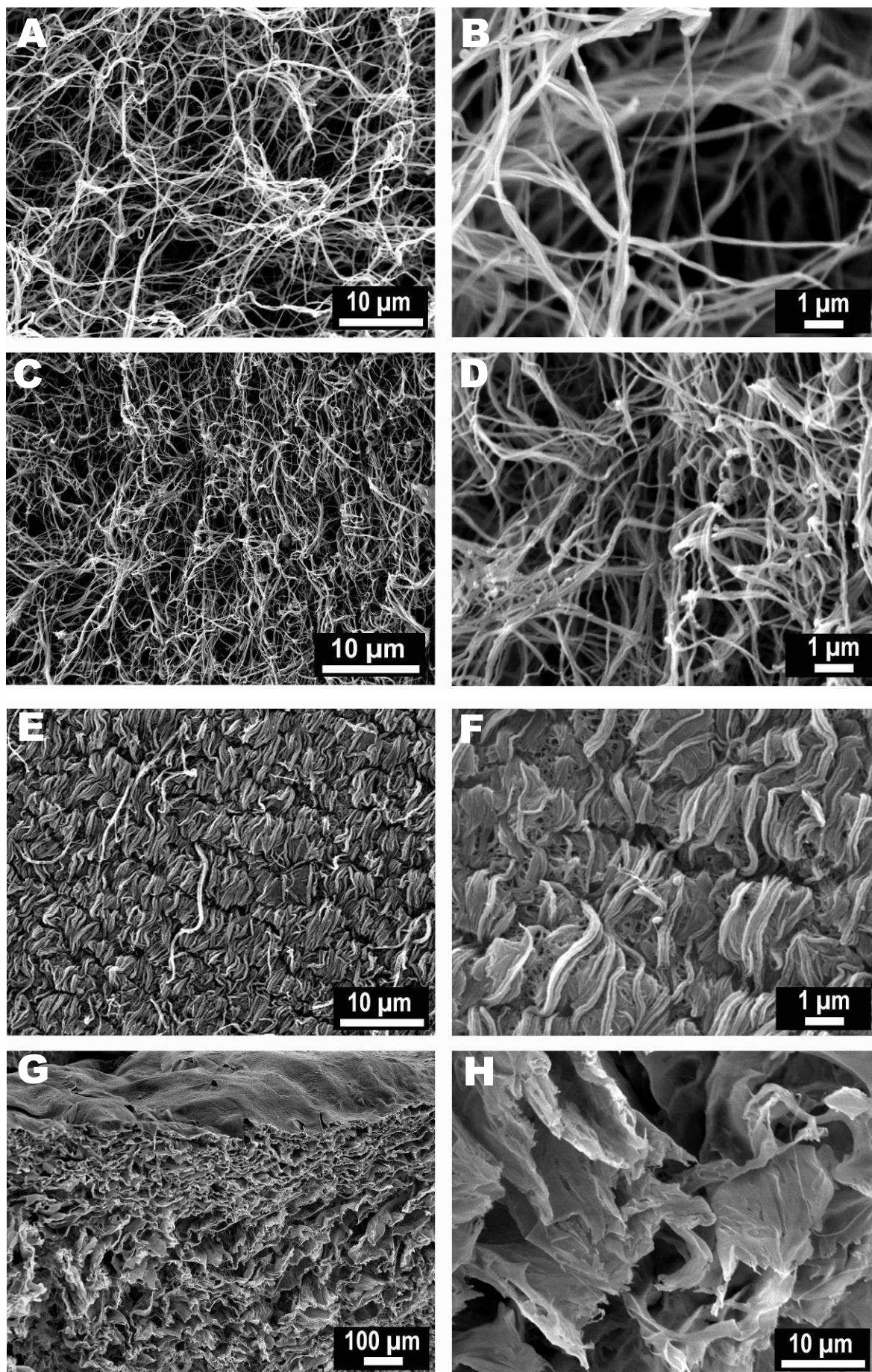


Figure 32 : Matrices fibrillaires et éponge en MEB. Légende page précédente.

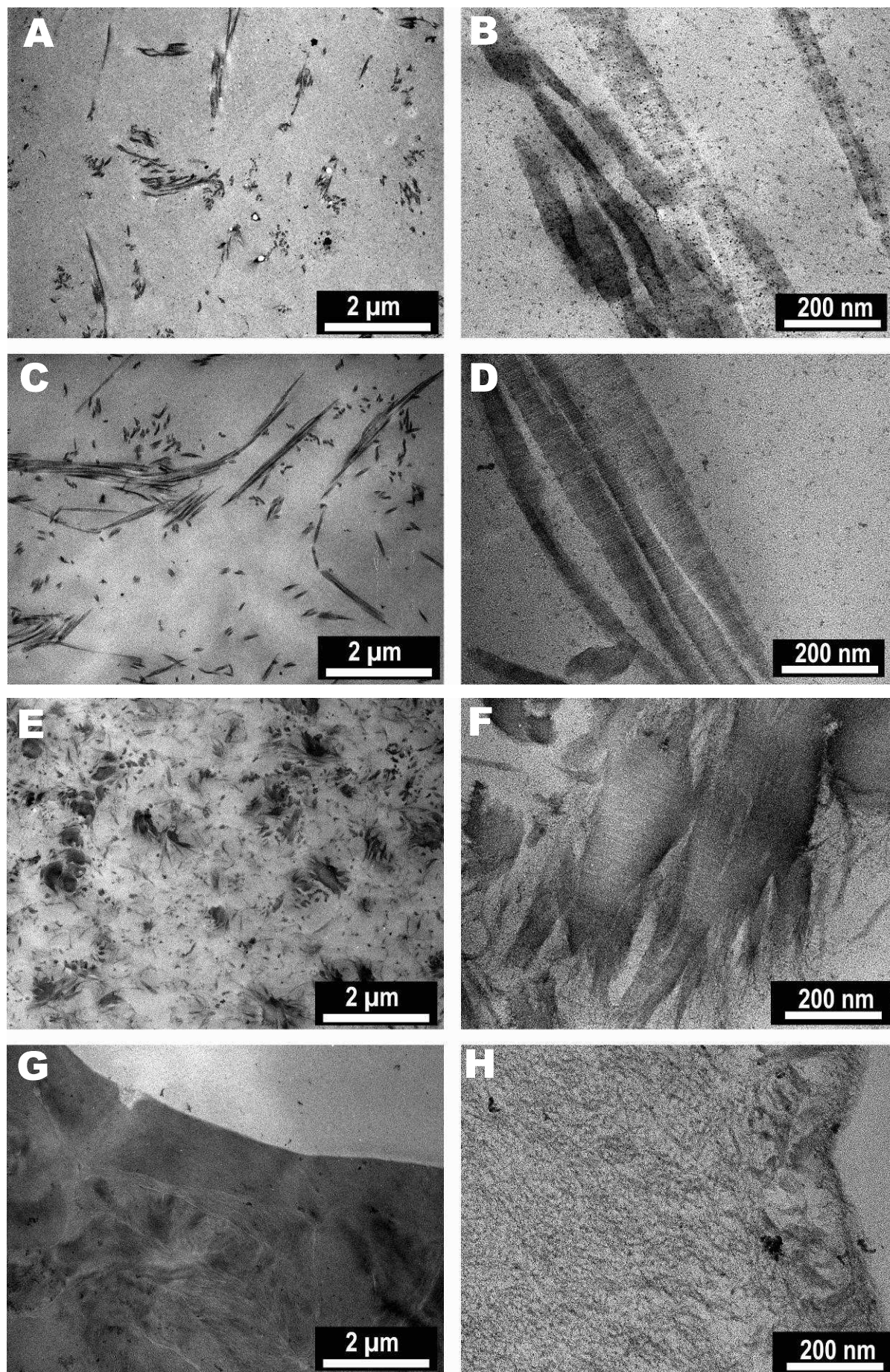


Figure 33 : Matrices fibrillaires et éponge en MET. Légende page suivante.

Figure 33 (page précédente) : Matrices fibrillaires et éponge en microscopie électronique à transmission.

(A) et (B) matrice 1MG ; les fibrilles sont disposées de façon non ordonnée au cœur du matériau et présentent la striation transverse caractéristique de fibrilles de collagène. (C) et (D) matrice 5MG ; les fibrilles apparaissent plus longues mais d'un diamètre similaire à celles observées dans les matrices 1MG et présentent également la striation transverse. (E) et (F) matrice 40MG ; à faible grandissement ces matrices présentent de larges domaines denses aux électrons entourés d'éléments fibrillaires moins distincts. Ces domaines correspondent à de larges faisceaux de fibrilles striées. (G) et (H) éponge ; un mur de collagène et un pore. A plus fort grandissement le mur est constitué de microfibrilles de ~20nm de diamètre. Coupes contrastées à l'acide phosphotungstique.

4. Notions et mesure de porosité

Pour des matériaux destinés à la reconstruction osseuse, leur capacité à être rapidement et profondément colonisé par les cellules de l'hôte est cruciale pour la réparation de la lésion. Ainsi, la porosité de tels matériaux est présentée comme un pré requis et la majorité des études dans ce domaine proposent des matériaux à haut degré de porosité avec des gammes de taille de pores allant de la dizaine à plusieurs centaines de micromètres. Afin de pouvoir démontrer la nature poreuse des matrices fibrillaires et de justifier le choix de notre technique de mesure de porosité il nous a semblé important de définir ici la notion de pores et de porosité, avant la présentation des résultats.

Le dictionnaire en ligne du CNRS « Trésor de la Langue Française » propose au mot « pore » la définition et les exemples suivants :

« très petit orifice de la surface d'un corps, très petite cavité d'un corps. *Pores du bois, de la coquille des oeufs, d'une éponge, d'un filtre, d'un mortier, d'une pierre, du sol, du sucre, de la terre. Les pores absorbans des parois du tube alimentaire ou intestinal* (LAMARCK, *Philos. zool.*, t.2, 1809, p.133). *La magnésie (...) reste pulvérulente et remplit les pores du ciment* (CLÉRET DE LANGAVANT, *Ciments et bétons*, 1953, p.77). »

Les observations structurales précédentes montrent que cette définition s'applique totalement aux larges espaces délimités par les feuillettes de collagène décrits dans les éponges. A ce titre, nous avons utilisé le mot « pore » lors de leur description et donné une taille moyenne de leur section. Les matrices fibrillaires de collagène apparaissent sous la forme d'un matériau solide formé de fibres entrelacées de manière plus ou moins compacte et ordonnée en fonction de leur concentration. Des espaces existent entre les fibrilles des matrices sans que ceux-ci ne possèdent une forme clairement définie et donc quantifiable. Nous pouvons, de la même façon que pour les éponges, considérer que les espaces observés entre les fibrilles de collagène

constituent des orifices, non dans la matière physique du matériau, mais dans la globalité de sa structure finie. Ainsi, les matrices fibrillaires de collagène peuvent être décrite comme un matériau poreux, sans qu'un pore particulier puisse être de façon spécifique mis en évidence et de ce fait quantifié en terme de taille ou de volume.

	5MG	40MG	Surface totale analysée
% surface occupé par objet > 50nm	5,81% (+/- 0,92)	16,08% (+/- 1,54)	3200 μm^2
% surface occupé par objet > 25nm	5,14% (+/- 0,93)	16,00% (+/- 2,90)	800 μm^2

Tableau 1-1 : Analyse du volume poreux des matrices 5MG et 40MG.

Pourcentage de surface occupé par le collagène dans chacune des matrices mesuré sur coupes ultrafines en MET. Il en résulterait qu'environ 95% du volume des matrices 5MG et 84% du volume des matrices 40MG serait libre de tout matériel d'une taille supérieur à 25nm

De part cette analyse il semble plus justifié de parler pour les matrices fibrillaires d'un volume global libre de tout matériel. Un tel volume peut être mesuré de façon grossière en comparant les masses sèches et hydratées de matrices ou par la technique de porosimétrie au mercure. N'ayant pas eu accès à cette dernière, nous avons analysé non pas le volume libre mais la surface libre de matériel collagénique à partir de coupes ultrafines des matrices observées en microscopie électronique à transmission. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. On constate que les fibrilles de collagènes occupent un espace extrêmement restreint au sein des matrices puisqu'elles ne représentent qu'environ 5% des matrices 5MG et 16% des matrices 40MG. Par extrapolation, et du fait de la faible dispersité des mesures, nous pouvons proposer un volume poreux aux environs de 95% pour les matrices 5MG et de 84% pour les matrices 40MG.

5. Interaction ostéoblastes-matériaux de collagène à court terme : test d'adhésion

Les matériaux présentés précédemment sont destinés à interagir à long terme avec des cellules osseuses. Comme première approximation de leur compatibilité avec du matériel biologique, un test d'adhésion à court terme (6 heures) a été réalisé. Les matrices 5MG, 40MG et les éponges ont étéensemencées à leur surface par des ostéoblastes humains transformés (cellules FHSO-6). Afin d'évaluer au mieux les capacités adhésives intrinsèques

de chacun des matériaux, des lames de verre, dont les capacités d'adhésion cellulaire sont faibles, sont égalementensemencées. Le nombre de cellules adhérees sur les différents matériaux est compté après 30min, 3 heures et 6 heures de culture.

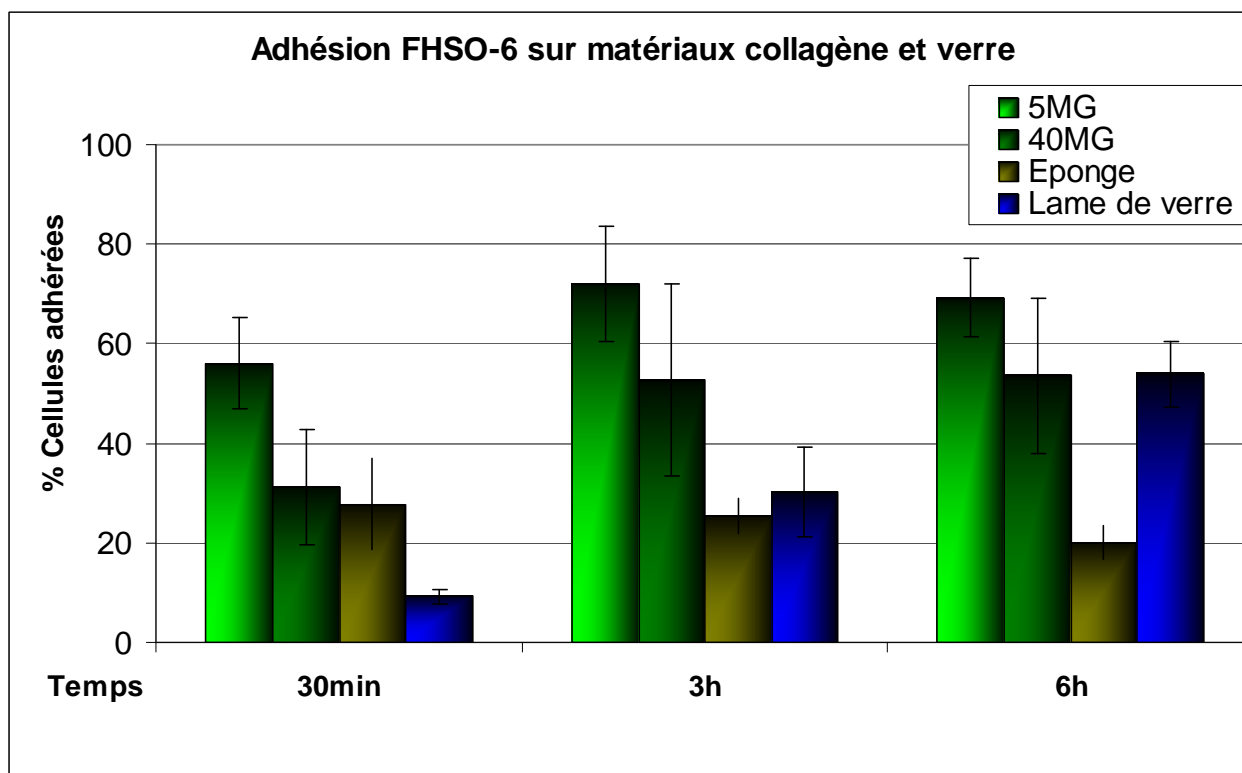


Figure 34 : Test d'adhésion d'ostéoblastes humains transformés sur les matériaux de collagène et des lames de verre.

Les cellules FHSO-6 sont ensemencées sur la face supérieure des matériaux et dénombrées après 30min, 3h et 6h. Les lames de verre sont utilisées comme témoin d'adhésion non spécifique.

Plus de la moitié (56.1% +/- 9.3) des cellules FSHO-6 ont adhéré à la surface des matrices 5MG dès 30min après ensemencement. Dans la même période de temps, les matrices 40MG et les éponges présentent toutes les deux un pourcentage d'adhésion d'environ 30% (31.2% +/- 11.7 et 27.7% +/- 9.1 respectivement). Le maximum d'adhésion sur les matrices 5MG est obtenu après 3h d'interaction (71.9% +/- 11.6). Ce taux reste plus ou moins constant jusqu'à la fin de l'expérimentation soit 6h après ensemencement (69.2% +/-8.0).

On observe de la même façon un plateau dans l'adhésion des cellules après 3h (52.7% +/- 19.3) et 6h (53,9% +/- 6.6) sur les matrices 40MG. Le taux de cellules adhérees sur les éponges de collagène restent plus ou moins constant au cours de l'expérimentation (27.7% +/- 9.1; 25.4% +/- 3.4 et 20.1% +/- 3.5 respectivement à 30min, 3h et 6h), la valeur maximale de cellules adhérees à leur surface maximum étant obtenu dès les premières trente minutes. A

l'inverse, nous observons une augmentation constante avec le temps des cellules adhérees sur les lames de verre avec un maximum de 53.9% (+/- 6.6) après 6H.

Ainsi, à la fin de l'expérimentation, soit 6h après ensemencement, les matrices 5MG présentent le plus fort taux de cellules adhérees tous matériaux confondus. Au même point temporel, les matrices 40MG présentent un pourcentage de cellules adhérentes similaire à celui dénombré sur les lames de verre, les éponges un pourcentage inférieur.

6. Conclusions

Au cours de ce chapitre nous avons décrit les caractéristiques structurales des matrices et des éponges à l'aide de plusieurs techniques de microscopie couvrant une large gamme d'échelle métrique.

Les matrices se présentent sous la forme de gels hydratés aux dimensions adoptées par les solutions de collagène dans leur moule. De propriétés mécaniques élastiques, elles se rigidifient avec l'augmentation de leur concentration en collagène. Pour une concentration faible (1mg/mL) et moyenne (5mg/mL) en collagène, les matrices sont constituées en surface comme dans leur épaisseur d'un réseau plus ou moins dense de fibrilles de collagènes. Dans ces matrices, les fibrilles ont un diamètre homogène de 100nm environ et possèdent la striation traverse des fibrilles natives. Les matrices 40MG, les plus concentrées, sont compactes, constituées de larges faisceaux de fibrilles striées de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre. Une analyse de la porosité montre que 95% du volume des matrices 5MG et 86% du volume des matrices 40MG est constitué d'espaces libres potentiellement colonisables par des cellules.

Les éponges de collagène sont structurellement différentes des matrices. Formées par lyophilisation de solutions de collagène, elles sont fragiles, irrégulière en surface et se contractent au cours de leur réhydratation. Elles sont constituées de feuillets épais de collagène qui délimitent des larges pores d'une dizaine à une centaine de microns en diamètre. Au sein des feuillets, les molécules de collagènes sont agrégées sous la forme de fines fibrilles non structurées d'au maximum 20nm de diamètre.

Chapitre II

Etude *in vitro* à long terme d'ostéoblastes humains sur les matrices fibrillaires

Dans l'objectif d'utiliser les matrices fibrillaires de collagène pour la réparation osseuse, nous avons premièrement évalué le comportement d'ostéoblastes humains ensemencés à la surface des matrices 5MG et 40MG et cultivés *in vitro* pendant quatre semaines. Deux lignées d'ostéoblastes humains, l'une transformée par le virus SV-40 (cellules FHSO-6) l'autre primaire (cellules F27), ont été étudiées.

Afin d'évaluer au mieux les apports des matrices fibrillaires pour la réparation osseuse des éponges de collagène ont également été ensemencées par les lignées d'ostéoblastes et utilisées comme matériau de collagène de référence.

Les caractéristiques histologiques et cytologiques des deux lignées de cellules sont analysées et interprétées après chaque semaine de culture. Le phénotype ostéoblastique des cellules sur les divers matériaux est analysé par la mise en évidence de l'activité minéralisante des cellules et par la détection de l'expression des marqueurs ostéoblastiques que sont la phosphatase alcaline (ALP) et le collagène de type I.

1. Analyse morphologique

a) Lignée d'ostéoblastes humains transformés (cellules FHSO-6)

En première observation nous constatons que les cellules FHSO-6 ensemencées à semi-confluence à la surface des matrices 5MG, 40MG et des éponges ont adhéré et survécu sur les trois matériaux pendant les 4 semaines de culture (figure 35).

Plus spécifiquement, sur les matrices 5MG les cellules se sont organisées en surface en une monocouche épithélioïde. Les ostéoblastes ont une forme cubique avec un large noyau qui n'apparaît pas polarisé (figure 35 A et B). Ces caractéristiques structurales, qui sont celles décrites pour les ostéoblastes à la surface de la matrice osseuse *in vivo*, sont conservées pendant les 4 semaines d'expérimentation à la surface des matrices 5MG. Par MET nous retrouvons à 7 jours (figure 36 A) et 28 jours (figure 36 C) la forme cubique et le large noyau comme observé en histologie. De plus l'observation ultrastructurale révèle que les ostéoblastes FHSO-6 sont en étroite interaction avec les matrices 5MG (figure 36 B et E). Les cellules présentent un réticulum endoplasmique (RE) bien développé autour du noyau (figure 36 C et D). On observe à l'intérieur du RE des éléments fibrillaires d'une dizaine de nanomètre de diamètre qui pourraient être des molécules de procollagène en cours de synthèse (figure 36 B). Par dénombrement des cellules sur coupes histologique on constate que celles-ci prolifèrent pendant les 28 jours de culture jusqu'à une densité 6 fois supérieur à la densité d'ensemencement initiale (figure 37).

Des cellules sont également observées à l'intérieur des matrices 5MG. Elles se présentent sous une forme différente des cellules en surface avec une morphologie en fuseau bipolaire et leur corps cellulaire plus concentré autour du noyau (encarts figure 35 A et B). Une telle morphologie fusiforme est souvent associée à la migration cellulaire. Cependant on n'observe pas de traces de digestion de la matrice autour des cellules et la détection par immunohistologie des métalloprotéases MMP-9 et MMP-13 s'est révélée négative. Les cellules dans les matrices 5MG représentent un taux constant de ~3% du nombre total de cellules pendant les 4 semaines d'expérimentation. Comme on observe une augmentation du nombre total de cellules, le taux constant de cellules à l'intérieur des matrices 5MG indique que les cellules pénètrent de façon continue dans les matrices.

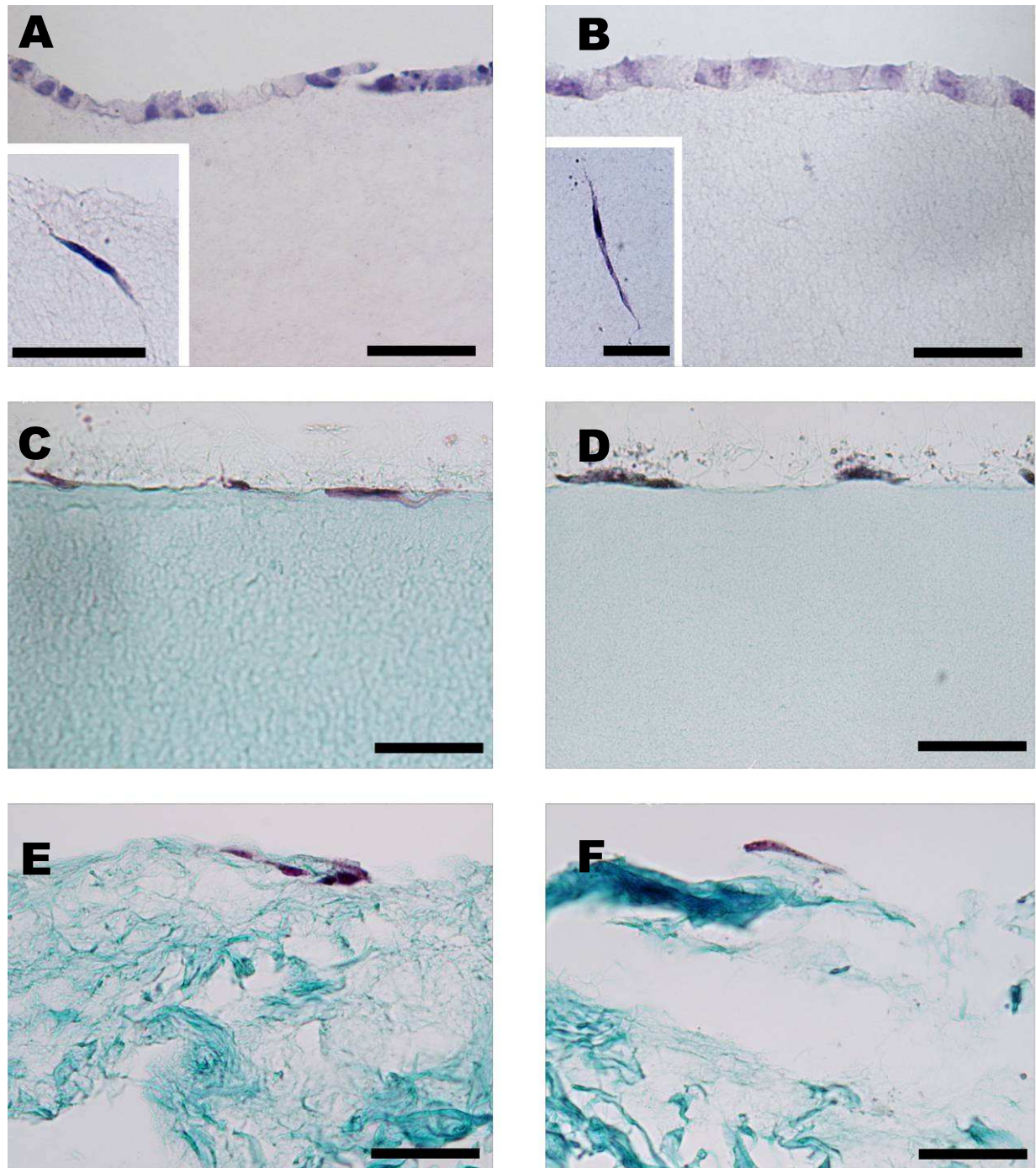


Figure 35: Vue sur coupe histologiques des ostéoblastes FHSO-6 à 7 et 28 jours sur les matrices fibrillaires et les éponges.

(A), (C) et (E) ostéoblastes après 7 jours de culture sur les matériaux de collagène. (B), (D) et (F) après 28 jours de culture. (A) et (B) matrices 5MG : les cellules apparaissent à la surface sous une forme carrée arrangées en une monocouche épithélioïde. Des cellules en fuseau bipolaire sont également observées dans la matrice (encarts). (C) et (D) matrices 40MG ; les ostéoblastes à la surface de ces matrices présentent une morphologie plate et allongée de cellules bordantes. (E) et (F) éponge ; même morphologie bordante adoptée par les cellules FHSO-6 à la surface des éponges. Barre 50µm, encart 25µm. Coloration (A-B) hémalum de Masson, (C-F) trichrome de Prenant.

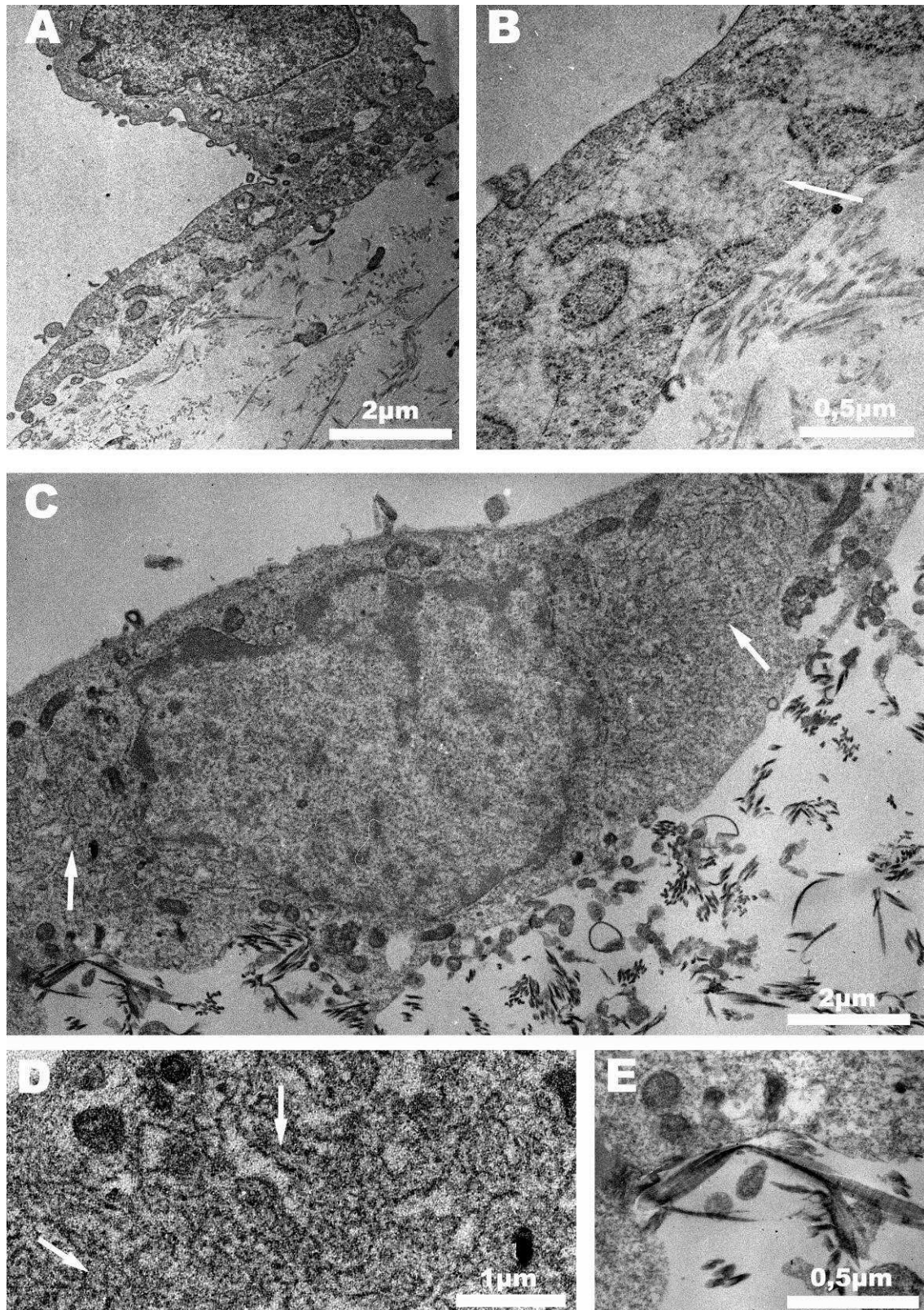


Figure 36 : Ultrastructure des cellules FHSO-6 sur les matrices 5MG à 7 et 28 jours de culture
(A) Après 7 jours, les cellules sont cubiques voir ovoïdes avec un large noyau et présentent de larges vésicules. **(B)** A un plus fort grandissement on visualise des éléments fibrillaires de ~10nm de diamètre dans les vésicules (flèche). **(C)** A 28 jours les cellules sont toujours en étroites interaction avec la matrice, le réticulum endoplasmique est développé de part et d'autre du noyau (flèches). **(D)** grandissement du RE observé en (C), les flèches indiquent la membrane associée aux ribosomes. **(E)** grandissement d'une zone d'interaction cellule – matrice observée en (C).
 Contraste (A-B) acétate d'uranyle et citrate de plomb, (C-E) acide phosphotungstique.

Evolution de la densité des cellules FHSO-6 sur les matériaux de collagène

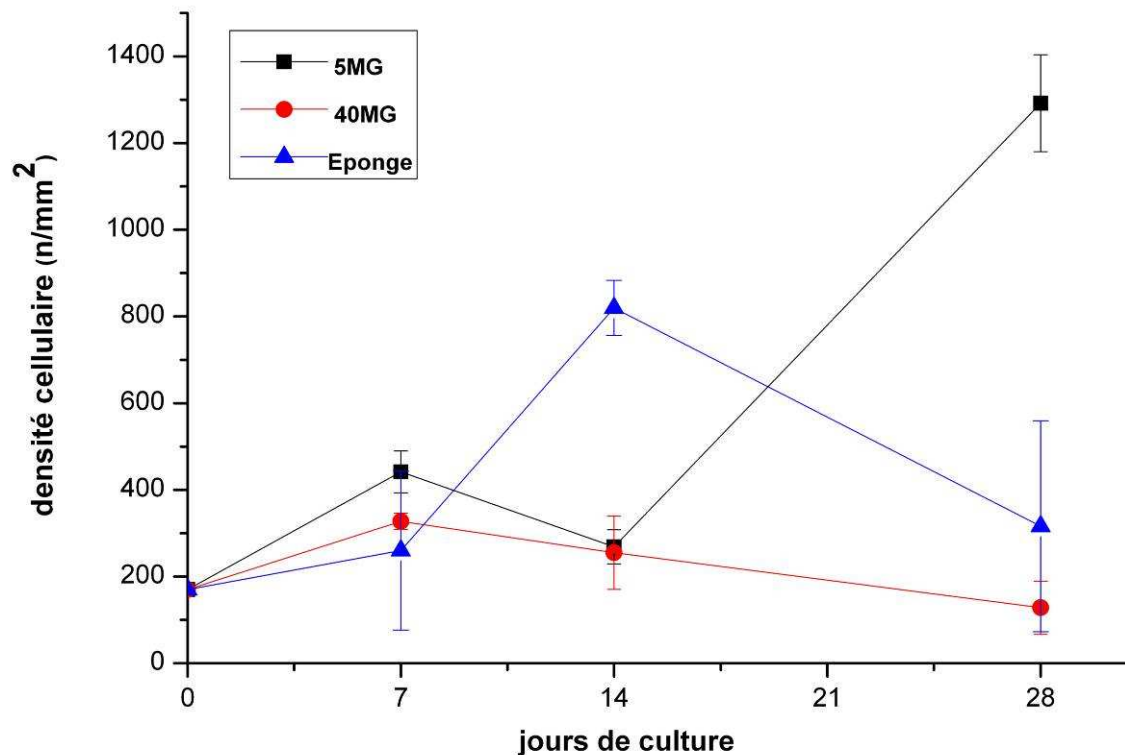


Figure 37 : Variations de la densité cellulaire sur les matrices 5MG, 40MG et les éponges pendant 4 semaines *in vitro*.

Au terme de l'expérimentation, on dénombre 6 fois plus de cellules sur les matrices 5MG et le taux de cellules FHSO-6 sur les éponges est ~2 fois supérieur à la densité initiale. Le nombre des cellules sur les matrices 40MG est resté plus ou moins constant pendant les 4 semaines.

Les cellules FHSO-6 adoptent à la surface des matrices 40MG une morphologie aplatie et allongée au cours des 28 jours de l'étude (figure 35 C et D). Ce type de morphologie suggère des cellules au repos et se rapproche de la morphologie des cellules bordantes décrites *in vivo*. Cette morphologie est confirmée par l'analyse ultrastructurale en MET (figure 38 A et B). Les cellules sont étalées sur plusieurs dizaines de micromètres et présentent de nombreuses mitochondries (figure 38 A, flèches). Le phénotype bordant semble être confirmé par l'absence de vésicules du réticulum endoplasmiques et par la présence de vésicules lipidiques de réserve (figure 38 A et B, petites flèches). Nous observons également une prolifération faible voire nulle des cellules sur ces matrices, la densité cellulaire à 28 jour étant similaire à la densité d'ensemencement initiale (figure 37). Aucune cellule n'a été observée à l'intérieur des matrices 40MG.

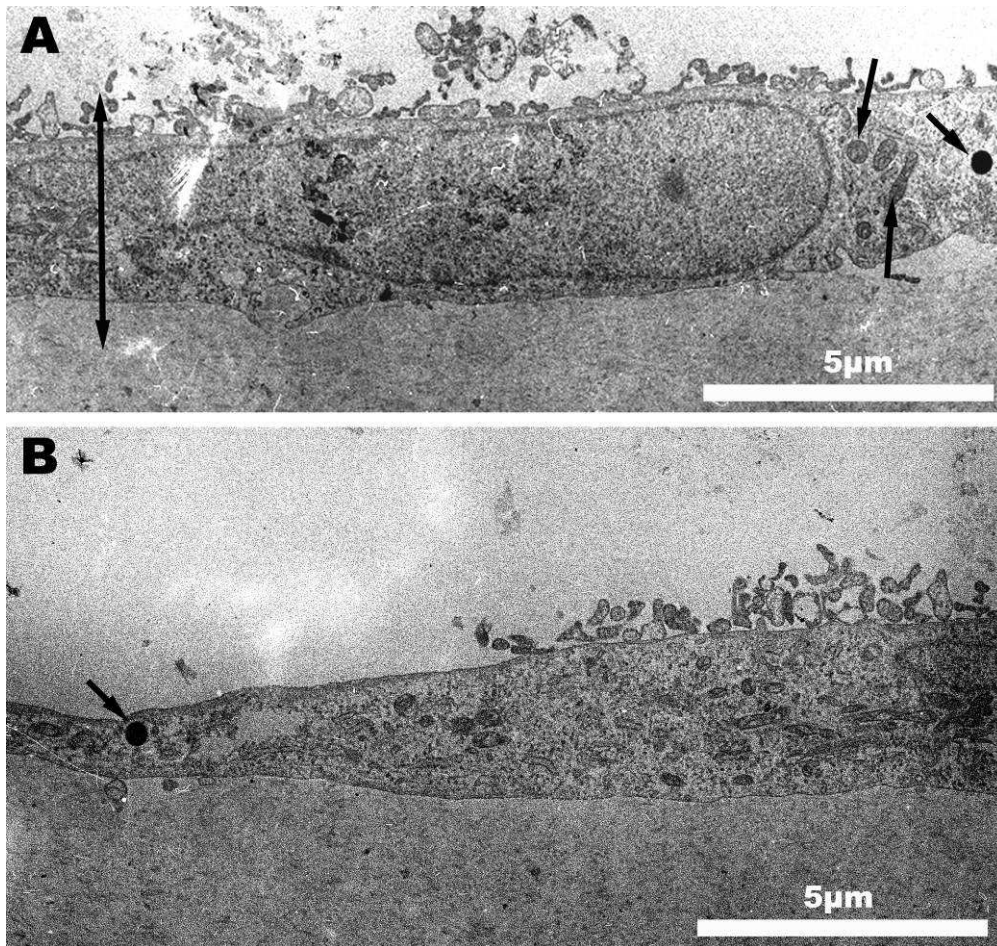


Figure 38 : Ultrastructure des cellules FHSO-6 sur les matrices 40MG à 7 et 28 jours de culture (A) et (B) Fragments consécutifs d'une même cellule FHSO-6 sur une matrice 40MG (double flèche : jonction A et B). Le corps cellulaire est étroit (~2,5µm), des mitochondries (flèches) et des vésicules lipidiques (petites flèches) sont présentes dans le cytoplasme. Contraste : acide phosphotungstique.

Ensemencées à la surface des éponges de collagène, les cellules FHSO-6 adoptent la même morphologie allongée et aplatie que celle observée sur les matrices 40MG (figure 35 E et F). En revanche on observe une forte prolifération cellulaire lors des deux premières semaines de culture, avec une densité cellulaire maximale à 14 jours de ~5 fois la densité initiale. La densité cellulaire diminue dans la deuxième partie de l'étude jusqu'à atteindre une densité de ~2 fois la densité initiale après 28 jours de culture (figure 37). Aucune cellule n'a été observée à l'intérieur des éponges et ce malgré la présence de nombreux et larges pores en leurs seins. La présence sur la face supérieure où les cellules ont été ensemencées d'un feuillet de collagène dense et homogène et sans apparente connexion avec le reste de l'éponge semble avoir stoppé l'évolution des ostéoblastes dans le volume de l'éponge (cf. chapitre I, figures 29 et 32).

b) Lignée primaire d'ostéoblastes humains (cellules F27)

Les caractéristiques morphologiques décrites pour les ostéoblastes de la lignée FHSO-6 sont également observées avec la lignée primaire F27 (figure 39). En effet les ostéoblastes de cette lignée ensemencés sur les matrices 5MG présentent une morphologie cubique avec un large noyau et s'arrangent entre eux en une monocouche de type épithéliale (figure 39 A et B, et encart A). A nouveau, l'étude ultrastructurale de ces cellules confirme les données morphologiques de l'histologie (figure 40 A). Elle démontre également la présence d'une synthèse protéique active par la présence d'un réticulum endoplasmique (figure 40 B) et d'un système golgien extrêmement développé (figure 40 C).

Les ostéoblastes primaires adoptent une morphologie de cellules bordantes à la surface des matrices 40MG et des éponges comme observé précédemment avec les cellules de la lignée transformée. De nouveau aucune cellule n'a été observée à l'intérieur des matrices 40MG, ni des éponges.

Des cellules F27 ont pénétré dans les matrices 5MG comme observé avec la lignée FHSO-6 mais présentent une morphologie plus complexe que ces dernières. En effet, à défaut d'une morphologie bipolaire, les cellules F27 à l'intérieur des matrices 5MG présentent plusieurs prolongements, plus ou moins longs, qui donnent à ces cellules un profil dendritique (figure 39 A et B, et encart B). La présence de nombreux et longs prolongements dans différentes directions de l'espace évoque de façon troublante les caractéristiques morphologiques des cellules osseuses enchâssées dans l'os : les ostéocytes. Ainsi une étude particulière sur les cellules F27 dans les matrices fibrillaires a été réalisée et sera présentée au cours du chapitre IV.

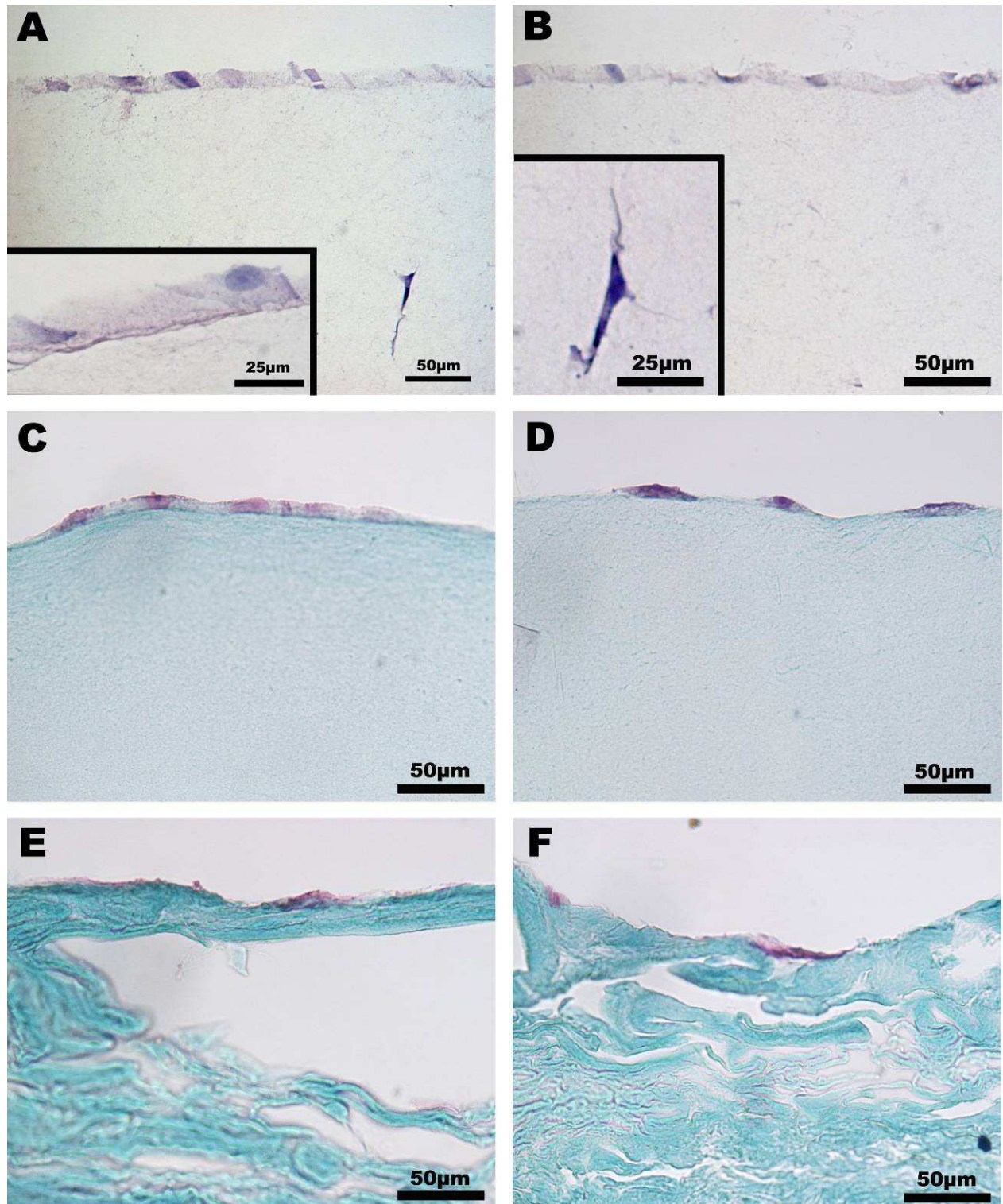


Figure 39: Vue sur coupes histologiques des ostéoblastes primaires à 7 et 28 jours

(A), (C) et (E) cellules F27 à 7 jours de cultures. (B), (D) et (F) cellules F27 à 23 jours de cultures. (A) et (B) matrices 5MG ; en surface, les cellules sont de morphologie ostéoblastique sur la durée de l'expérimentation. Des cellules dans la matrice présentent plusieurs prolongements fins ($n \geq 3$). (C) et (D) matrices 40MG ; les ostéoblastes à la surface de ces matrices présentent une morphologie plate et allongée. (E) et (F) éponge ; les cellules F27 présentent également une morphologie de cellule bordante.

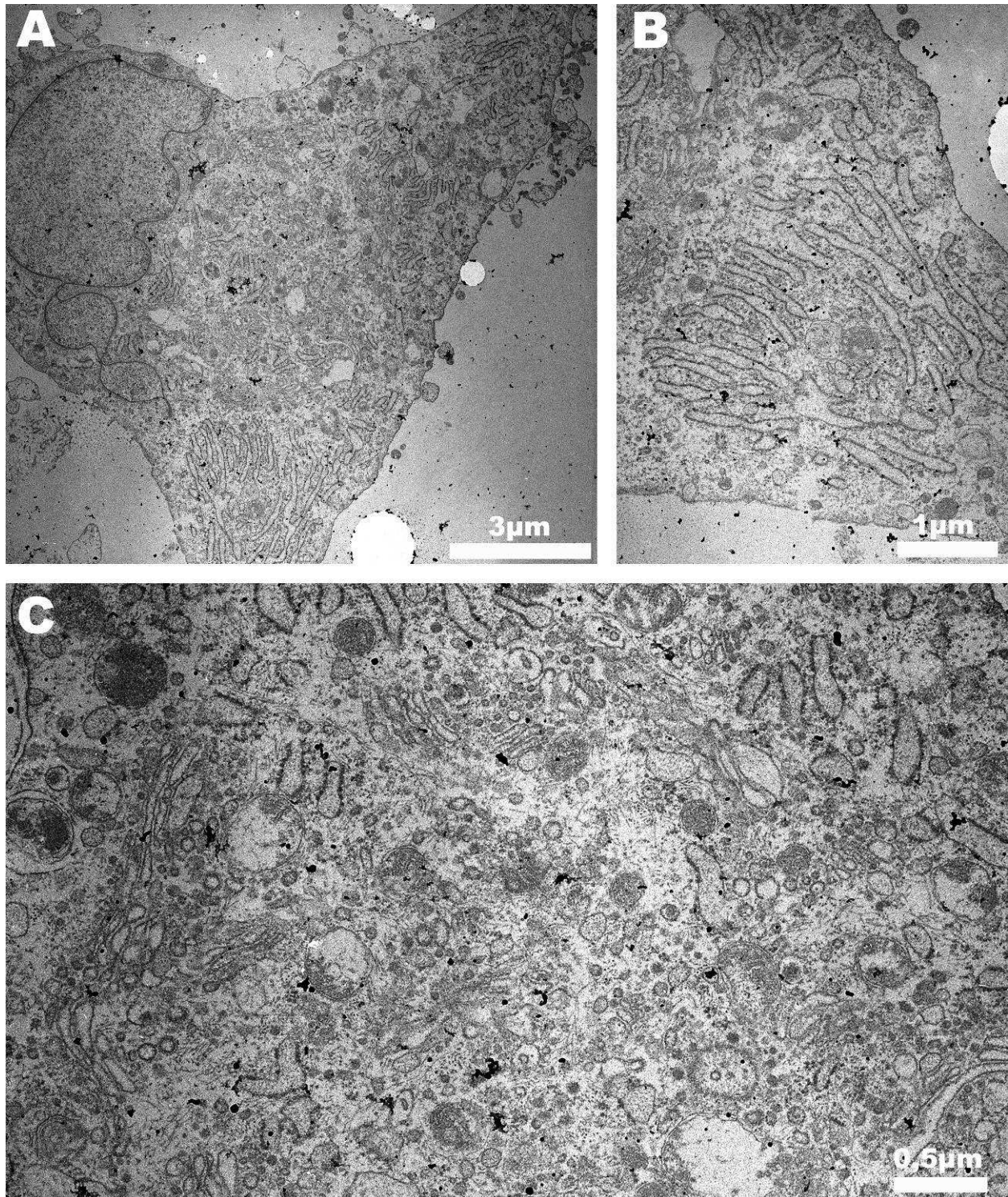


Figure 40 : Ultrastructure des cellules F27 sur les matrices 5MG à 7 jours.

(A) cellule de morphologie ostéoblastique présentant une structure cubique avec un large noyau et de nombreux organites intracellulaires. (B) Réticulum endoplasmique granulaire développé en connexion avec des saccules golgiens. (C) Nombreux systèmes vésiculaires autour des saccules golgiens. L'ensemble de ces observations suggère une cellule en court de synthèse de protéines à destinée de l'espace extra cellulaire. Contraste : acétate d'uranyle et citrate de plomb.

2. Minéralisation des matrices en présence d'ostéoblastes

Dans leur contexte physiologique, les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse puis participent à sa minéralisation subséquente avec la présence d'un retard entre le front de synthèse du tissu ostéoïde et le front de minéralisation. Bien que les acteurs moléculaires de la minéralisation de la matrice osseuse soient à ce jour mal connus, les ostéoblastes jouent une part active dans ce processus. Ainsi, un des critères classiques de la confirmation du phénotype ostéoblastique *in vitro* est la mise en évidence de précipités de phosphate de calcium lorsqu'une source de phosphate est ajoutée au milieu de culture. De tels précipités peuvent être révélés par la coloration de von Kossa ou par le rouge Alizarine.

a) Lignée d'ostéoblastes humains transformés (cellules FHSO-6)

Après 28 jours de culture des cellules FHSO-6 sur les trois matériaux de collagène, la coloration von Kossa entraîne l'apparition d'un intense précipité noir, témoin de la présence de sels de calcium (figure 41). La coloration est observée sur l'intégralité de la section (~2mm) des coupes des matrices 5MG et 40MG, avec une diminution graduelle de la face supérieure à la face inférieure (figure 41 A et C). On remarque également que le précipité semble plus fin et plus dense sur les matrices 40MG que sur les matrices 5MG où il apparaît plus éparse et grossier (figure 41 A et C, encarts). En revanche, sur les éponges de collagène le minéral n'est détecté que sur une centaine de micromètre de profondeur (figure 41 E).

Observé par MET, on constate que les différences de distribution des précipités entre les matrices 5MG et 40MG sont directement liées à la densité en collagène du matériau (figure 42 A et C). Le minéral est concentré dans et autour des fibrilles de collagène et n'est pas retrouvé dans les espaces libres entre fibrilles. Les éponges de collagène présentent des zones denses aux électrons qui témoignent de la présence de minéral. Celles-ci apparaissent dispersées à l'intérieur et aux bords des murs de collagène mais absentes des pores (figure 42 D). A plus fort grandissement, les dépôts minéraux au sein des matrices 5MG ont l'aspect de fines aiguilles agglomérées dans et autour des fibrilles (figure 42 B). Il est par contre difficile de dissocier une quelconque structure du minéral dans les matrices 40MG et les éponges (figure 42 D et F). Pour ces deux matériaux, la phase minérale semble posséder une structure amorphe, se distinguant du matériel organique par sa forte densité aux électrons.

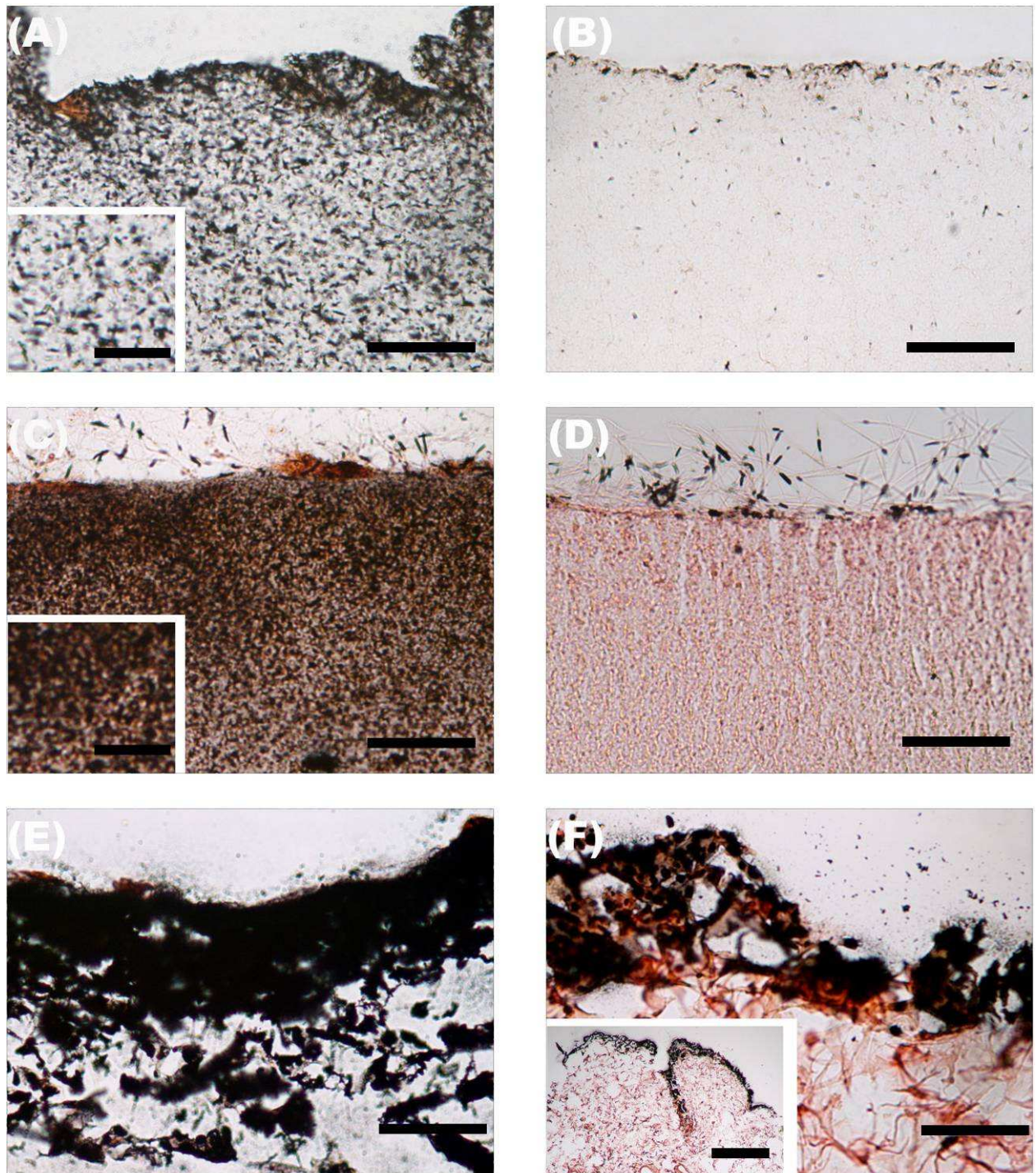


Figure 41 : coloration von Kossa des matériaux après 28 jours avec et sans cellules FSHO-6.

(A, C, E) Matrices et éponges en culture avec les cellules. (B, D et F) Matrice et éponges sans cellules. La forte coloration noire révèle la présence de dépôts minéraux à la surface et sur la section de coupe des matrices 5MG (A), matrices 40MG (C) et des éponges (E). Le précipité semble plus fin et plus dense sur les matrices 40MG que sur les matrices 5MG où il apparaît plus épars et grossier (encart A et C). En absence de cellules les matrices 5MG (B) et 40MG (D) ne présentent qu'une coloration superficielle non spécifique alors que les éponges présentent un dépôt noir intense sur l'intégralité de leur surface (F) et encart. Barre : 50 μ m ; encarts (A et B) : 25 μ m ; encart (F) 0,5mm.

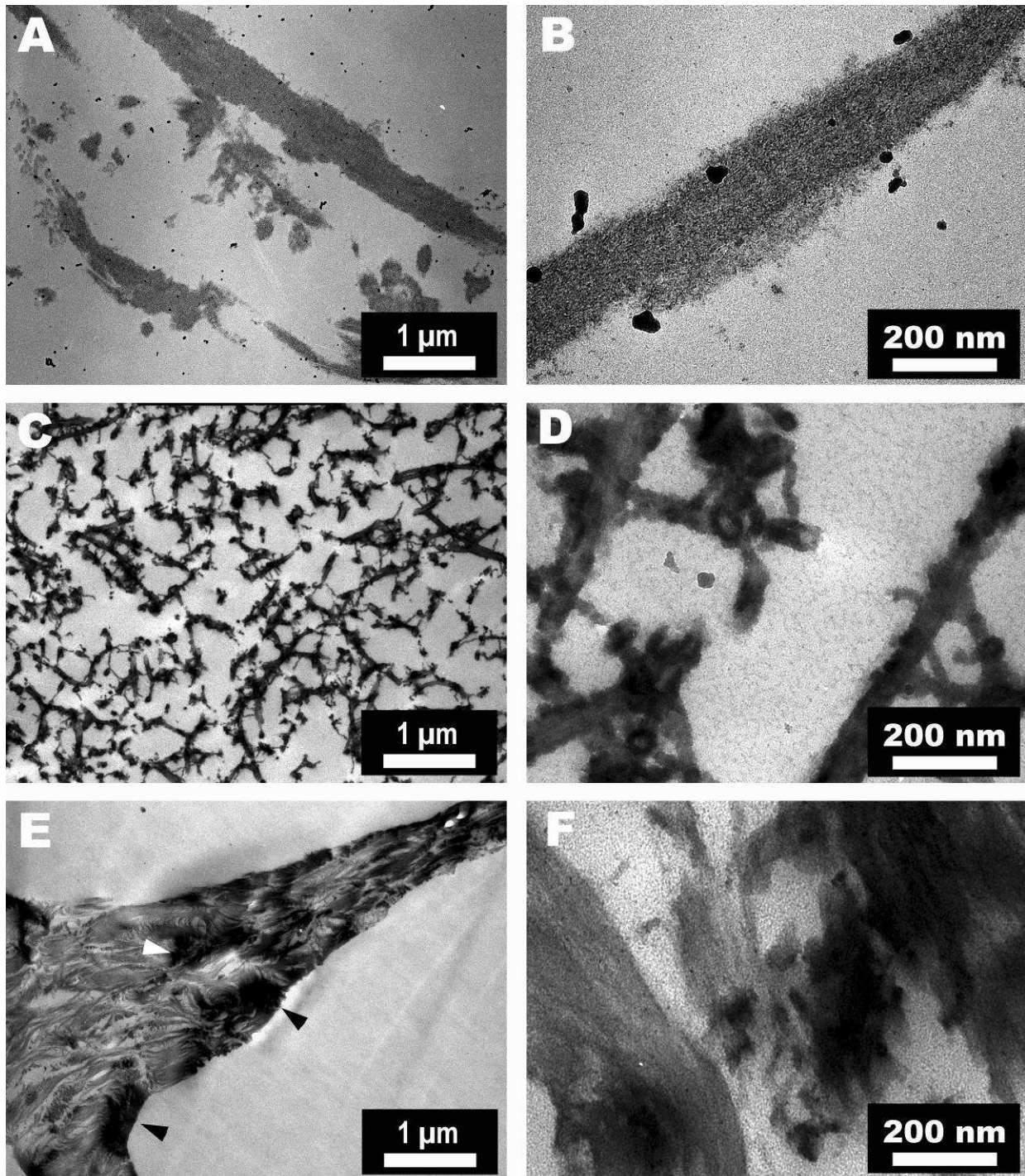


Figure 42 : Ultrastructure des matrices et des éponges minéralisées en présence de cellules. (A) et (B) matrice 5MG ; les dépôts minéraux sont exclusivement retrouvés dans et autour des fibrilles qu'ils recouvrent complètement. A plus fort grandissement on voit apparaître la striation transverse des fibrilles recouverte par le minéral qui présente une structure de fines aiguilles. (C) et (D) matrice 40MG ; le minéral recouvre l'intégralité des fibrilles de collagène mais il présente une structure plus émoussée et moins bien définie. (E) et (F) éponge ; le minéral est présent sous la forme de zones denses aux électrons et distribué en amas dans le feuillet de l'éponge. La structure, à fort grandissement, apparaît comme sur les matrices 40MG sans forme particulière.

Des matrices contrôles, vierges de toutes cellules, ont été soumises aux mêmes conditions (milieu de culture, temps d'incubation à 37°C) que cellesensemencées par les cellules FHSO-6. En absence de cellules, les coupes histologiques des matrices 5MG et 40MG colorées au von Kossa présentent un très léger et superficiel dépôt noir à leur surface (figure 41 B et D). Ainsi, il est possible de conclure que la minéralisation observée sur ces matrices en présence d'ostéoblastes est directement liée à l'activité des cellules.

A l'inverse, un fort précipité noir est observé sur toute la surface des éponges en absence de cellules (figure 41 F et encart). Les éponges de collagène ont donc la capacité intrinsèque de minéraliser en présence de phosphate inorganique sans contribution cellulaire. La différence d'intensité de la coloration von Kossa entre les éponges avec ou sans cellules semble démontrer tout de même une activité de minéralisation des cellules FHSO-6 sur ce type de support.

b) Lignée primaire d'ostéoblastes humains: cellules F27

Après 23 jours de culture des ostéoblastes primaires sur les matériaux de collagène la coloration von Kossa révèle la présence de précipités calciques sur les matrices 5MG et les éponges mais pas sur les matrices 40MG (figure 43). Comme décrit précédemment, nous observons la précipitation de minéral sur les éponges même en absence de cellules, ce qui rend à nouveau difficile l'évaluation de l'activité de minéralisation des cellules F27 sur les éponges de collagène.

Le dépôt de minéral en présence des cellules primaires sur les matrices 5MG apparaît uniquement en surface (figure 43 A) alors qu'il était observé sur l'intégralité de la section avec la lignée transformée. Il est cependant plus important que le bruit de fond de la coloration observée en absence de cellules sur ces mêmes matrices. La culture des cellules F27 sur les matériaux de collagène a été réalisée sur 23 jours, soit 5 jours de moins que celle avec les cellules de la lignée transformée. Cette différence de cinétique peut expliquer les différences de résultats de minéralisation entre les deux lignées sur les matrices 5MG et 40MG. Ces différences peuvent également s'expliquer par une différence de métabolisme entre les cellules FHSO-6 et F27. Quoiqu'il en soit, la présence de minéral sur les matrices 5MG est en adéquation avec la morphologie des cellules primaires à leur surface et confirme leur phénotype ostéoblastique.

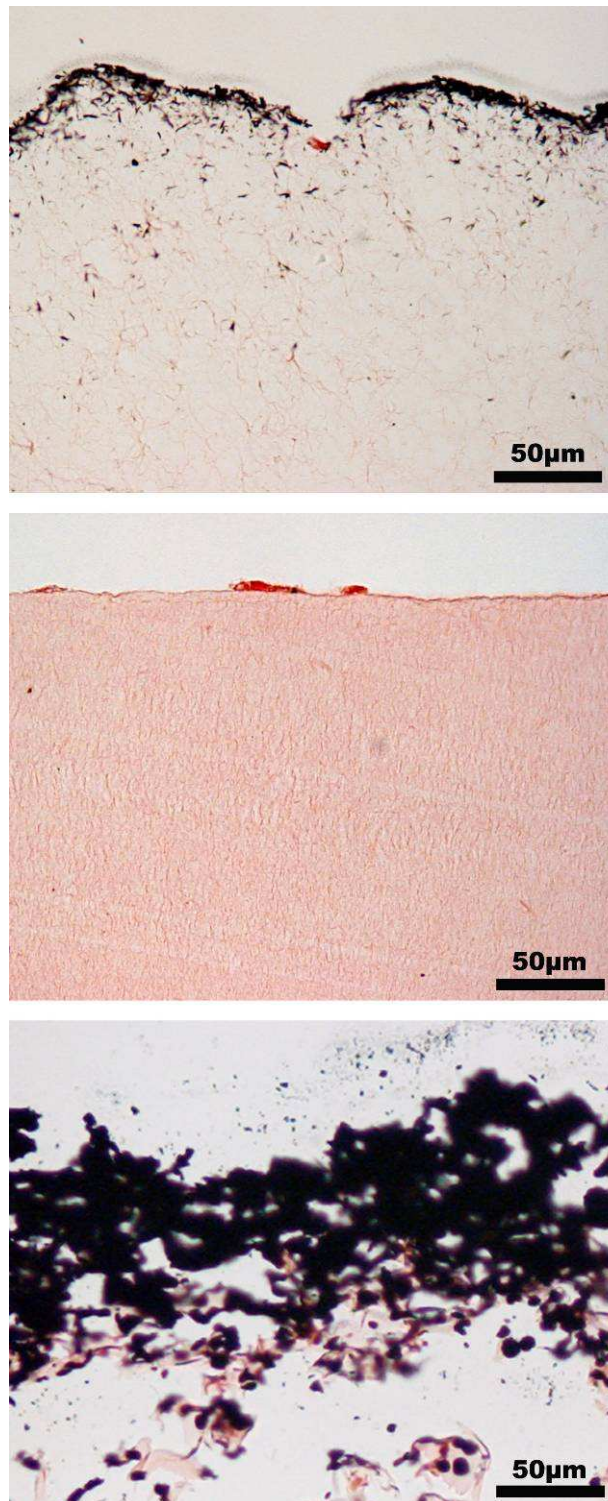


Figure 43 : coloration von Kossa des matériaux après 23 jours avec et sans cellules F27.

(A) matrice 5MG ; après 23 jours en culture avec les cellules F27 on observe un dépôt de colorant à la surface des matrices. **(B)** matrice 40MG ; au terme de l'expérimentation les cellules F27 n'ont pas minéralisé les matrices 40MG. **(C)** éponge ; la coloration von Kossa apparaît la plus intense sur les éponges mais une part est due à la précipitation passive du minéral indépendante de l'action des cellules (cf. contrôle sans cellules figure 41 F).

3. Expression des marqueurs moléculaires ostéoblastiques

a) Expression de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une protéine membranaire dont le niveau d'expression augmente avec le degré de maturité des ostéoblastes. Cette protéine constitue donc un marqueur de choix, classiquement utilisé pour mettre en évidence la différenciation ostéoblastique. Sur l'ensemble des 4 semaines de culture la présence de la phosphatase alcaline n'a pas pu être mise en évidence pour les cellules FHSO-6 cultivées sur les matrices 40MG et les éponges. Les ostéoblastes sur les matrices 5MG n'expriment la phosphatase alcaline qu'à partir de la 4^e semaine de culture (figure 44). D'un point de vue chronologique, la présence de phosphatase alcaline à la membrane des cellules FHSO-6 sur les matrices 5MG est concomitante avec la minéralisation décrite précédemment. A l'inverse, la minéralisation des matrices 40MG et des éponges a été réalisée par les ostéoblastes sans expression de la phosphatase alcaline.

b) Expression du collagène de type I

Les ostéoblastes sont les cellules qui synthétisent la matrice osseuse, et de ce fait sont des cellules spécialisées dans la synthèse de collagène de type I. Cependant, il n'a pu être montré d'expression de collagène I par les cellules FHSO-6 ni les cellules F27 cultivées sur les matrices ou sur les éponges de collagène. En revanche, cultivées à confluence pendant 14 jours sur boîte de pétri, on détecte par immunomarquage la présence de molécules de collagène I autour des cellules. Il existe donc un phénomène d'inhibition de la synthèse de collagène pour les cellules cultivées sur des matériaux de collagène. Ainsi, les larges vésicules observées en MET à l'intérieur des cellules FHSO-6 cultivées sur les matrices 5MG qui contenaient des éléments fibrillaires d'environ 10nm (figure 36 B) pourraient correspondre à des molécules de collagène en rétention dans le réticulum endoplasmique.

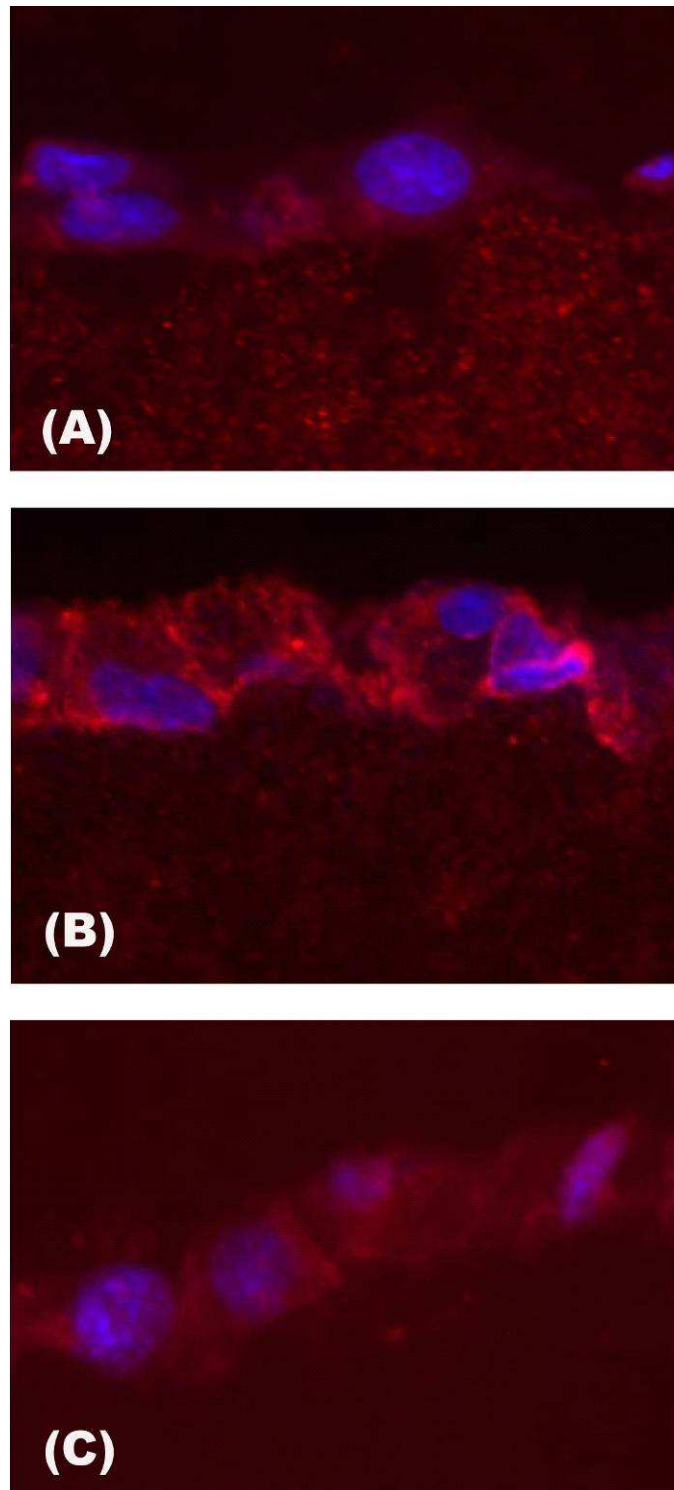


Figure 44 : Expression de la phosphatase alcaline par les ostéoblastes à la surface des matrices 5MG.

(A) 7 jours ; à ce stade de culture les cellules FHSO-6 n'expriment pas la phosphatase alcaline. **(B)** 28 jours ; après 4 semaines sur les matrices 5MG on observe un marquage positif de la phosphatase alcaline au niveau de la membrane plasmique des cellules. **(C)** contrôle négatif sans anticorps primaire. Les noyaux ont été colorés au DAPI.

4. Conclusions

Cette étude *in vitro* à long terme a permis de révéler les propriétés ostéoconductrices des matrices 5MG. Sur ce matériau, les ostéoblastes primaires et transformés adoptent leur organisation et morphologie épithélioïde caractéristique. Les cellules provoquent la minéralisation des matrices 5MG au cours de la 4^e semaine de culture. Dans la même période, les ostéoblastes transformés expriment la phosphatase alcaline à la surface de leurs membranes plasmiques.

Les matrices de collagène les plus concentrées apparaissent moins favorable au développement de cellules ostéoblastiques *in vitro*. Les cellules des deux lignées sont restées aplaties et allongées à la surface des matrices 40MG, en une morphologie de cellules bordantes très faiblement proliférative. Les analyses immunohistologiques n'ont pas pu révéler l'expression de l'ALP ou la synthèse de collagène de type I sur ce support. En revanche, les cellules FHSO-6 ont minéralisé les matrices concentrées après 28 jours de culture. Toutefois, ces mêmes résultats sont également obtenus avec les cellules cultivées sur les éponges de collagène auquel on doit ajouter leur minéralisation en l'absence de cellules.

Nous avons également constaté que les cellules primaires et transformées étaient capables de pénétrer dans les matrices les moins concentrées alors qu'elles n'ont été observées qu'à la surface des matrices 40MG et des éponges. Leur entrée dans le réseau fibrillaire des matrices 5MG s'accompagne d'un changement de morphologie. Les cellules FHSO-6 apparaissent sous la forme de fuseaux bipolaires tandis que les cellules primaires présentent plusieurs excroissances cytoplasmiques autour du corps cellulaire. Le chapitre IV sera consacré à la description et l'analyse des ostéoblastes à l'intérieur des matrices fibrillaires.

L'ensemble de ces résultats semble privilégier l'utilisation des matrices 5MG au dépend des matrices 40MG comme matériau de substitution osseuse. Bien qu'ayant démontré *in vitro* des capacités ostéoconductives faibles, les matrices 40MG ne sont pas apparues délétères pour les ostéoblastes, aussi bien transformés que primaires, et ont permis leur minéralisation. La profusion de cellules et de facteurs stimulant leur prolifération et leur différenciation que l'on trouve dans un contexte *in vivo* laisse espérer un comportement différent de ces matrices une fois implantées chez l'animal. Nos espoirs se verront justifiés

dans le prochain chapitre où les matrices 5MG et 40MG seront implantées dans un model de craniotomie chez le rat.

Chapitre III

Essai *in vivo* de réparation osseuse dans un modèle de craniotomie chez le rat

Lors des chapitres précédents nous avons caractérisé la structure des matrices fibrillaires à différentes échelles et décrit l'influence de leur organisation structurale sur le phénotype de deux lignées d'ostéoblastes humains. L'augmentation de la concentration en collagène des matrices leur apporte une structure plus complexe et augmente leurs propriétés mécaniques. En revanche, les études de cultures *in vitro* montraient une diminution des capacités ostéoconductive des matrices avec l'augmentation de leur concentration.

La culture de cellules *in vitro* sur des matériaux à destinée clinique n'est pas un prérequis mais un préalable à leur essai chez l'animal. Elle permet d'obtenir, pour des conditions précises et contrôlées, des informations sur les capacités de guidage cellulaire du matériau, mais ces conditions sont *de facto* très limitées par rapport à l'ensemble des facteurs que les matériaux rencontrent lorsqu'ils sont implantés dans un animal. Les propriétés de réparation osseuse des matrices fibrillaires 5MG et 40MG ont été évaluées dans un modèle standardisé de craniotomie chez le rat.

L'expérimentation a été réalisée dans l'équipe du Pr Jean Louis Saffar à la faculté de chirurgie dentaire de Montrouge, en collaboration avec le Dr Marie-Laure Colombier. Un défaut de 5mm de diamètre a été réalisé sur la suture sagittale, au centre de l'os pariétal de rats mâles adultes. Divisés en trois groupes de huit rongeurs, le défaut osseux créé est comblé par les matrices 5MG ou 40MG ou laissé vide (sham). Les rats sont sacrifiés après 4 semaines et la réparation de la plaie est évaluée par densitométrie aux rayons X et sur coupes histologiques.

1. Analyse de la minéralisation du défaut par DEXA

La minéralisation des défauts est analysée par DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry), après fixation des explants de calvaria contenant le défaut osseux et avant leur inclusion pour l'histologie. Les échantillons sont placés à plat sur leur face externe et balayés par un faisceau de rayons X. Cette technique donne une image X de l'échantillon et détermine la distribution territoriale des tissus mous et du tissu minéralisé ce qui offre une première évaluation du comblement du défaut. Deux explants représentatifs de chaque groupe sont présentés sur la figure 45. Ils sont visualisés sur leur face endocrânienne à travers une loupe binoculaire ou par DEXA. Le logiciel de l'appareil de DEXA délimite le tissu minéralisé entre les lignes jaunes (cf. Matériels et Méthodes figure 28). L'ensemble des tissus (osseux, charnu, adipeux...) sans distinction est délimité par les lignes bleues intérieures et extérieures.

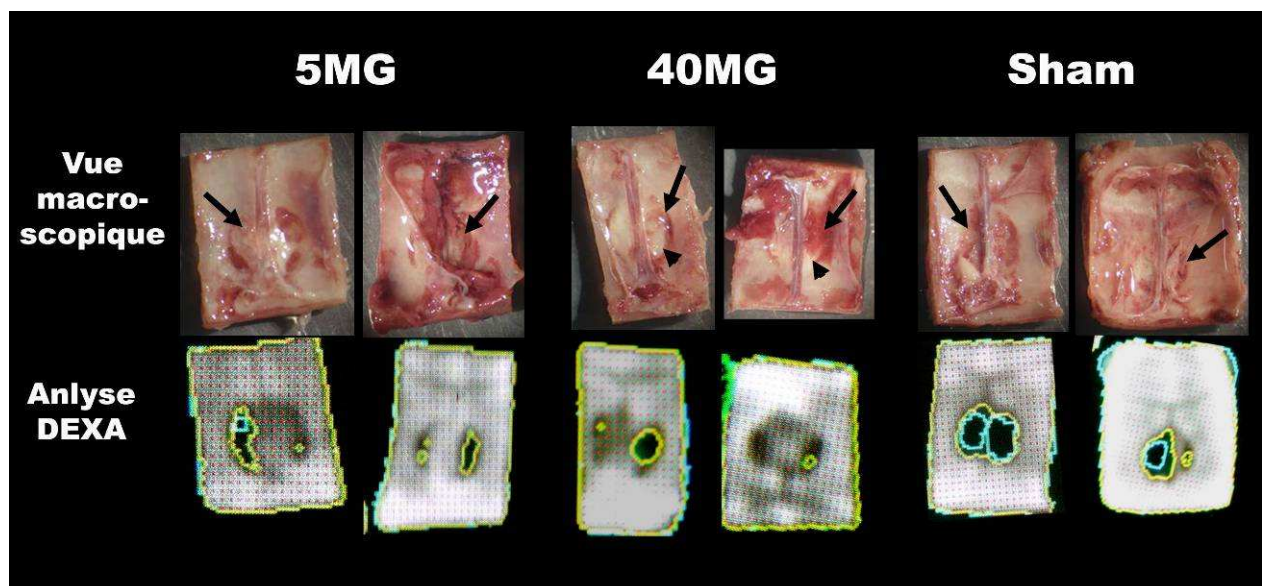


Figure 45 : Vue macroscopique des explants et territorialisation des tissus par DEXA

Deux échantillons représentatifs de chaque groupe sont visualisés sur leur face endocrânienne à travers une loupe binoculaire ou par DEXA. L'empreinte du défaut est visible sur la vue macroscopique des explants. On distingue la masse blanche des matrices 40MG dans le défaut. Les images de DEXA montrent une minéralisation du défaut plus importante avec les matrices fibrillaires qu'avec les shams.

Sur la vue macroscopique on observe encore l'empreinte du défaut (flèches), comblée partiellement dans son épaisseur et surmontée par le sinus veineux. Les matrices 40MG sont encore visibles dans la plaie et distinguables du reste de l'explant (têtes de flèche).

Les images DEXA sont différentes entre les matériaux et les shams. Ces derniers donnent des résultats disparates, et pour les exemples de la figure 45 ils présentent, au mieux,

du tissu osseux sur une seule moitié de la plaie, l'autre partie étant constituée de tissu mou ou considérée vierge de tout tissu. Avec l'introduction des matrices 5MG et 40MG le défaut apparaît comblé au centre, sur le trajet du sinus veineux. Latéralement, la minéralisation du défaut est plus hétérogène, pouvant être partiellement ou totalement minéralisée. Des zones (intérieur des lignes bleues) sont décrites par le logiciel de DEXA comme n'étant ni du tissu mou (adipeux ou charnu) ni du tissu minéralisé. Ces zones sont donc « transparentes » aux rayons X et sont observées avec les matrices 5MG et les shams et pas avec les matrices 40MG. Ces différences peuvent être due à la forte concentration en collagène des matrices 40MG qui sont plus denses et donc qui absorbent plus les rayons X que les matrices 5MG. Une identification de ces zones sera plus aisée sur coupes frontales des explants.

Une analyse chiffrée de la surface de tissu minéralisé (figure 46) et de la densité en minéral (figure 48) dans le défaut a été réalisée à partir des données DEXA. La surface de tissu minéralisé mesurée dans le défaut a été rapportée à la surface totale mesurée pour donner le pourcentage de comblement du défaut (figure 47). Contraint par le logiciel de l'appareil de mesure, les données mesurées ne correspondent pas exactement à la surface du défaut (*i.e.* : un disque de 5mm de diamètre) mais au carré exclu (carré ext.) et inclus (carré int.) au défaut (cf. Matériels et Méthodes, figure 28).

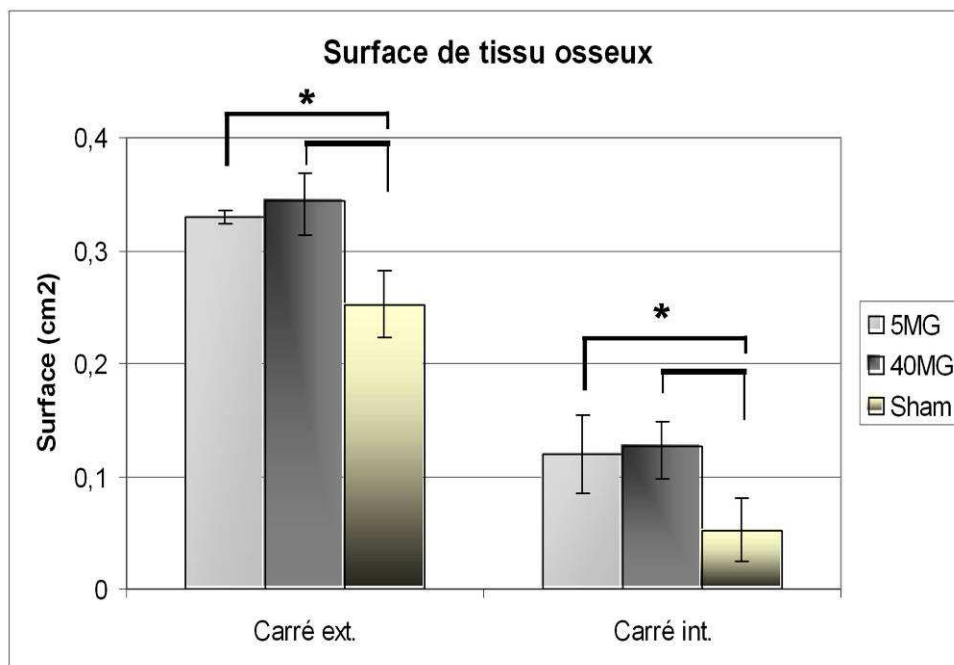


Figure 46 : Surface osseuse (bone area) détectée par DEXA dans le défaut

L'appareil de DEXA mesure la surface de tissu détectée comme de l'os dans les ROI externes (carré ext.) et internes (carré int.) analysées. Les trois groupes sont comparées deux à deux par un test t de Student et définis comme significativement différents pour $p < 0,001$.

Les profils de la surface osseuse (*bone area*) sont similaires dans les limites internes et externes du défaut (figure 46), seules les valeurs absolues sont différentes et majorées dans le carré externe par rapport au carré interne par l'os endogène de l'animal. L'introduction des matrices dans la plaie entraîne de façon significative ($p < 0,001$) une réparation de la lésion plus importante que la réparation spontanée observée pour le groupe d'animaux contrôle. Rapporté à la surface étudiée (figure 47), le comblement de la plaie par de l'os néoformé avec l'introduction des matrices représente plus de 90% dans les limites externes et plus de 80% dans les limites internes alors qu'en l'absence de matériaux un comblement de seulement 36,7% (+/- 19,7) est obtenu dans les limites internes du défaut. La surface d'os néoformé est légèrement supérieure avec les matrices 40MG par rapport aux matrices 5MG, mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

La densité en minéral dans la partie interne du défaut varie de façon décroissante entre les matrices 5MG, 40MG et les shams sans que ces différences ne soient significatives statistiquement (figure 48). La mesure de la densité en minérale dans le carré ext. nivelle intégralement ces différences.

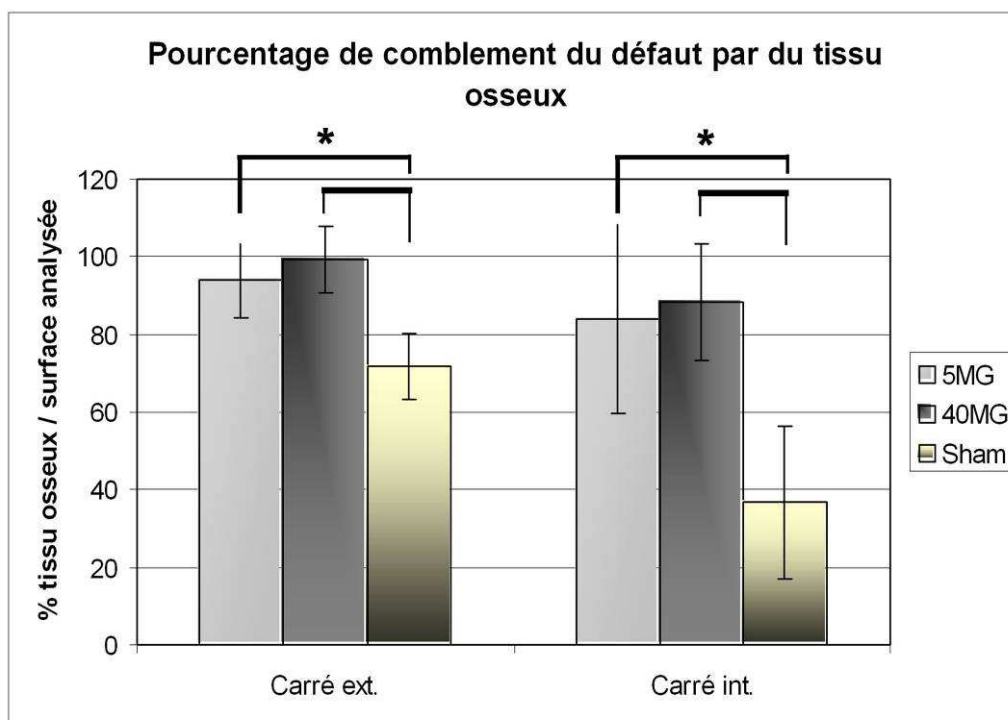


Figure 47 : Pourcentage de comblement du défaut par de l'os

La surface d'os détectée dans la ROI est rapportée à sa surface totale. Les pourcentages de chaque groupe sont comparés deux à deux par un test t de Student et définis comme significativement différents pour $p < 0,001$.

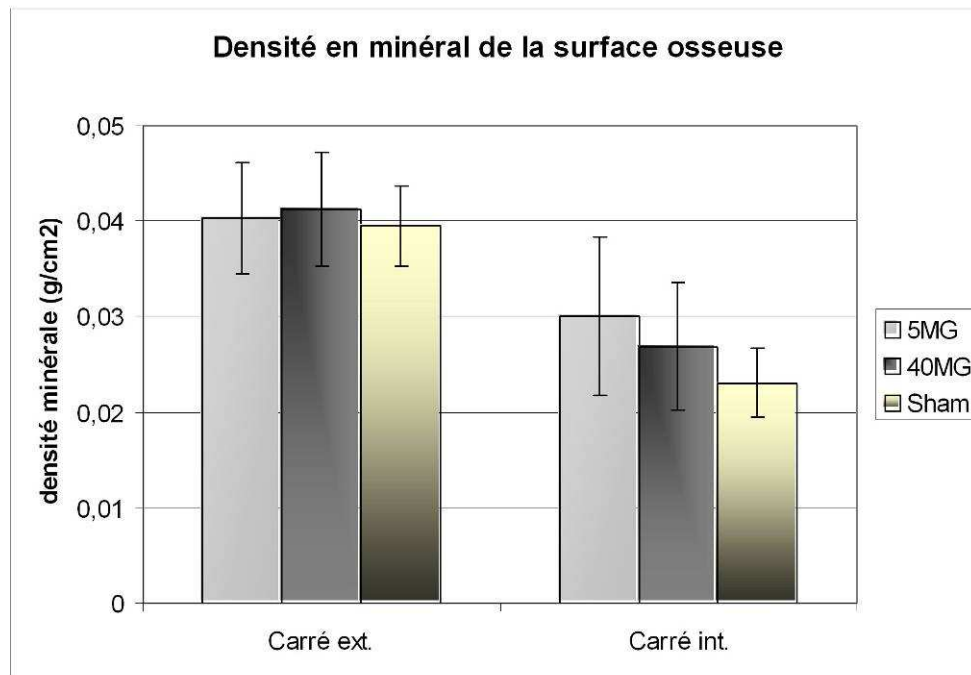


Figure 48 : Densité en minéral dans le tissu osseux néoformé

La densité en minéral diminue progressivement entre les matrices 5MG, 40MG et les shams au centre de l'implant. L'os endogène du rat entraîne une augmentation d'au moins 30% de la densité et nivelle les valeurs entre les trois groupes.

L'ensemble de ces résultats indique donc que la réparation a été influencée par les différents traitements, non seulement dans l'étendue du comblement de la lésion, mais également, comme le suggère les résultats de densité de minéral, dans la nature du tissu synthétisé. Une analyse des échantillons en coupe histologique nous permettra de conclure sur ces résultats.

2. Observations morphologiques

Sur coupes frontales, la différence entre les shams (figure 49 A) et les groupes 5MG (B) et 40MG (C) est visible à faible grossissement. Pour chaque groupe, la plaie est délimitée dans sa partie inférieure et médiane par le large sinus veineux (S) et sur les côtés par les berges osseuses de la calvaria trépanée (*). Le défaut est comblé par du tissu cicatriciel de type conjonctif fibreux riche en cellules fibroblastiques.

La plaie des shams est comblée dans toute sa section par du tissu cicatriciel lâche dans lequel baignent des nodules osseux de petites tailles et isolés dans le tissu conjonctif (figure 49 A ; têtes de flèche). Au cœur de la plaie, enchâssés dans le tissu cicatriciel, on trouve les résidus des matrices 5MG et 40MG, qui ont conservé leur forme cylindrique. Les deux matrices n'ont

pas été intégralement remaniées, le matériau original est encore largement visible au cœur et sur les côtés des matrices 5MG et dans toute la partie supérieure des matrices les plus concentrées (40MG) (figure 49 B et C ; flèches).

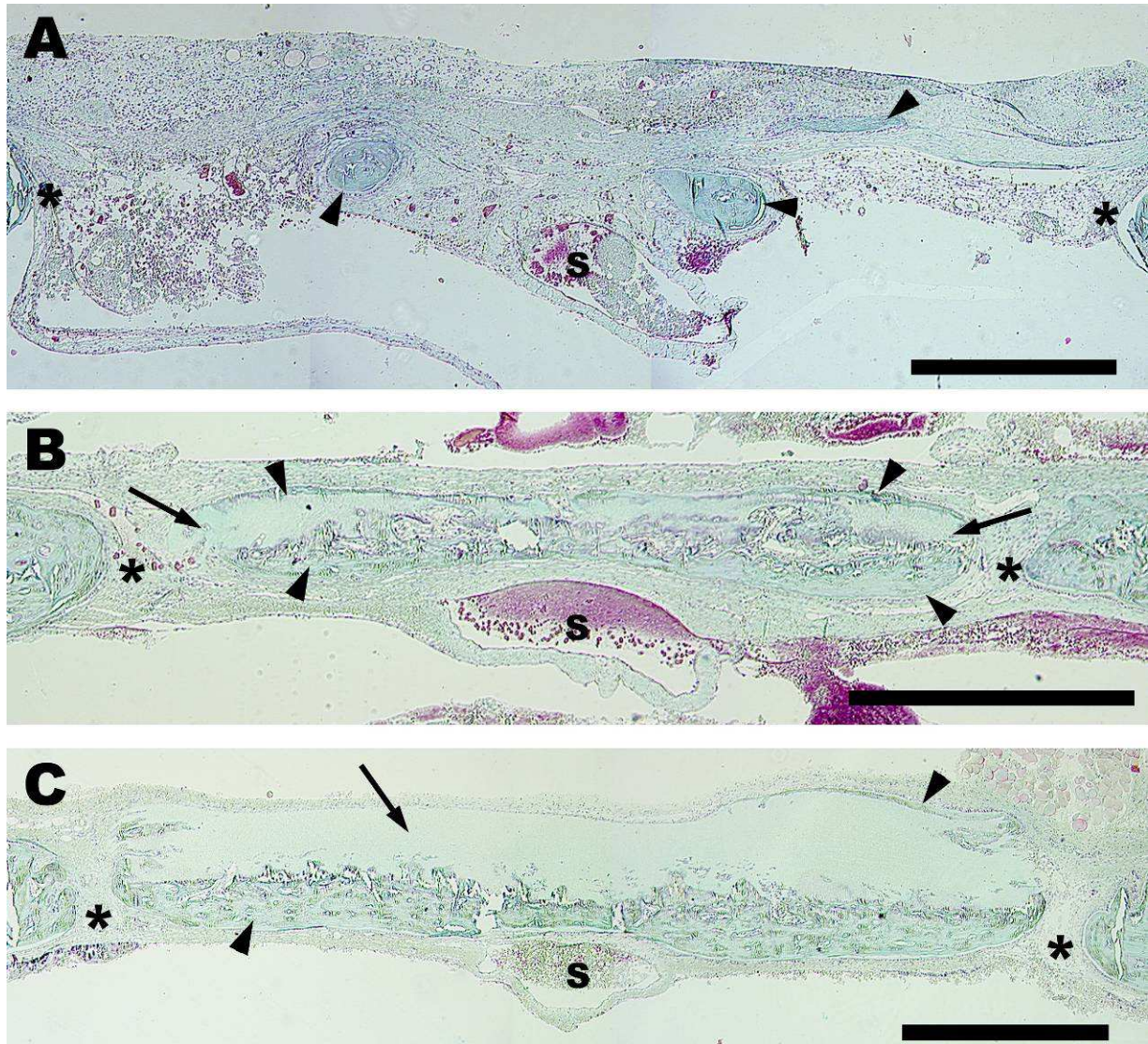


Figure 49 : Vue en coupe de la plaie des trois groupes d'animaux après 4 semaines
(A) Shams : la plaie est délimitée par les astérisques (*), elle est comblée par un tissu cicatriciel fibreux dans lequel sont noyés trois nodules osseux de petites tailles (têtes de flèches). **(B)** Matrices 5MG : la forme ovale du matériau est visible au centre du défaut. On observe à la fois le matériau résiduel en vert clair (flèches) et des zones plus sombres formées par la matrice osseuse minéralisée (têtes de flèches). **(C)** Matrices 40MG : de l'os comble la face endocrânienne de la plaie (têtes de flèches), au dessus du sinus (S). Le matériau résiduel est important et bien visible (flèches).

De l'os a été apposé sur toute la longueur de la face endocrânienne du matériau résiduel. Pas ou peu d'os n'est retrouvé sur la face exocrânienne des implants. Sur les matrices 5MG un fin liseré d'os néosynthétisé est observé alors que seul les berges des

matrices 40MG présentent du matériel osseux sur cette face (figure 49 B et C ; têtes de flèche).

Après 28 jours, la réparation spontanée du défaut est variable suivant les individus (figure 50 A et B), comme mentionné précédemment par analyse DEXA. Certains rats (n=2 / 8) présentent au site de la trépanation un tissu cicatriciel fibreux riche en cellules fibroblastiques au sein duquel apparaissent des zones cellulaires plus denses qui donneront naissance à un îlot osseux (figure 50 A ; flèches). Dans la même proportion que précédemment (n=2 / 8), un comblement important de la plaie par de larges nodules osseux a été observé chez certains animaux (figure 50 B). L'os néoformé dans ces conditions apparaît riche en ostéoblastes actifs et en ostéocytes (figure 50 C). La matrice osseuse est compacte avec quelques espaces médullaires. Ceux-ci apparaissent très structurés avec un dépôt de tissu ostéoïde important et possèdent des cellules positives à la phosphatase alcaline (figure 50 D et E). Cependant, la majorité des échantillons (n=4 / 8), la plaie possède des nodules osseux de petites tailles engoncés dans du tissu fibreux comme présenté auparavant à la figure 49 A.

Pour les animaux implantés avec les matrices 5MG, on constate que celles-ci sont entourées par une ligne d'ostéoblastes synthétisant du tissu ostéoïde distinguable du tissu osseux minéralisé par sa teinte vert clair (figure 51 A et B ; flèche). L'os mature néosynthétisé présente de nombreux ostéocytes (tête de flèche) au cœur de la matrice osseuse et des espaces médullaires (*) à la jonction avec la matrice de collagène résiduelle. Par détection enzymatique de l'activité phosphatase alcaline on constate que les cellules en périphérie et au sein de la matrice de collagène sont essentiellement des ostéoblastes engagés dans le processus de différenciation ou matures (figure 51 B et C). A très fort grossissement, par coloration au bleu de toluidine, on distingue plusieurs types cellulaires dans les espaces médullaires (figure 51 D). Au centre on trouve des espaces vasculaires, délimités par les corps cellulaires de cellules endothéliales (X). On observe également des cellules plurinucléées, de grande taille, identifiées comme des cellules de la lignée blanche type macrophage (tête de flèche) qui participent au remodelage de la matrice. Des ostéoblastes apposent de la matrice osseuse (flèche 1) comblant ainsi progressivement l'espace médullaire et enchâssant des cellules en son sein (flèche 2).

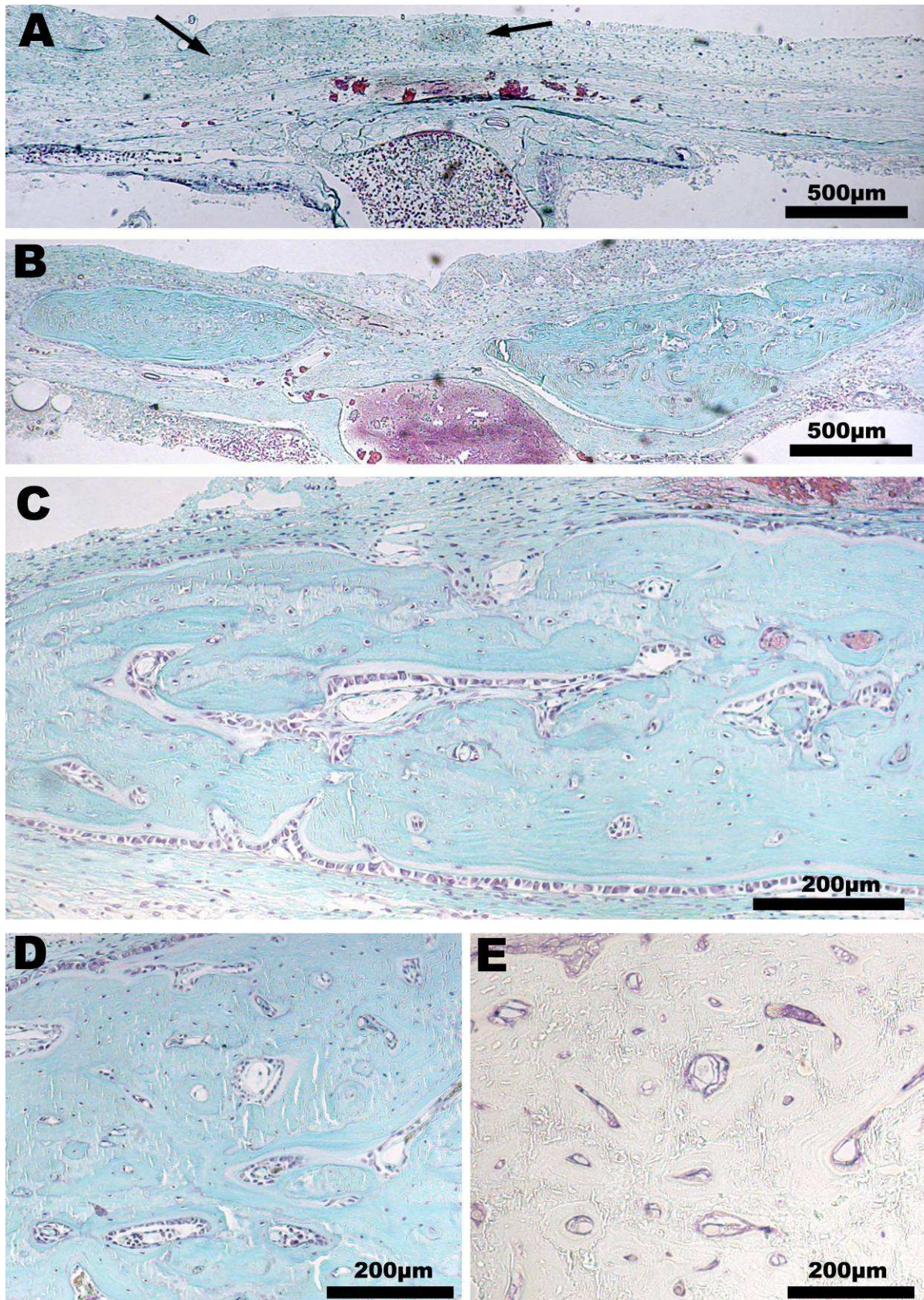


Figure 50 : Réparation spontanée du défaut en absence de matériaux (Shams)

(A) et (B) Vue à faible grossissement de la plaie osseuse après 4 semaines. La réparation est variable suivant les animaux, d'une plaie comblée uniquement par du tissu conjonctif (A ; n = 2) à de larges nodules osseux (B ; n = 2). (C) L'os néoformé est compact, avec des espaces médullaires en cours de comblement. (D) et (E) Les cellules dans et à la surface des nodules sont positives à la phosphatase alcaline.

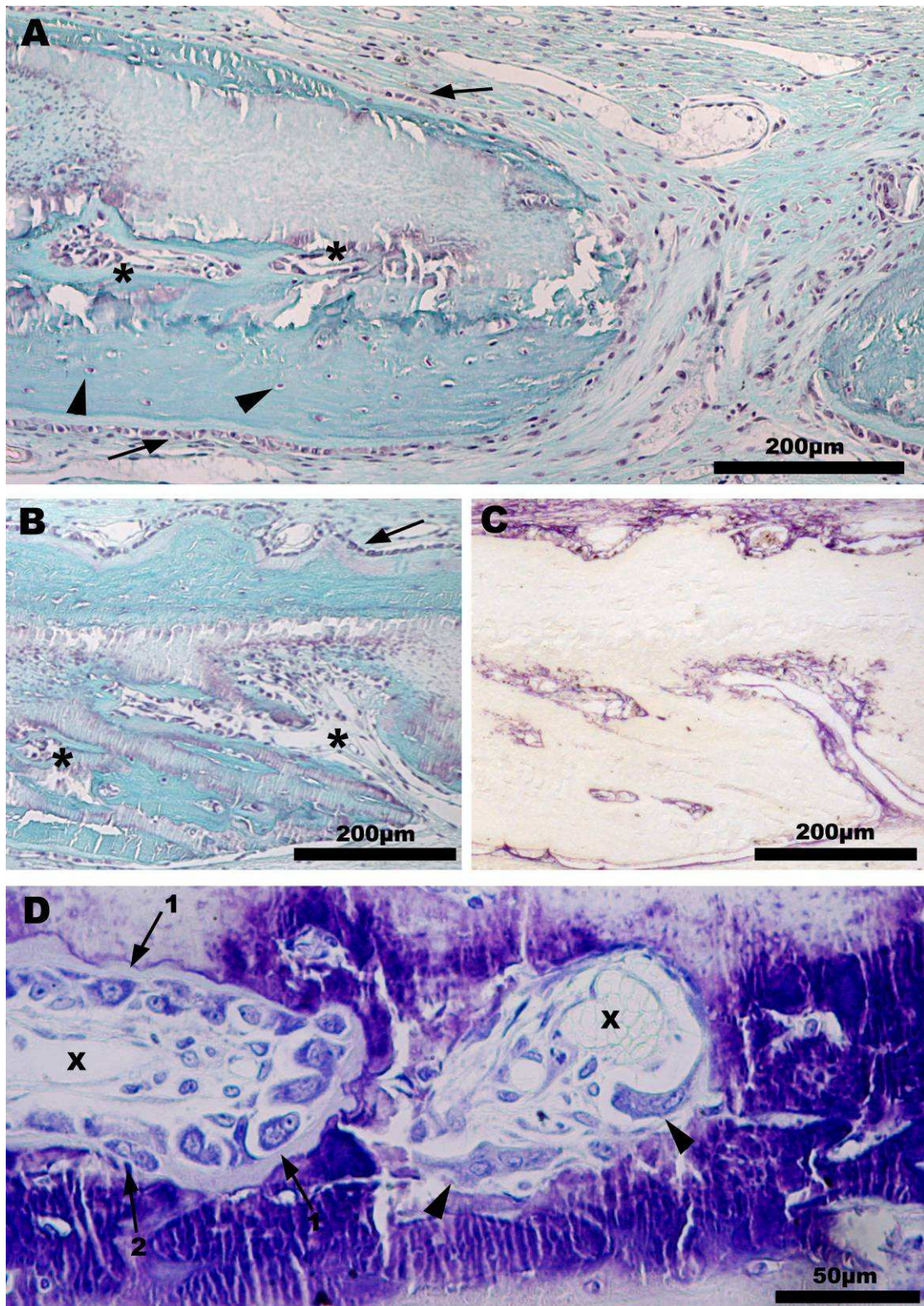


Figure 51 : Réparation du défaut en présence des matrices 5MG

(A) La matrice est bordée en haut et en bas par une ligne d'ostéoblastes et de tissu ostéoïde (flèches). De la matrice osseuse est présente dans la moitié inférieure contenant des ostéocytes (têtes de flèches). Des espaces médullaires sont présents entre l'os néoformé et la matrice résiduelle (*). (B) Grandissement des espaces médullaires (*) et des ostéoblastes actifs sur la partie supérieure de la matrice (flèche). (C) section contiguë de (B) marquant les cellules positives à la phosphatase alcaline. (D) À fort grandissement, les espaces médullaires colorés au bleu de toluidine présentent du tissu ostéoïde apposé sur la matrice (flèches 1) et un ostéocyte en formation (flèche 2). Des cellules multinucléées (têtes de flèches) et des espaces vasculaires (x) sont également présents.

Le tissu osseux apposé sur les matrices 40MG apparaît plus compact et ordonné, il présente une ligne continue d'ostéoblastes et de tissu ostéoïde sur sa partie inférieure et ses berges (figure 52 A, flèches). En revanche, les ostéoblastes n'ont pas eu le temps d'atteindre l'intégralité de la face exocrânienne de la matrice. Des ostéocytes sont visible dans l'os mature (têtes de flèche) et des espaces médullaires (x) sont également observés à l'interface entre la matrice de collagène et l'os néosynthétisé. La matrice de collagène résiduelle est importante et présente des infiltrations cellulaires (petites flèches), prémice de la colonisation du matériau. La révélation de l'activité phosphatase alcaline confirme la présence dans les espaces médullaires, ainsi que parmi les cellules infiltrées dans la matrice 40MG, de cellules ostéoblastiques matures ou engagées dans le processus de différenciation (figure 52 B et C). Comme observé avec les matrices 5MG, les espaces médullaires présentent des ostéoblastes en cours de synthèse (figure 51 D, flèche), des espaces vasculaires (x) et des cellules de la lignée blanche (tête de flèche).

L'observation morphologique sur coupe a été complétée par une mesure chiffrée de l'épaisseur de l'os néosynthétisé et de la matrice de collagène résiduelle. Ajoutés à l'étude par DEXA, ces mesures permettent d'avoir une idée de la réparation de la plaie dans le volume de l'échantillon.

Les matrices 5MG sont encore observables après 28 jours dans le défaut osseux mais l'ensemble os synthétisé et matrice résiduelle représentaient une épaisseur plus faible que le matériau initialement implanté. Une dégradation à 76,5% (+/- 25,0) de la matrice est mesurée (figure 53), l'os apposé représentant 18,8% (+/- 17,5) de l'épaisseur originelle de la matrice (figure 54). Avec une concentration en collagène plus importante, on constate que les processus de dégradation des matrices 40MG ont été ralentis ou limités. Seul 38,2 % (+/- 8,7) de la matrice 40MG ont été remaniés, soit 2 fois moins que les matrices 5MG. La quantité d'os néoformé sur les matrices 40MG est légèrement supérieure à celle mesurée sur les matrices 5MG (mais non statistiquement significative), représentant 20,8% (9,9) de la matrice 40MG implantée.

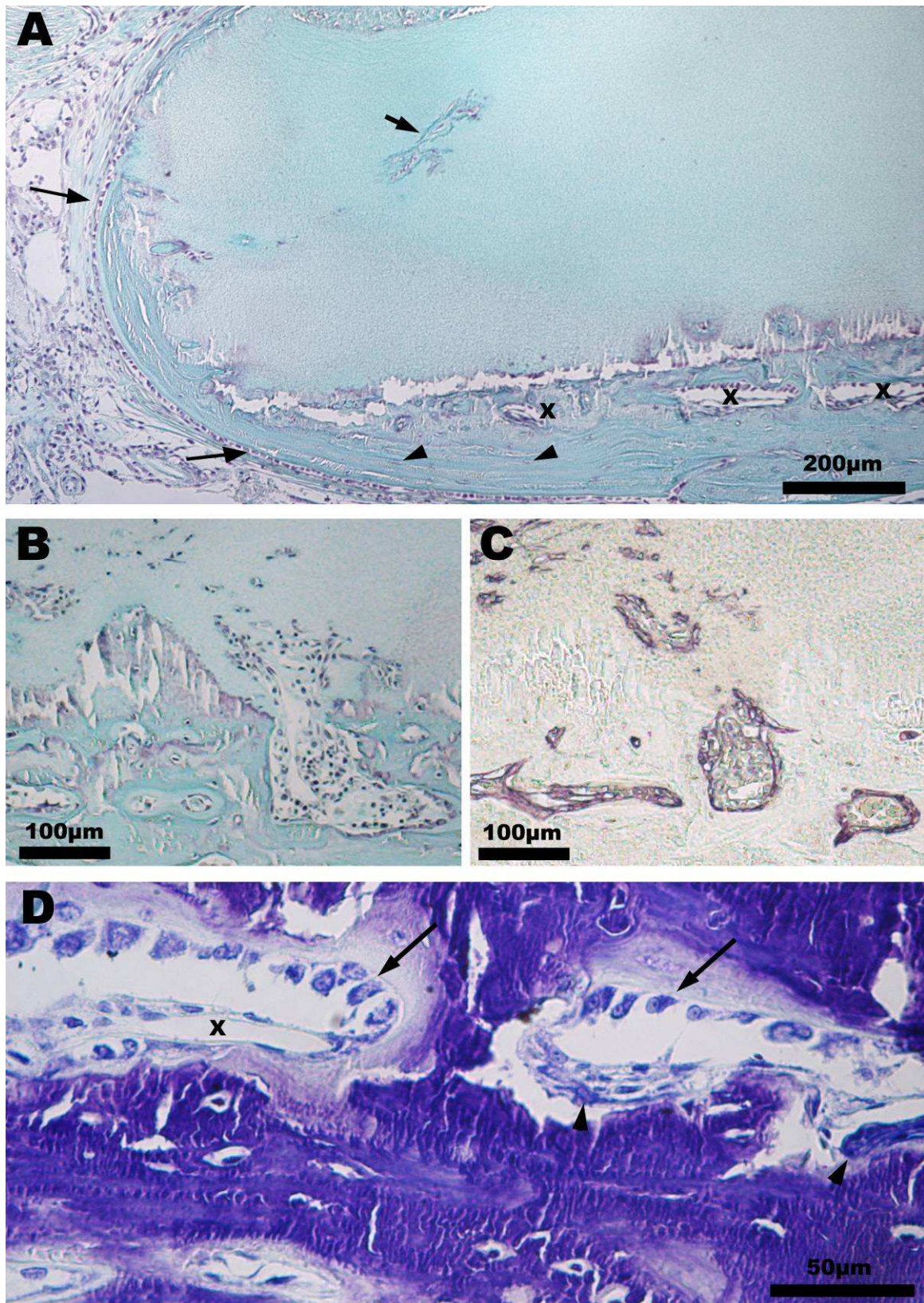


Figure 52 : Réparation du défaut en présence des matrices 40MG

(A) La matrice résiduelle est importante et distinguable de l'os apposé sur sa face endocrânienne. Une ligne d'ostéoblastes progresse vers la face supérieure du matériau (flèches) et des ostéocytes sont présents dans l'os néosynthétisé. (B) et (C) Les cellules infiltrées dans la matrice et qui bordent les espaces médullaires sont positives à la phosphatase alcaline. (D) Espaces médullaires à l'interface os néoformé–matrice colorés au bleu de toluidine à fort grandissement. On trouve des ostéoblastes synthétisant le tissu ostéoïde (flèches), des cellules plurinucléées (têtes de flèche) et des espaces vasculaires (x)

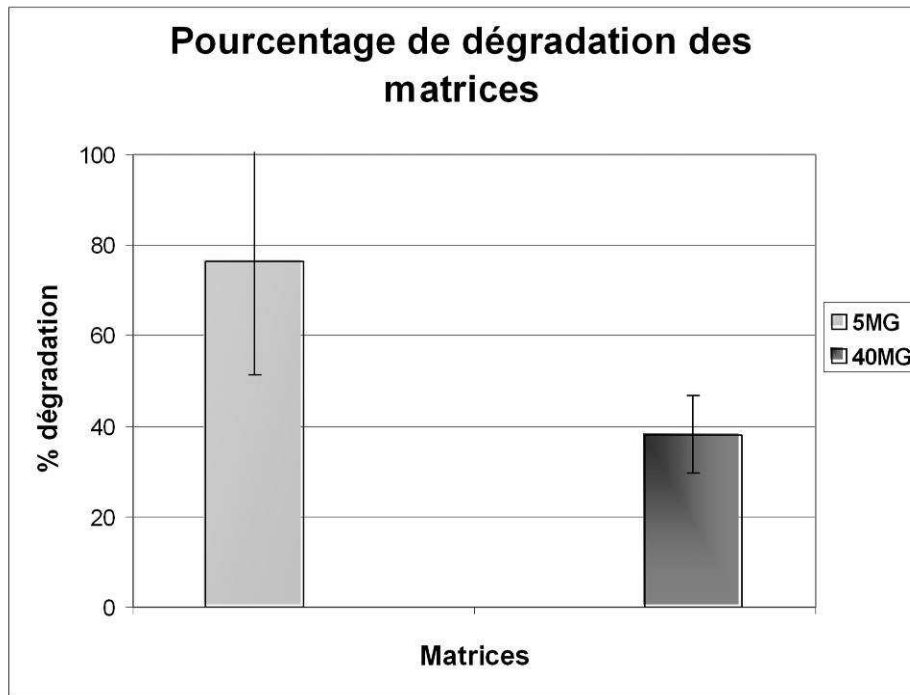


Figure 53 : Pourcentage de dégradation des matrices après 4 semaines

L'épaisseur résiduelle des matrices 5MG et 40MG après 4 semaines a été mesurée sur coupe puis soustraite et rapporté à l'épaisseur des matrices introduites de la plaie. Le taux de dégradation est plus important pour les matrices les moins concentrées.

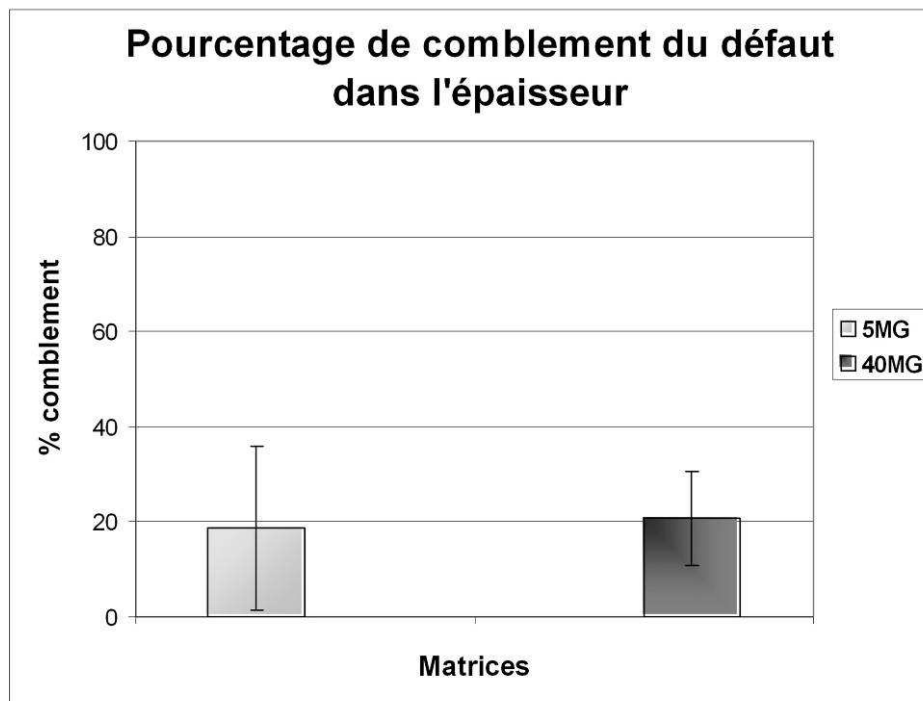


Figure 54 : Pourcentage de comblement de la plaie dans l'épaisseur après 4 semaines

L'épaisseur d'os néoformé a été mesurée sur coupe et rapporté à l'épaisseur initiale de la calvaria trépanée (1mm). La concentration en collagène ne semble pas avoir influencé la quantité d'os apposé à leur surface.

3. Conclusions

En l'absence de matériaux, la réparation spontanée du défaut s'est avérée variable suivant les individus. Un comblement de 40% (+/- 20) de la surface du défaut a été mesuré. De façon évidente les matrices fibrillaires de collagène, indépendamment de leur concentration, ont permis une réparation plus importante du défaut et aucune réaction immunitaire délétère n'a été observée.

Les matrices 5MG ont été dégradées à 75% et ont permis un taux de réparation supérieure à 80% en surface et de 20% dans leur épaisseur. L'os néoformé a été apposé en majorité sur la face inférieure en communication avec le sinus veineux mais des lignes d'ostéoblastes en cours de synthèse de matrice osseuse étaient couramment observées sur l'intégralité de la face exocrânienne de la matrice. Le cœur de la matrice est occupé par des espaces médullaires contenant des ostéoblastes actifs, des cellules plurinucléées et des cellules vasculaires qui participent tous les trois à la colonisation du matériau et à sa conversion en tissu osseux natif.

Seul ~40% de la matrice 40MG a été dégradé et après 4 semaines le recrutement des ostéoblastes ne s'est pas réalisé sur le contour de sa face supérieure. Cependant de nombreuses cellules, positives à la phosphatase alcaline, ont été retrouvées infiltrées dans la matrice résiduelle. La quantité d'os apposée sur la face endocrânienne des matrices 40MG apparaît légèrement supérieure à l'intégralité de l'épaisseur d'os déposée sur les deux faces des matrices 5MG. Il en résulte un pourcentage de comblement dans la section du défaut, mais également dans la surface, légèrement supérieur avec les matrices 40MG que celui obtenu avec les matrices les moins concentrées. L'os néoformé apparaît quant à lui mieux organisé et apposé plus régulièrement.

Ces résultats sont extrêmement encourageants, notamment pour les capacités réparatrices des matrices 40MG aux vues de ses propriétés ostéoconductives *in vitro*. Ils apportent également des informations importantes sur le potentiel qu'ont ces matrices, notamment à 5mg/mL, à être colonisées par des cellules à partir de leur surface. Ce sont ces propriétés qui vont être utilisées au cours du prochain chapitre.

Chapitre IV

Transitions morphologiques des ostéoblastes dans un réseau fibrillaire de collagène en trois dimensions

Au cours du chapitre II nous avons décrit et analysé le comportement d'ostéoblastes humains cultivés pendant 4 semaines sur des matrices fibrillaires plus ou moins concentrées. Après 7 jours de culture, des ostéoblastes étaient observés dans les matrices 5MG, leur nombre croissant au cours des 4 semaines d'expérimentation, tandis que les cellules ne pénétraient pas les matrices 40MG. Ce résultat a été obtenu avec la lignée d'ostéoblastes transformés ainsi qu'avec la lignée primaire d'ostéoblastes. Toutefois, la morphologie des deux lignées de cellules dans les matrices présentait des différences notables, d'autant plus que les cellules primaires apparaissaient sous une forme dendritique singulière qui rappelle celle des ostéocytes.

Nous avons voulu, dans ce dernier chapitre de résultats, présenter à l'aide de différentes techniques de microscopie la morphologie d'ostéoblastes primaires dans un contexte tridimensionnel. A ce jour, et malgré des tentatives de détection immunohistologique de la sclérostine comme marqueur du phénotype ostéocytaire, nous ne pouvons pas produire de preuves moléculaires d'un processus de différenciation des ostéoblastes en ostéocytes lorsqu'ils pénètrent dans les matrices. Les résultats présentés éclairent cependant l'intérêt que peut tirer la recherche fondamentale en biologie cellulaire à disposer de matériaux pour l'étude des cellules dans un contexte tridimensionnel.

1. Morphologie des ostéoblastes dans un contexte tridimensionnel

A partir de la surface des matrices 5MG, des ostéoblastes ont pénétré dans le réseau de collagène. Ceci a pour conséquence de changer leur environnement, les cellules se retrouvent englobées dans le maillage de fibres de collagènes et peuvent interagir dans les trois dimensions de l'espace. Ce changement d'environnement a également eu pour conséquence de changer leur morphologie (figure 55).

En surface, les cellules des deux lignées adoptent la morphologie cubique caractéristique des ostéoblastes *in vivo* (figure 55 E, tête de flèche et figure 35 et 39 chapitre II). Lorsqu'ils sont dans le réseau fibrillaire de la matrice, les ostéoblastes transformés s'allongent en fuseaux bipolaires (figure 55 A, C et E, flèches). Les deux pôles du fuseau constituent deux points d'ancrages qui permettent le déplacement des cellules à travers le gel fibrillaire dans une direction à +/- 45° de la verticale.

On observe également un changement de morphologie des ostéoblastes de la lignée primaire lorsqu'ils sont à l'intérieur de la matrice fibrillaire. Leur corps cellulaire s'allonge, mais à la différence des cellules FSHO-6 plusieurs ($n \geq 3$) prolongements fins et étendus émergent (figure 55 B, D et F, flèches). Ce profil dendritique apparaît moins compatible avec la migration cellulaire que la morphologie bipolaire, la multiplicité des points d'ancrages dans plusieurs directions de l'espace devrait limiter une procession unidirectionnelle. Cependant nous n'avons pas observé de cellules de la lignée primaire sous la forme de fuseau bipolaire, indiquant que leur pénétration dans la matrice s'est faite avec cette forme dendritique. Quoi qu'il en soit, même si les cellules primaires sont en migration, leur morphologie dendritique est significativement différente des cellules transformées et suffisamment proche de celles des ostéocytes pour être étudiée plus avant.

Ces résultats ont été obtenus avec des matrices concentrées à 5mg/mL, les cellules n'ayant pas pénétré les matrices plus concentrées. Des matrices fibrillaires ont été préparées à partir de solutions de collagène à 1mg/mL (matrices 1MG) pour faciliter leur pénétration dans le gel et obtenir un plus grand nombre de cellules à l'intérieur.

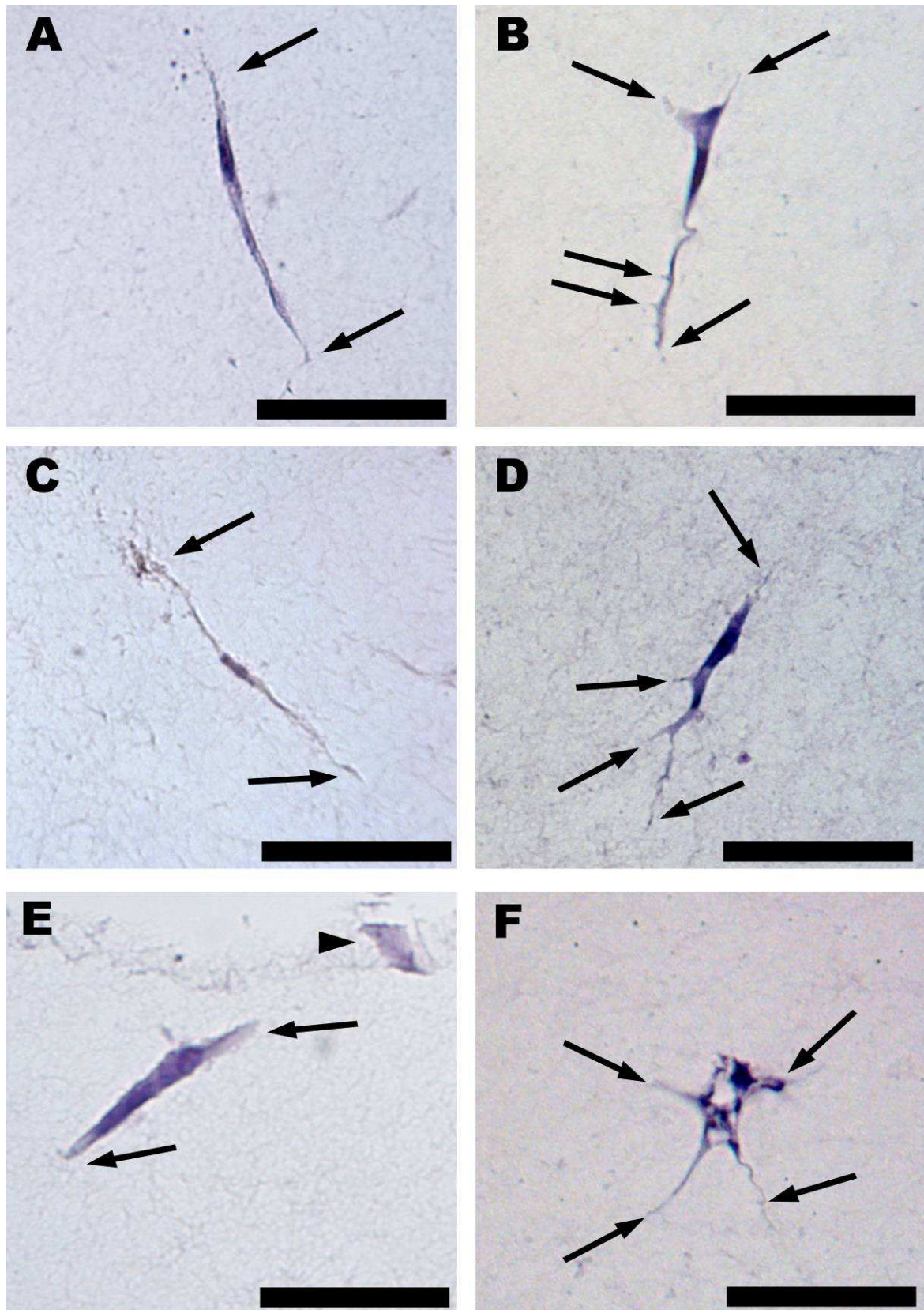


Figure 55 : Ostéoblastes transformés et primaires en coupes dans les matrices 5MG.

(A), (C) et (E) : cellules FHSO-6 à 7 et 14 jours dans les matrices fibrillaires. Les cellules sont en fuseau bipolaire, délimité par les flèches. Un ostéoblaste cubique est observé en surface (tête de flèche). (B), (D) et (F) : cellules F27 à 7 et 14 jours dans les matrices fibrillaires. Des prolongements émergent autour du corps cellulaire (flèches) qui donnent aux cellules un profil dendritique. Barre : 50µm.

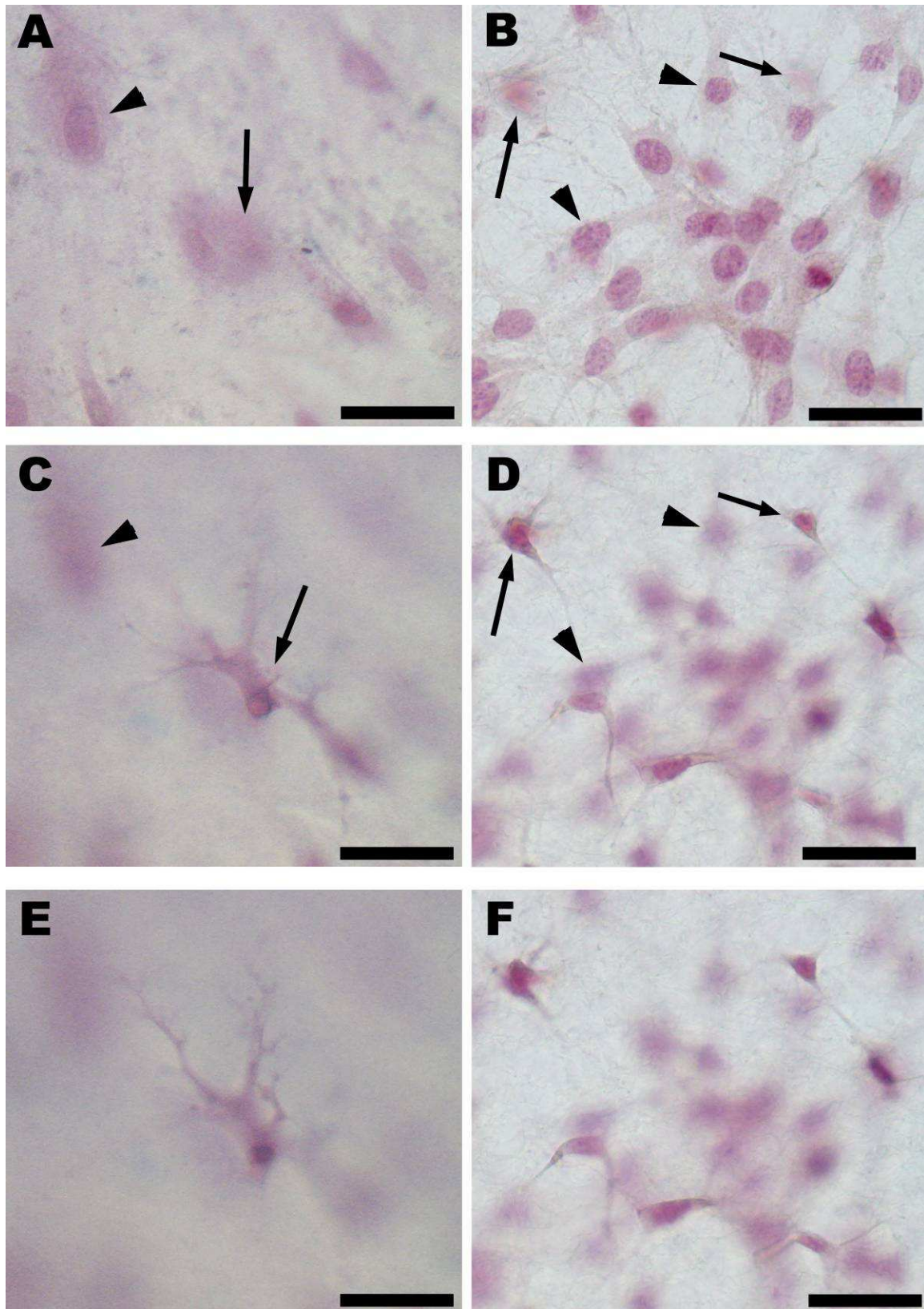


Figure 56 : Cellules primaires dans les matrices 5MG et 1MG.

(A), (C) et (E) : matrice 5MG et cellules F27 à 7 jours, même champ d'observation. A la surface de la matrice les cellules sont étalées avec un large noyau (tête de flèche). En pénétrant dans la matrice apparaît une cellule ramifiée qui était visible à la surface sous la forme d'un tache violacée défocalisée (flèche). (B), (D) et (F) : matrice 1MG et cellules F27 à 5 jours, même champ d'observation. Les cellules en surface (têtes de flèche) et les cellules dans la matrice (flèches) présentent la même morphologie qu'observée sur les matrices 5MG. On dénombre plus de cellules dans ces matrices sur une durée plus courte.

Après 7 jours de culture, les cellules F27 sont étalées à la surface des matrices 5MG et présentent un large noyau (figure 56 A, têtes de flèches). Dans le champ du microscope on remarque des taches défocalisées du colorant cellulaire dans l'épaisseur de la matrice (figure 56 A, flèches). En pénétrant dans la matrice par le jeu de la platine du microscope, un corps cellulaire apparaît (figure 56 C, flèches), paré de prolongements cytoplasmiques qui s'étendent dans la profondeur de la matrice (figure 56 C et E).

Après 5 jours de culture, les ostéoblastes présents à la surface des matrices 1MG sont étalés avec un noyau ovoïde comme décrit sur les matrices 5MG à 7 jours (figure 56 B, tête de flèche). Le changement du plan focal du microscope nous fait pénétrer dans la matrice où l'on trouve plusieurs ostéoblastes ramifiés (figure 56 D et F, flèches). La morphologie des ostéoblastes primaires dans les matrices 1MG et 5MG apparaît identique. La diminution de la concentration en collagène permet d'obtenir plus rapidement un nombre plus important de cellules dans la matrice. Elle augmente également la transparence des matrices ce qui est important pour bien visualiser le développement des prolongements cytoplasmiques et l'éventuelle formation d'un réseau de connexion cellulaire à partir d'une observation par le haut de la matrice à l'aide d'un microscope. Pour ces avantages cinétiques et optiques, les prochains résultats présentés auront été obtenus avec les ostéoblastes F27 entre 3 et 10 jours de culture sur les matrices 1MG.

2. Formation d'un réseau de cellules connectées

Le cytosquelette d'actine des ostéoblastes en contact avec les matrices fibrillaires 1MG a été marqué à la phalloïdine fluorescente et observé à partir de la surface de la matrice en microscopie de fluorescence.

Les ostéoblastes en surface présentent un cytosquelette d'actine bien développé. Les cellules sont larges et étalées, les fibres d'actine s'étendent de façon radiale et corticale pour étendre et ancrer la cellule sur la matrice par des prolongements courts de massifs (figure 57 A et C, tête de flèche). Dans la matrice, les ostéoblastes ont un corps cellulaire très ramassé de $\sim 1\mu\text{m}$ de diamètre (figure 57 B et D, flèche).

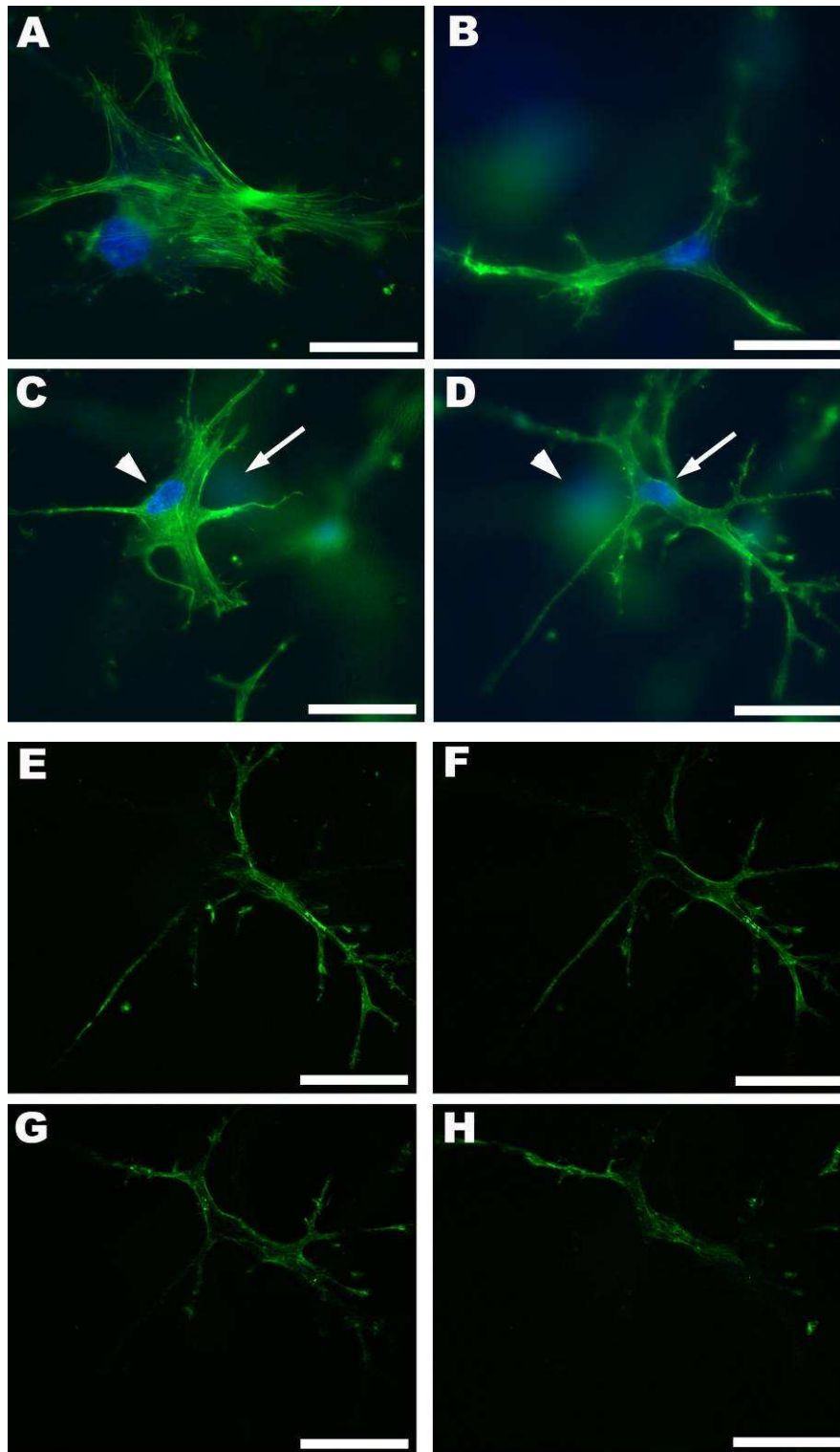


Figure 57 : Cellules F27 marquées à la phalloïdine en microscopie à fluorescence et apotomie. (A) et (C) : cellules primaires en surface. Le cytosquelette d'actine bien développé ancre et étale les cellules à la surface de la matrice. (B) et (D) : cellules primaires dans la matrice. Le corps cellulaire est ramassé, étiré en de longs prolongements, les fibres d'actines ne sont plus présentes. (C) et (D) : même champ d'observation où coexistent une cellule étalée en surface avec des câbles d'actine bien définis (tête de flèche) et une cellule dendritique dans la matrice avec un marquage cortical de l'actine (flèche). (E – G) : même cellule que en (D) détaillée dans ces plans focaux par le système ApoTome sur une profondeur de $\sim 50\mu\text{m}$ à partir de son extrémité la plus proche de la surface. Sept prolongements émergent du corps cellulaire et se divisent à nouveau. Des excroissances de petite taille terminent la pointe de chaque prolongement. Barre : $50\mu\text{m}$

Les câbles d'actine ne sont plus distingués et c'est un marquage cortical diffus de la phalloïdine que l'on observe le long des prolongements et autour du corps cellulaire. Les prolongements cytoplasmiques s'étendent dans les trois directions de l'espace se terminant en une pointe massive et bourgeonnante avec une intensité de fluorescence plus importante.

Par l'introduction d'une grille d'interférence (procédé ApoTome), des plans focaux peuvent être extraits de l'intérieur de la matrice ce qui permet de s'affranchir des perturbations de l'image liées à la profondeur de champ de la préparation. Les différents plans focaux de la cellule dendritique présentée à la figure 57 D en microscopie de fluorescence conventionnelle sont détaillés à partir de son extrémité la plus proche de la surface jusqu'à celle la plus profonde (figure 57 E – H). On constate qu'à partir du corps cellulaire, les prolongements cytoplasmiques émergent et se divisent rapidement en deux prolongements plus longs et fins. Dans le plan, ils procurent à la cellule une amplitude de $\sim 150\mu\text{m}$ par le biais de leur différentes orientations. Dans l'épaisseur de la matrice, ceux-ci couvrent une profondeur de plusieurs dizaines à une centaine de microns.

La technique de microscopie de fluorescence à deux photons nous a permis de détailler l'organisation des ostéoblastes dans le volume de la matrice à partir de la surface. Une acquisition des plans focaux est réalisée tous les micromètres sur une distance de $80\mu\text{m}$ de profondeur. Le volume tridimensionnel est reconstruit numériquement à partir des clichés des cellules marquées à la phalloïdine et est présenté en une série d'image tous les 45° suivant une rotation selon l'axe (x) (figure 58).

La vue du volume à 90° permet d'appréhender au mieux l'organisation des cellules dans l'espace. Au moins trois ostéoblastes sont observés dans la matrice et présentent de nombreux prolongements fin et étendus. A partir de la surface on observe une cellule très fine, concentrée autour de son corps cellulaire qui s'étend d'abord verticalement puis horizontalement dans la matrice. Cette cellule est en contact avec une autre en surface et également avec une cellule très dendritique plus profonde (figure 58 90° , flèches). Cette dernière présente de nombreux prolongements, orientés dans les trois directions de l'espace mais aucune cellule ne semble suffisamment proche d'elle pour permettre un contact.

Cependant, on constate l'existence de relation entre les cellules de la surface et les cellules les plus profondes.

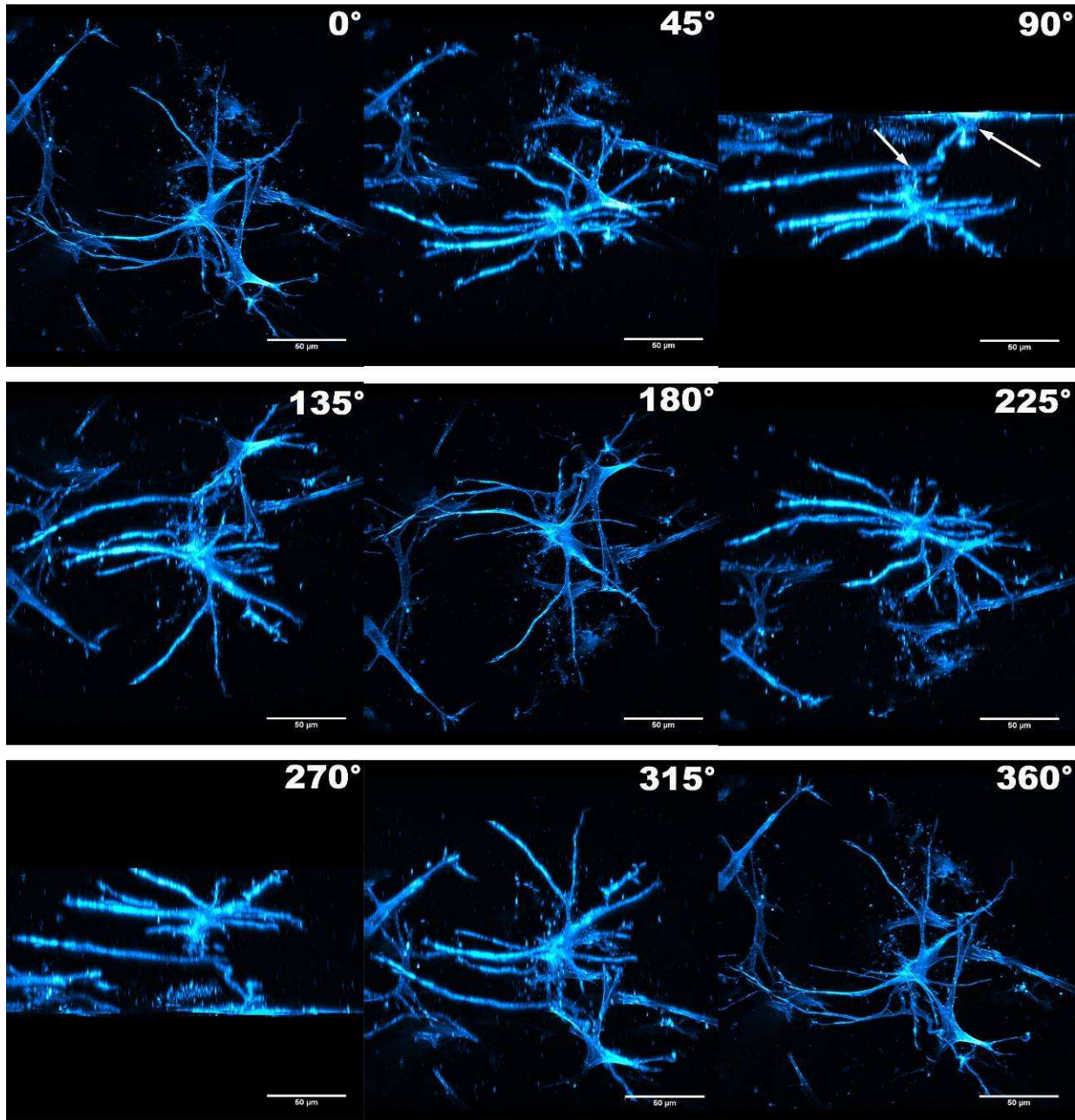


Figure 58 : Organisation des ostéoblastes primaires dans le volume de la matrice par microscopie de fluorescence à deux photons et reconstruction 3D numérique.

Un volume de la matrice contenant des ostéoblastes marqués à la phalloïdine est reconstruit par des images tous les 1µm sur 100µm de profondeur à partir de la surface. Le volume reconstruit est présenté suivant une rotation de 360° (axe x, antihoraire) à partir de la projection en (z) de la face supérieure.

Un tel constat soutient l'analogie morphologique que l'on peut faire avec les ostéocytes *in vivo*. En plus de la présence de nombreux prolongements autour des corps cellulaires des cellules, ceux-ci semblent être un moyen pour les cellules de se connecter entre elles pour former un syncytium fonctionnel. Par microscopie électronique en transmission nous avons analysé l'organisation ultrastructurale des cellules dans les matrices afin, notamment, de mettre en évidence des jonctions cellulaires qui confirmeraient les contacts observés précédemment.

Qu'ils soient en surface ou dans la matrice les ostéoblastes sont métaboliquement actifs avec un réticulum endoplasmique développé (figure 59 A, tête de flèche). Le corps cellulaire est constitué d'une fine bande de cytoplasme de $\sim 1\mu\text{m}$ d'épaisseur qui entoure le noyau. Des contacts entre cellules dans la matrice sont observés entre les corps cellulaires (figure 59 A, flèche) ou entre corps cellulaires et prolongements (figure 59 B, flèche). Avec un plus fort grossissement au niveau du contact entre cellules, on mesure un espace de $\sim 20\text{nm}$ entre les membranes plasmiques (figure 59 C, encart).

Une zone de contact étroite apparaît sous la forme d'une structure moléculaire dense aux électrons qui relie les cellules sur $\sim 300\text{nm}$ de longueur en traversant les deux membranes plasmiques (figure 59 C, flèche). Cette structure peut être apparentée à une jonction de type communicante (*gap junction*) car aucun élément du cytosquelette n'apparaît lui être associé de part et d'autre de la membrane plasmique. Il serait bien entendu important de confirmer la présence de connexines, que ce soit moléculairement ou par ultrastructure, au niveau de ces jonctions pour valider leur nature de type communicante. Cependant, la présence de ces structures reste en accord avec les précédentes descriptions morphologiques sur des échelles métriques plus grandes et tend à valider l'aspect organisé des cellules entre elles dans le volume des matrices fibrillaires.

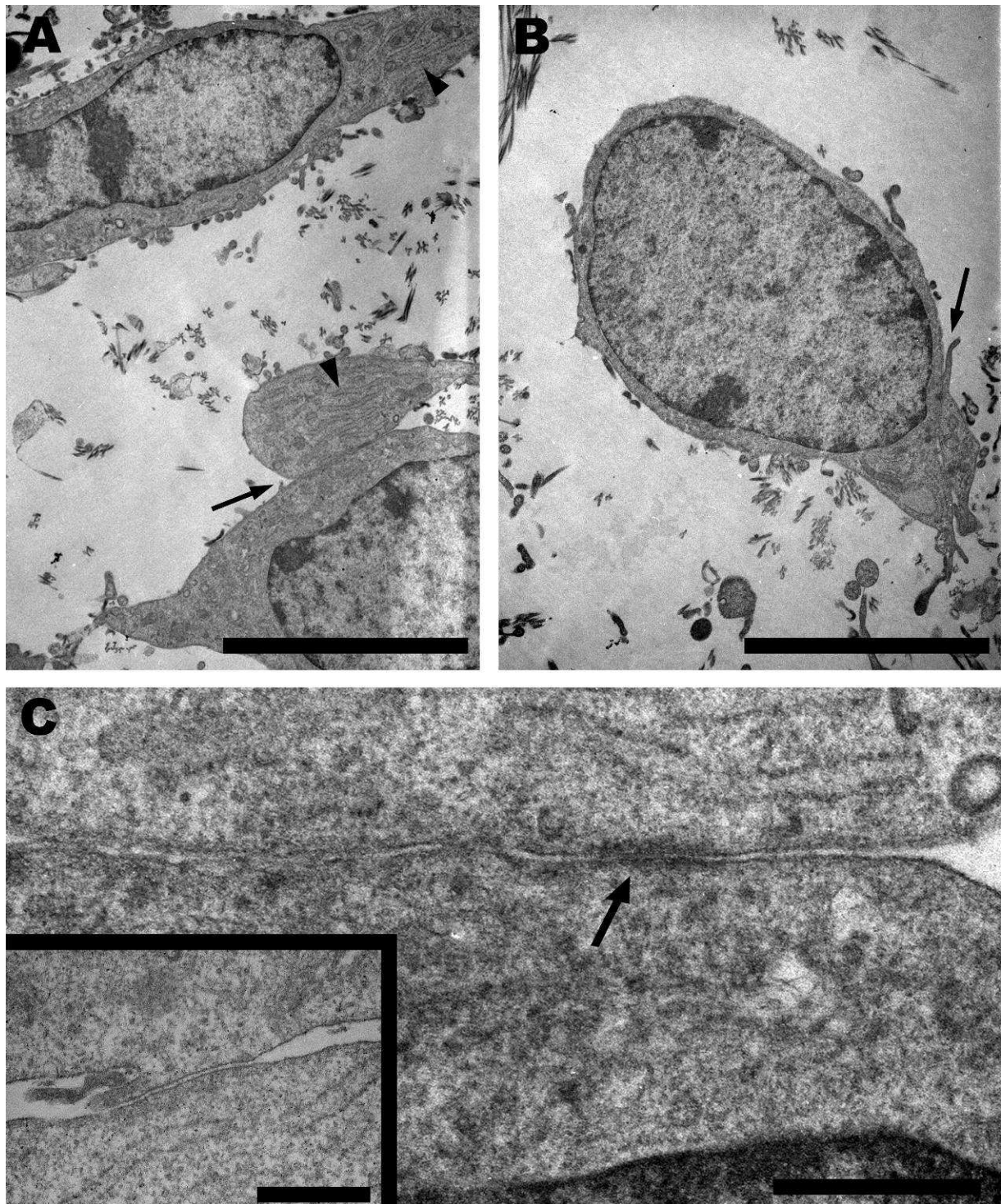


Figure 59 : Ultrastructure des ostéoblastes dans la matrice fibrillaire et des connexions cellulaires.

(A) et (B) : le corps cellulaire des ostéoblastes dans la matrice se résume au noyau entouré d'une bande de cytoplasme de $\sim 0,5$ à $1\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les cellules dans la matrice, comme celles en surface, présentent un RE développé (tête de flèche). Dans la matrice des contacts ont lieu entre cellules par leurs corps cellulaires ou par des prolongements (flèches). **(C) et insert :** contacts cellulaires à plus fort grossissement. Les membranes se lient étroitement, laissant un espace de $\sim 15\text{nm}$. Une jonction cellulaire de type communicante (*gap junction*) relie les corps cellulaires de deux ostéoblastes (flèche). On note l'absence d'éléments du cytosquelette associé à la structure de jonction. Barres (A) et (B) : $5\mu\text{m}$; (C) et insert : $0,5\mu\text{m}$.

3. Conclusions

Les ostéoblastes utilisés pour cette étude sont capables de migrer à travers les matrices les moins concentrées ce qui entraîne un changement drastique de leur morphologie. Les ostéoblastes de la lignée transformée sont présents dans la matrice sous une forme en fuseau bipolaire. Cette morphologie fusiforme apparaît être en adéquation avec une migration cellulaire de type mésenchymateuse bien qu'aucune activité lytique de la matrice n'ait été mise en évidence.

Les ostéoblastes primaires qui pénètrent dans les matrices fibrillaires apparaissent dendritiques, leur corps cellulaire réduit et concentré autour du noyau duquel s'échappe de nombreux prolongements cytoplasmiques. Cette morphologie rappelle très fortement la morphologie des ostéocytes enchâssés dans la matrice osseuse. A partir du corps cellulaire les prolongements cytoplasmiques se ramifient et s'amincissent pour sonder un volume important de matrice autour d'eux.

Par l'étude combinée de différentes microscopies il apparaît qu'un réseau cellulaire s'organise entre les cellules en surface et dans la matrice. Les observations en ultrastructure révèlent un réticulum endoplasmique développé et la présence d'édifices moléculaires denses aux électrons à travers les membranes plasmiques de cellules contiguës. L'absence d'éléments du cytosquelette associés à ces structures les classe potentiellement dans les jonctions cellulaires de type communicantes.

L'ensemble de ces descriptions morphologiques vont dans le sens d'une différenciation en ostéocytes, des ostéoblastes qui se retrouvent à l'intérieur des matrices fibrillaires dans un contexte tridimensionnel.

DISCUSSION

Discussion

Au parcours de ce manuscrit, nous avons présenté les caractéristiques structurales, macroscopiques et microscopiques, de matériaux fibrillaires moyennement et fortement concentrés en collagène. Ces matériaux ont ensuite été évalués *in vitro* et *in vivo* dans leur capacité à soutenir le phénotype de cellules ostéoblastiques humaines et à favoriser la reconstruction osseuse. Le *leitmotiv* de nos expérimentations, et qui représente la thèse soutenue, était que l'utilisation de matériaux de collagène de concentration élevée serait bénéfique pour les cellules osseuses en leur proposant un environnement proche de celui qu'elles rencontrent *in situ*.

Même si la démonstration du potentiel clinique des matrices fibrillaires a représenté le thème central de cette étude, nous avons constamment gardé à l'esprit le fait que ces matériaux constituaient également des supports tridimensionnels de nature proche des matrices extra cellulaires conjonctives. Les éléments nous permettant d'étayer cette hypothèse sont apparus malgré nous, comme cela arrive souvent, lorsque nous avons observé que les ostéoblastes qui pénétraient dans le réseau de collagène des matrices fibrillaires subissaient une transformation morphologique qui pouvait les apparenter à des ostéocytes. Nous avons à la suite de cette observation employé plusieurs techniques de microscopies afin de caractériser cette morphologie et tenter de confirmer le phénotype ostéocytaire des ostéoblastes enchâssés dans les matrices fibrillaires.

Ces deux aspects vont être à présent discutés, en éclairant nos résultats des données de la bibliographie afin de conclure sur les potentiels cliniques des matrices fibrillaires denses de collagène et sur leur utilisation comme modèle en trois dimensions des matrices extra cellulaires par la biologie cellulaire fondamentale.

I Matrices fibrillaires de collagène : des implants osseux en devenir ?

1. Apport de la nature fibrillaire pour l'ingénierie osseuse

Les polymères naturels constituent *a priori* un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire car ils sont le substrat naturel sur lequel les cellules peuvent adhérer, proliférer et exprimer leur phénotype (Logeart-Avramoglou *et al*, 2005). Parmi ceux-ci le collagène est retrouvé dans de nombreuses espèces animales et dans plusieurs tissus au sein d'une même espèce. Le collagène, en tant que matière première de matériaux pour la clinique, a trouvé de nombreuses applications et donne des résultats prometteurs dans la reconstruction des dermes et épidermes de grands brûlés (Lee *et al*, 2001).

Les matériaux à base de collagène sont cependant très faiblement utilisés pour la reconstruction osseuse. Ils sont décrits comme ayant des propriétés mécaniques faibles (Giannoudis *et al*, 2005), et à ce titre, non compatibles avec les exigences du tissu osseux. La SELECTION NATURELLE a conservé cette molécule dans un grand nombre de phyla du règne animal, où elle est la molécule majoritaire des tissus conjonctifs auxquels elle procure cohésion, élasticité et résistance aux contraintes mécaniques (Boot-Handford et Tuckwell, 2003). Le collagène représente également 90% de la matrice organique de l'os où il assure la résistance aux forces de tractions et de torsions (Boskey *et al*, 1999).

Ces données peuvent laisser à penser que ce ne sont pas les propriétés mécaniques intrinsèques du collagène qui sont en cause, mais sa formulation dans les matériaux. Les éponges de collagène représentent la majorité des matériaux à base de collagène utilisés à ce jour en clinique ou développés dans les laboratoires de recherches (Lee *et al*, 2001 ; Glowacki et Mizuno, 2007). Elles sont obtenues par lyophilisation (procédé de déshydratation par sublimation du solvant) de solutions acido solubles de collagène ou de tissus dermiques.

Nous avons pour cette étude, préparé des éponges de collagène à partir de solutions acido solubles à 5mg/mL et nous les avons comparées aux matrices fibrillaires 5MG, préparées à partir de la même solution de collagène, afin de mettre en évidence le gain que peut apporter le collagène sous forme fibrillaire.

a) Mise en œuvre, aspect et manipulation des éponges et des matrices 5MG

Les éponges que nous avons préparées se présentent sous la forme d'un empilement de feuillets de collagène denses, séparés par de larges pores plus ou moins connectés entre eux (cf. chapitre I, figures 31 et 32). Par microscopie électronique à transmission, on constate que des murs épais délimitent les pores, constitués d'une agglomération des molécules de collagène sous la forme de microfibrilles -non striées- de 10 à 20nm de diamètre (figures 33). Ces caractéristiques structurales macroscopiques et microscopiques sont en accord avec l'abondante littérature qui concerne les éponges (Doillon *et al*, 1986 ; Burg *et al*, 2000 ; Lee *et al*, 2001 ; Glowacki et Mizuno, 2007). Cependant, certaines études décrivent la présence de fibrilles striées isolées parmi des microfibrilles de ~10nm de diamètre que nous n'avons pas observées (Anselme *et al*, 1990).

Du point de vue du chirurgien, les modalités de préparation, les facilités d'usage et de manipulation, ainsi que les effets secondaires potentiels des matériaux, sont des paramètres essentiels (Kneser *et al*, 2006).

Les éponges de collagène que nous avons préparées constituent un matériau fragile, qui nécessite d'être manipulé avec précaution pour éviter qu'il s'écrase ou se déchire. De par la nature de leur procédé d'obtention (lyophilisation), elles se présentent sous la forme d'un matériau déshydraté et doivent donc être réhydratées avant contact avec du matériel biologique (cellules *in vitro* ou implanté *in situ*). Nos expériences montrent que cette étape de réhydratation est extrêmement délicate et entraîne une modification importante de leur structure initiale. En effet, sous l'influence de la masse du liquide et des phénomènes de capillarité, les éponges s'affaissent et nous avons observé une diminution de 50% de leur volume (figure 29).

Pour renforcer leur structure, augmenter la réponse cellulaire et diminuer leur cinétique de dégradation, les procédés d'obtention des éponges de collagène doivent être complexifiés. Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé un volume de solution deux fois supérieur à celui des matrices 5MG afin d'obtenir après réhydratation un matériau de surface et de volume équivalent. Dans d'autres études, les éponges sont couramment supplémentées par des polymères synthétiques (acides poly lactique/glycolique, Hosseinkhani *et al*, 2006) et des molécules de la matrice extra cellulaire (collagène de type III, glyco-amino-glycanes, chitosane, (Vaissiere *et al*, 2000 ; Berthod *et al*, 1996 ; Anselme *et al*, 1990). Pour retarder

leur dégradation, la majorité des éponges utilisées *in vivo* sont réticulées par des agents chimiques comme le glutaraldehyde (Levy *et al.*, 1986), le formaldéhyde (Vaissiere *et al.*, 2000) ou par rayonnement ultra violet (Miyata *et al.*, 1971 ; Torikai et Shibata, 1999). La nécessité de l'utilisation de ces molécules chimiques, aux pouvoirs toxiques et allergènes notoires, apparaît problématique pour leur implantation chez le patient.

Les matrices fibrillaires sont obtenues à partir de solutions acido solubles de collagène qui sont gélifiées par neutralisation du pH. Elles se présentent sous la forme d'un gel hydraté, solide, qui conserve la forme initiale du moule dans lequel la solution de collagène a été coulée (figure 29). Ces caractéristiques présentent des avantages de préparation et d'utilisation évidente.

Tout d'abord, l'utilisation de précurseurs en solution permet d'obtenir des matériaux de formes et de tailles choisies, définies par le moule dans lequel les solutions sont introduites. Ainsi, un matériau singulier peut être préparé aisément, pour s'adapter au mieux à la forme du défaut à réparer. Leur manipulation n'a pas présenté de problèmes particuliers. Les dimensions des matrices fibrillaires ont pu être modifiées pour être implantées dans un défaut crânien de 5mm de diamètre sans que cela n'affecte ni leur manipulation ni leur structure microscopique (figure 25). Il faut cependant préciser que la bonne tenue mécanique des matrices et leur facilité de manipulation n'est pas uniquement due à l'organisation des molécules de collagène en fibrilles striées, par opposition à la structure microfibrillaire des molécules de collagène dans les éponges. La concentration en collagène des matériaux est également un facteur important. Nous avons observé qu'en deçà d'une concentration en collagène de ~1mg/mL les matrices fibrillaires deviennent molles et doivent être manipulées délicatement pour ne pas être percées ou déchirées (figure 29). Toutefois, à concentration égale, les matrices fibrillaires se sont avérées plus faciles à utiliser que les éponges.

Le procédé d'obtention des matrices fibrillaires par une transition de type sol/gel donne un matériau hydraté qui les rendent directement compatibles avec le matériel biologique, sans nécessiter d'étapes supplémentaires de réhydratation, qui se sont avérées problématiques avec les éponges. La neutralisation du pH par diffusion de vapeurs d'ammoniaque permet de conserver la concentration des constituants des solutions et n'introduit pas de substances réactives chimiquement pouvant se lier de façon covalente avec les molécules de collagène. En effet, l'ammoniaque est une molécule volatile (T° ébullition

d'une solution de NH₃ à 30% dans l'eau : 38°C) et soluble (limite de solubilité dans l'eau à 0°C : 900g/L) qui est aisément éliminée par rinçage avec des solutions aqueuses tamponnées.

b) Comportement Cellulaire

Même si le comportement global du matériau face à l'acte chirurgical est important (Kneser *et al*, 2006), les capacités de l'implant à interagir avec les cellules de l'hôte et à favoriser la réparation du tissu lésé sont primordiales.

Eponges de collagène

La structure poreuse des éponges de collagène est très appréciée en ingénierie tissulaire, car elle permet une pénétration rapide des cellules au coeur du matériau où elles vont proliférer et combler les espaces vacants par la synthèse d'une nouvelle matrice (Anselme *et al*, 1990 ; Berthod *et al*, 1996 ; Mizuno et Glowacki, 1996). Au cours de nos expérimentations *in vitro* à long terme, les ostéoblastes ont étéensemencés à la surface des éponges où ils ont proliférés et adoptés une morphologie plate et allongée de cellules au repos de type bordants (figure 35 et 39). Aucune synthèse de collagène I n'a été mise en évidence, ni l'expression de la phosphatase alcaline.

De plus, un des résultats importants que nous avons obtenu avec l'utilisation des éponges de collagène est l'absence d'ostéoblastes à l'intérieur des éponges et ce, malgré leur structure poreuse. Les études montrant la colonisation d'éponges de collagène, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, par des fibroblastes et des ostéoblastes ont été réalisées avec des éponges de collagène supplémentées par des molécules de la MEC, ou réticulées chimiquement (Vaissière *et al*, 2000; Berthod *et al*, 1996; Anselme *et al*, 1990).

Les éponges que nous avons préparées présentaient à l'interface collagène/air une surface dense et brillante que l'on peut définir comme une croûte. Elle apparaissait en microscopie à balayage pleine et sans connection avec le réseau poreux sous-jacent (figure 29 et 32). Doillon et collaborateurs, dans leurs travaux sur l'influence du pH de la solution de collagène et de la température de lyophilisation sur la structure des éponges, ont décrit pour nos conditions de préparation des éponges, la présence de telles structures à l'interface collagène/air (Doillon *et*

al, 1986). D'autres études rapportent, pour des conditions de température et de pH différentes des nôtres, la formation « d'une peau brillante et non poreuse à l'interface collagène/air » qui a empêché la colonisation par les cellules des éponges implantées en sous cutané chez le rat (Mizuno et Glowacki, 1997).

Matrices fibrillaires de collagène

Pour les mêmes conditions de cultures, les ostéoblastes primaires et transformés ensemencés à la surface des matrices 5MG s'organisent en une monocouche épithélioïde (figures 35 et 39). Elles se présentent sous la forme de cellules cuboïdes avec un large noyau et la présence d'un système réticulum endoplasmique – appareil de Golgi développé (figures 36 et 40). Ces caractéristiques morphologiques sont celles décrites *in vivo* pour les ostéoblastes matures à la surface des pièces osseuses (Bloom et Fawcett, 1968 ; Mackie, 2003). Après 4 semaines de culture, les ostéoblastes expriment la phosphatase alcaline à leur membrane plasmique (figure 44).

Ces résultats démontrent les propriétés ostéoconduites des matrices fibrillaires 5MG *in vitro*, par rapport au comportement bordant qu'adoptent les ostéoblastes à la surface des éponges. Cependant, comme sur les éponges, nous n'avons pas observé la sécrétion de collagène de type I à la surface des matrices. Bien que la synthèse de collagène par les ostéoblastes soit essentielle pour leur rôle biologique, et constitue un marqueur de leur maturité, une diminution de son expression a été rapportée pour des fibroblastes (type cellulaire également spécialisé dans la synthèse de collagène) et des ostéoblastes cultivés sur un réseau de collagène par rapport à leur culture sur boîte de Pétri (Nusgens *et al*, 1984 ; Lynch *et al*, 1995). Nous pouvons supposer à partir de ces données qu'avec des concentrations en collagène supérieures, comme celles des matrices fibrillaires, la synthèse de collagène ait pu être inhibée.

Alors que la structure poreuse des éponges devait favoriser leur colonisation par les ostéoblastes, l'organisation monolithique (*bulk structure*) des matrices fibrillaires apparaissait *a priori* être une limite à leur colonisation (Karageorgiou et Kaplan, 2005). L'analyse ultrastructurale qualitative et quantitative des matrices 5MG a montré que ~95% de son volume était libre de tout matériel avec des interdistances entre fibrilles de collagène de environ 1-5µm (figures 32 et 33, tableau 1). Ces espaces se sont avérés suffisants pour

permettre aux ostéoblastes de pénétrer de façon continue dans les matrices 5MG durant les 4 semaines de culture *in vitro* (figures 35 et 39). L'absence de travées autour des cellules dans la matrice et de synthèse de metalloprotéases (MMP-9 et MMP-13) indique que les cellules se sont déplacées à travers le réseau fibrillaire sans le dégrader. Ces résultats, dans une certaine mesure, remettent en cause les prérequis de porosité des implants osseux où un diamètre de pores supérieur à 300µm est attendu pour permettre la pénétration des ostéoprogéniteurs et des cellules endothéliales (Karageorgiou et Kaplan, 2005).

Minéralisation des matrices et des éponges *in vitro*

Comme l'expression de la phosphatase alcaline ou la synthèse de collagène, la minéralisation est également un marqueur de la différenciation ostéoblastique. L'ajout de phosphate inorganique (PO_4^{3-}) dans le milieu de culture a entraîné la formation de dépôts de phosphate de calcium dans les matrices 5MG avec un gradient décroissant à partir de la surface (figure 41).

Une minéralisation des éponges est également observée mais les dépôts minéraux ne sont observés que sur une profondeur limitée de ~100µm à partir de la surface. De plus, en l'absence d'ostéoblastes, les éponges présentent également la formation d'un précipité de phosphate de calcium à leur surface qui n'a, à aucun moment, été observé pour les matrices fibrillaires cultivées dans les mêmes conditions acellulaires. La structure du collagène dans les éponges sous forme de microfibrilles de diamètre de ~20nm semble donc favoriser la nucléation et la croissance spontanée de minéraux sans nécessiter d'activité cellulaire. À l'inverse, le collagène sous forme de fibrilles striées nécessite la présence et l'action des ostéoblastes pour provoquer leur minéralisation. La minéralisation ectopique d'éponges de collagène a déjà été rapportée lors de leur implantation sous cutanée chez l'animal (Van de Putte et Urist, 1965 ; Levy *et al*, 1986 ; Alselme *et al*, 1990).

Alors que ces phénomènes de minéralisation spontanée des matériaux sont délétères pour la réparation tissulaire lorsque ceux-ci sont implantés dans des tissus non minéralisés (exemple des valves cardiaques ou des *stents* vasculaires), ils pourraient apparaître bénéfiques dans la réparation du tissu minéralisé qu'est l'os. Cependant, la nature spontanée de cette minéralisation la place *de facto* hors d'un processus biologique normal, comme c'est le cas dans l'os où les ostéoblastes synthétisent la matrice organique qu'ils minéralisent par la suite.

On attend d'un matériau implanté dans un tissu qu'il guide l'activité cellulaire afin de reproduire sa physiologie et non de la supplanter (Horch, 2008). De part ces considérations, la minéralisation spontanée des éponges ne peut apparaître comme un avantage dans le développement de matériaux pour la reconstruction de l'os.

2. Bénéfices d'une concentration élevée en collagène

Nous venons de voir que l'organisation des molécules de collagène en fibrilles striées dans les matrices 5MG améliore le comportement mécanique global du matériau et lui confère des propriétés ostéoconduites très intéressantes. Cette concentration de 5mg/mL, comme utilisé avec les matrices 5MG, représentent la concentration la plus élevée rencontrée dans la littérature pour la préparation de gels hydratés de collagène (Elsdale et Bard, 1972 ; Mizuno *et al*, 1997 ; Wiesmann *et al*, 2003).

A ce jour, l'os de cadavre déminéralisé représente le système acellulaire de réparation osseuse qui donne les meilleurs résultats (Urist *et al*, 1965; Burg *et al*, 2000 ; Rah, 2000) ce qui indique l'importance de la composition biochimique et de l'organisation structurale du matériau pour favoriser la réparation du tissu osseux. Avec l'augmentation de la concentration, les molécules de collagène en solution s'organisent en des textures cristallines liquides qui reproduisent l'arrangement des molécules dans les tissus de soutien comme le derme ou l'os (Giraud-Guille, 1996 ; Giraud-Guille *et al*, 2005). Ces organisations moléculaires peuvent être stabilisées, pour donner naissance à un matériau fibrillaire solide qui possède une organisation proche du tissu à réparer (Besseau et Giraud-Guille, 1995). Des études récentes de diffusion des rayons X et en microscopie électronique à transmission montrent que ces architectures « *bone-like* » sont obtenues pour des concentrations en collagène supérieures à 60mg/mL pour les molécules en solution (Gobeaux *et al*, 2007) et des concentrations au moins trois fois supérieures pour les molécules sous forme de fibrilles (Gobeaux *et al*, 2008).

L'utilisation de matériaux dense en collagène pour la reconstruction osseuse est relativement nouvelle et peu référencée (Buxton *et al*, 2008). Pour des raisons de plus grande facilité, de rapidité et de contrôle dans l'obtention de tels matériaux, nous avons préparé des matrices fibrillaires de collagène à partir de solution concentrée à 40mg/mL pour former les

matrices 40MG. Cette concentration est inférieure à celles attendues pour obtenir une organisation cholestérique du collagène, comme observée dans l'os, mais elle entraîne déjà une modification importante de la structure et de l'organisation des fibrilles par rapport aux matrices 5MG (cf. Chapitre I).

Les bénéfices que peuvent apporter la concentration en collagène pour la réparation de l'os ont été évalués par une étude *in vitro* à long terme et dans un modèle de craniotomie chez le rat, en comparant les résultats obtenus avec les matrices 5MG et 40MG.

Comportement *in vitro*

En culture *in vitro* à long terme, les ostéoblastes ensemencés à la surface des matrices 40MG adoptent une morphologie de cellules bordantes caractérisée par des cellules plates et allongées, ne présentant pas de système RE-Golgi développé en ultrastructure et n'exprimant pas la phosphatase alcaline (figures 35, 38 et 39). Cependant, l'ajout de phosphate inorganique au milieu de culture entraîne la formation d'un précipité de phosphate de calcium dans la matrice qui est directement liée à l'activité métabolique des ostéoblastes, comme vérifié pour les matrices 40MG cultivées dans des conditions acellulaires (figure 41). Toutefois, à la vue des résultats obtenus *in vitro*, les matrices 40MG présentent des propriétés ostéoconduites moindres que les matrices 5MG.

L'augmentation de la concentration en collagène a entraîné plusieurs changements dans la structure et l'organisation des matrices 40MG par rapport aux matrices 5MG. La surface est devenue plus compacte avec des fibrilles plus larges (figures 30-33). Ceci a eu pour effet d'augmenter la rigidité du support, ce qui est recherché pour obtenir de bonnes propriétés mécaniques. Mais cela a également modifié la topographie de surface, le nombre des sites d'adhésions disponibles pour les ostéoblastes, ainsi que leur distribution. Ces paramètres structuraux ont une influence directe sur la qualité de l'adhésion des cellules et donc sur leur capacité à proliférer et à se différencier (Anselme, 2000). La densité en collagène et la rigidité du support agissent de concert sur l'étalement des cellules. Un étalement maximal a ainsi été observé pour des cellules musculaires lisses sur des matériaux présentant la plus grande rigidité et la plus forte densité en molécules de collagène par rapport à une rigidité moindre avec le même nombre de sites d'adhésion ou l'inverse (rigidité

maximale, adhésion minimale) (Engler *et al*, 2004). Ces données pourraient expliquer les différences de morphologies observées entre les matrices 5MG et les matrices 40MG.

Les ostéoblastes ont été cultivés sur les matériaux dans des conditions minimales, sans l'ajout de molécules stimulants la différenciation ostéoblastiques (BMP, TGF- β , dexaméthosone...) ou l'utilisation de systèmes de perfusions ou de bioréacteurs qui permettent le maintien du phénotype (Meyer *et al*, 2006). Les systèmes *in vitro* sont par définition des systèmes modèles qui ne reflètent qu'en partie les conditions rencontrées par les cellules *in situ*. Ainsi nous supposons -et espérons- un comportement plus favorable, quant au maintien du phénotype ostéoblastique, des matrices 40MG soumises aux actions stimulatrices des nombreux facteurs que l'on trouve *in vivo*, et en particulier sur le site d'une plaie osseuse.

Comportement in vivo

Après 4 semaines dans un défaut crânien de 5mm de diamètre chez le rat, les matrices fibrillaires 5MG et 40MG ont favorisé la formation d'os néosynthétisé par rapport à la réparation spontanée du défaut (figures 49-52). Plus de 80% de la surface du défaut a été comblée, les animaux traités avec les matrices 40MG présentant un pourcentage de comblement légèrement supérieur (statistiquement non significatif) à ceux ayant reçu les matrices 5MG. En l'absence de matériau, seul 25% des animaux ont réparé spontanément, donnant une moyenne de comblement inférieure à 40%. Ces résultats sont extrêmement positifs au regard de ce que l'on peut trouver dans la littérature. Pour les mêmes conditions expérimentales que les nôtres, les éponges de collagène non réticulées implantées dans des défauts crâniens ne sont plus observées après 4 semaines, et n'ont pas eu le temps d'avoir une activité régénératrice (Lafont *et al*, 1998 ; Colombier *et al*, 1999). L'autre extrême est également observé dans le traitement de larges défauts (*large bone defects*) dans un os long (tibia) avec un matériau à base d'hydroxyapatite stœchiométrique qui n'a quasiment pas été dégradé par l'organisme et se retrouve associé avec l'os néoformé jusqu'à 7 ans après son implantation (Quarto *et al*, 2001 ; Marcacci *et al*, 2007).

Les matrices ont été plus ou moins dégradées en fonction de leur concentration, le taux de dégradation maximal étant observé avec les matrices les moins concentrées (77% de dégradation pour les matrices 5MG, 39% pour les matrices 40MG). La dégradation des matériaux implantés est primordiale pour permettre au patient d'acquérir un tissu néosynthétisé intègre, sans résidus dont le comportement n'est pas maîtrisable dans le temps (LeGeros, 2002 ; Griffith, 2002 ; Kneser *et al*, 2006). Cependant, la dégradation doit être progressive, l'implant devant fonctionner comme une architecture temporaire pour les cellules jusqu'à ce que la lésion soit réparée (Cancedda *et al*, 2007).

La quantité d'os néoformé étant légèrement supérieure avec les matrices 40MG et la quantité de matrice à remanier restant plus importante que celles des matrices 5MG, on peut supposer que *in fine* c'est un os plus épais qui sera reconstruit dans le défaut traité avec les matrices les plus concentrées.

Quoiqu'il en soit, on constate qu'il est possible de moduler la vitesse de dégradation des matrices fibrillaires par la concentration en collagène, et sans que celle-ci ne limite la synthèse d'un nouveau tissu.

De façon globale, et en comparaison aux résultats obtenus *in vitro*, les matrices 40MG ont montré des propriétés ostéoconductive et ostéoinductive très intéressantes. Leur concentration élevée en collagène n'a pas empêché leur colonisation par les éléments du système vasculaire et les précurseurs ostéoblastiques, qui ont seulement été retardés dans leur progression par rapport à ce qui est observé avec les matrices 5MG. Il apparaît même que ce retard a eu une influence favorable sur la nature de l'os néoformé qui apparaît plus compact alors que des espaces médullaires relativement larges sont observés avec les matrices 5MG.

Une concentration en collagène de 40mg/mL a permis d'améliorer le comportement mécanique global du matériau et d'obtenir une reconstruction d'os significative dans un défaut crânien. Bien que cette concentration soit nettement inférieure à celles nécessaires pour obtenir l'organisation hélicoïdale des fibrilles de collagène, comme observé dans l'os compact, ces résultats démontrent les apports bénéfiques que peuvent avoir des matériaux fibrillaires denses en collagène. Ils valident donc l'intérêt à utiliser des matériaux de collagène denses et structurés pour la réparation osseuse. L'évaluation de l'apport d'une phase cholestérique au sein de ces matériaux devra être entreprise.

II Matrices fibrillaires de collagène : modèle tridimensionnel de matrice extra cellulaire

Les organismes pluricellulaires sont constitués de cellules associées à une matrice extra cellulaire leur servant de support. Les taches spécifiques, assurées par les tissus au sein d'un être vivant, doivent être considérées comme l'action synergique des interactions qui existent entre le couple cellules-matrices. La proportion de ces deux acteurs varie en fonction des tissus et dans le temps. D'un extrême à l'autre, on trouve les tissus conjonctifs où les cellules sont noyées à l'intérieur d'une matrice abondante, et les tissus épithéliaux où les cellules s'organisent en monocouches cohésives et polarisées, soutenues par le fin feuillet de la membrane basale.

Dans les tissus, les interactions des cellules, entre elles, et avec la matrice extracellulaire, ont lieu dans les trois dimensions de l'espace. A l'inverse, la majorité des connaissances de la biologie cellulaire proviennent de l'étude de cellules *in vitro* cultivées sur des supports en plastique, parfois supplémentés de molécules de la MEC, mais qui constituent un environnement en deux dimensions. L'utilisation récente de supports tridimensionnels pour l'étude de cellules *in vitro* a montré des différences, dans l'organisation du cytosquelette (Grinnell, 2003) et dans la transduction des signaux (Cukierman *et al*, 2002), par rapport à leur corollaire en deux dimensions.

Les ostéocytes sont les cellules majoritaires de l'os, environ 10 fois plus nombreuses que les ostéoblastes (Parfitt 1990). Leurs fonctions et leurs régulations restent cependant mal comprises. Leur localisation dans la masse osseuse, enchâssées dans les lacunes ostéocytaires et entourées par de la matrice osseuse calcifiée, contribue très fortement aux difficultés de l'étude de leur fonctionnement. L'établissement de lignées d'ostéocytes à partir de souris génétiquement modifiées par l'antigène grand T du virus SV-40 a permis des avancées, mais il est encore à ce jour difficile de conserver le phénotype d'ostéocytes en culture *in vitro* (Kato *et al*, 1997 et 2001). Ainsi la majorité des informations dont nous disposons aujourd'hui sur ce type cellulaire proviennent d'observations *in vivo*.

Ces considérations indiquent la nécessité de proposer des matériaux qui reproduisent la composition et l'architecture tridimensionnelle des matrices extra cellulaires pour pouvoir étudier des cellules *in vitro* au plus proche de leur contexte physiologique. Lors de nos expérimentations *in vitro* de culture à long terme d'ostéoblastes sur les matrices fibrillaires, un certain nombre de cellules ont pénétré dans les matrices. Le changement d'environnement,

entre la surface et l'intérieur, a entraîné un changement dans la morphologie des cellules. Depuis la morphologie ostéoïde de départ, les ostéoblastes de la lignée transformée prenaient une allure en fuseaux bipolaires alors que les ostéoblastes de la lignée primaire adoptaient une morphologie dendritique. Nous discuterons deux aspects : la question de la migration des ostéoblastes dans les matrices fibrillaires et celle de leur différenciation éventuelle en ostéocytes.

1. Migration des ostéoblastes dans les matrices fibrillaires

A la surface des matrices fibrillaires 5MG, les ostéoblastes de la lignée transformée que nous avons utilisé sont de forme cubique et organisés en une monocouche épithélioïde (figure 35). Ces caractéristiques morphologiques sont celles classiquement décrites pour les ostéoblastes à la surface de la matrice osseuse *in vivo* (Mackie, 2003). Après 7 jours de culture, des ostéoblastes sont retrouvés dans les matrices 5MG et leur nombre augmente au cours de l'expérimentation, tout en restant minoritaire par rapport aux cellules en surface, à savoir 3% du total des ostéoblastes. Les ostéoblastes dans les matrices fibrillaires ont une forme en fuseau bipolaire de type fibroblastique ou mésenchymateuse (figure 35 et 55). Cette morphologie correspond à un phénotype migratoire.

En effet, le changement de morphologie entre les ostéoblastes en surface et les ostéoblastes dans la matrice, peut être apparenté à une transition épithélio-mésenchymateuse. Ce phénomène biologique, originellement défini lors de la formation des cellules mésenchymateuses à partir des épithéliums embryonnaires, est associé à un phénotype migratoire. Il est notamment rencontré au cours du développement embryonnaire, lors de la délamination des cellules de la crête neurale, ou de l'acquisition d'un caractère invasif par des cellules tumorales (Thiery, 2003 ; Thiery et Sleeman, 2006).

Deux types de migration cellulaire sont décrits : la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse. La première est observée pour les lymphocytes qui vont se déformer pour se glisser à travers le maillage de la matrice extra cellulaire qu'ils doivent traverser, en adoptant une morphologie arrondie ou elliptique. Le second mode de migration est employé par les cellules stromales (type fibroblastes) et les cellules des tumeurs solides. Suivant ce mode de migration les cellules s'allongent en fuseau comportant deux ou trois prolongement

qui servent de points d'ancrages et de tractions pour entraîner le déplacement de la cellule (Friedl et Bröcker, 2000 ; Wolf *et al*, 2007). Nos observations morphologiques correspondent à ce mode de migration cellulaire. Cependant, la migration de type mésenchymateuse est associée à une synthèse de protéases et à un remaniement de la matrice que nous n'avons pas observé pour nos cellules. En effet, aucune trace de digestion de la matrice n'a été observée, ni sur le parcours ni autour de la cellule (figure 55), et les détections immunohistologiques des metalloprotéases MMP-9 et MMP-13 étaient négatives.

Cependant, les ostéoblastes ne sont pas définis comme des cellules migrantes ou invasives, et leur implication dans le remaniement de la matrice osseuse par la synthèse de metalloprotéases n'intervient que dans certaines conditions physiologiques, notamment lors de l'application de pressions mécaniques importantes (Goda *et al*, 2008 ; Chang *et al*, 2008). Il est possible qu'une digestion discrète de la matrice ait eu lieu, permettant le passage des ostéoblastes à travers le réseau fibrillaire des matrices 5MG sans que ce remaniement ne puisse être détecté. Ce manque d'activité lytique pourrait également expliquer l'absence de migration des ostéoblastes dans les matrices 40MG, dont le maillage plus dense et le diamètre des fibrilles plus important (figure 31-33) nécessite d'être dégradé plus activement. C'est ce qui a été observé avec des fibroblastes dermiques humains, qui sont pour leur part des cellules à caractère invasif, lorsqu'ils ont été ensemencés sur les mêmes matrices denses à 5 et 40 mg/mL (Hélary *et al*, 2005 et 2006).

Des ostéoblastes de la lignée primaire ont également pénétré dans les matrices fibrillaires 5MG et subi un changement de morphologie. En revanche, cette morphologie apparaît totalement différente de celle observée pour les cellules de la lignée transformée (figure 55). Leur forme dendritique avec de nombreux prolongements, orientés dans les trois directions de l'espace, ne semble pas compatible avec une migration unidirectionnelle et ne correspond ni au modèle de migration amiboïde ni au modèle de migration mésenchymateuse. Elle rappelle plutôt les ostéocytes retrouvés à l'intérieur de la masse osseuse et nous avons entrepris de confirmer ce phénotype.

Cependant, les ostéoblastes ayant été ensemencés à la surface des matrices, ils ont nécessairement migré à travers le réseau fibrillaire de collagène pour se retrouver à des profondeurs atteignant jusqu'à 500µm. Pourtant ces cellules dans la matrice n'ont pas été observées sous une forme en fuseau bipolaire. Nos observations, à partir de la surface des matrices, semblent indiquer la présence de prolongements qui se ramifient vers l'intérieur de la matrice pour des cellules dont le corps cellulaire est encore à la surface (figure 56).

Nous n'avons pas, à ce jour, d'interprétations quant aux processus qui ont permis aux ostéoblastes de la lignée primaire de se retrouver à l'intérieur des matrices fibrillaires de collagène.

2. Différenciation des ostéoblastes en ostéocytes

Bien que l'origine des ostéocytes à partir d'une différenciation continue des ostéoblastes soit connue depuis la seconde moitié du XIX^e siècle, de nombreuses questions restent irrésolues sur leur processus de différenciation et leur rôle dans la physiologie de l'os. Du fait de leur présence au cœur de la matrice osseuse minéralisée, les connaissances de la biologie des ostéocytes sont essentiellement représentées par des études en histomorphométrie et en ultrastructure (Knothe Tate *et al*, 2004). Les ostéocytes sont majoritairement présents dans la matrice osseuse de l'os compact, enchâssés au sein des lacunes ostéocytaires, et connectés avec les ostéoblastes en surface et les ostéocytes environnants par un réseau de longs prolongements qui sont projetés à travers les canalicules (Mackie, 2003 ; Franz-Odenaal *et al*, 2006).

Au fur et à mesure que les ostéoblastes matures déposent le tissu ostéoïde, certains d'entre eux se retrouvent prisonniers de cette matrice et entament le processus de différenciation en ostéocyte. L'étude en microscopie électronique à transmission de coupes sériées de tibia d'embryons de poulets a révélé la transformation des ostéoblastes « rondouillards » (*plump*), qui se retrouvent piégés dans le tissu ostéoïde, en ostéocytes « étoilés » (*stellar*) dont des prolongements cytoplasmiques émergent du corps cellulaire en direction de la matrice minéralisée. La formation de ces prolongements s'accompagne d'une réduction d'environ 70% de la taille du corps cellulaire, qui se retrouve réduit au noyau et à une fine bande de cytoplasme (Palumbo, 1986).

Dans nos échantillons, la transition morphologique opérée par les ostéoblastes de la lignée primaire présents à l'intérieur des matrices fibrillaires, apparaît équivalente au processus de différenciation *in vivo* des ostéoblastes en ostéocytes. Une différence notable, toutefois, est que les cellules ne se sont pas faites recouvrir par une matrice de collagène mais ont pénétré d'elles-mêmes à l'intérieur. Nous avons observé pour ces cellules la présence de prolongements qui émergent du corps cellulaire et se ramifient rapidement dans les trois directions de l'espace, leur donnant une morphologie dendritique (figures 55 et 56). Une diminution de la taille de leur corps cellulaire est également observée, résultant très

certainement d'un transfert de cytoplasme vers la formation des prolongements. Leur analyse ultrastructurale montre que le corps cellulaire est réduit au noyau et à une fine bande de cytoplasme de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. Nous avons également observé que les cellules à l'intérieur de la matrice présentaient un réticulum endoplasmique développé associé aux ribosomes (figure 59 A et B). Les ostéocytes sont des cellules peu actives, dont la durée de vie est estimée à une vingtaine d'année (Frost, 1963 ; Franz-Odenaal *et al*, 2006). Cependant, tout comme il existe un processus continu de différenciation des ostéoblastes jusqu'à leur pleine maturité, les ostéocytes subissent également une maturation au fur et à mesure de leur enfouissement et de la minéralisation de la matrice néosynthétisée. Les ostéocytes les plus jeunes présentent un réticulum endoplasmique abondant (Palumbo *et al*, 2004 ; Knothe Tate *et al*, 2004).

L'implication des éléments du cytosquelette dans la formation et le maintien des prolongements cellulaires des ostéocytes a été étudié *in vitro* à partir d'ostéocytes purifiés d'embryons de poulets (Tanaka-Kamioka *et al*, 1997 ; Kamioka *et al*, 2004) ou de cellules ostéoblastiques de souris différenciées *in vitro* sur des gels contenant du collagène IV et de la laminine (Matrigel[®]) (Vukicevic *et al*, 1990). Ces études de différenciation *in vitro* montrent une réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la transition ostéoblaste-ostéocyte, avec la perte des fibres de stress présents chez l'ostéoblaste et leur développement dans les prolongements cellulaires. L'ajout d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (Latrunculine B et Cytochalasine D) entraîne la rétraction des prolongements autour du corps cellulaire, alors que la perturbation des microtubules par le Nocodazole est sans effet sur la morphologie des ostéocytes (Tanaka-Kamioka *et al*, 1997).

Nous avons également observé, par marquage fluorescent de l'actine, la perte des fibres de stress entre les ostéoblastes en surface et dans la matrice (figure 57). Le marquage de l'actine apparaît dans les prolongements et les corps cellulaires diffus et cortical, délimitant essentiellement les contours des cellules dans la matrice. Il n'apparaît pas évident, au regard de nos résultats, que le cytosquelette d'actine ait été redéployé sous la forme de fibres de stress, dans les prolongements cellulaires.

Une des caractéristiques des ostéocytes, est d'être reliés entre eux et avec les ostéoblastes à la surface de l'os par leurs prolongements, formant ainsi un réseau de cellules dans l'intégralité d'une pièce osseuse. L'idée que ce réseau serait sensible aux contraintes mécaniques, par modification du flux ionique passant dans les canalicules, est proposée. Ceci

permettrait de déclencher un remodelage ciblé des zones profondes de l'os par le recrutement des cellules en surface (Marotti, 2000 ; Stains et Civitelli, 2005). Les études en ultrastructure des ostéocytes *in vivo* ont montré que ceux-ci étaient reliés entre eux par des jonctions communicantes (*gap junctions*) à l'extrémité de leur prolongements (*end-to-end*) ou sur leurs côtés et leurs corps cellulaires (*side-to-side*) (Doty, 1981 ; Palumbo *et al*, 1990 a et b). Les jonctions communicantes sont des canaux organisés à travers les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. Formées par l'assemblage multimérique des protéines connexines, celles-ci forment un pore étroit qui permet le passage de molécules de masse moléculaire inférieure à 1-1,5kDa (Xin Jiang *et al*, 2007). La présence de ces jonctions permet le transit de petites molécules à activité de signalisation cellulaire, comme les ions calcium ou l'inositol phosphate. La présence de jonctions communicantes entre le réseau continu d'ostéocytes transforme ce système cellulaire en un syncytium fonctionnel qui permet l'existence d'un dialogue direct entre les ostéoblastes en surface et les cellules les plus enfouies dans la matrice osseuse, ce qui renforce le rôle des ostéocytes comme cellules de garde de l'os (Donahue, 2000).

Les observations des ostéoblastes à l'intérieur des matrices fibrillaires ont également révélé que les cellules pouvaient être en contact par leurs prolongements cellulaires (figure 56). Par reconstruction tridimensionnelle des images acquises tous les 1µm sur une profondeur de 80µm, nous avons observé trois cellules reliées entre elles, à partir d'un ostéoblaste en surface jusqu'à une cellule extrêmement ramifiée en profondeur, par l'intermédiaire d'une cellule plus filiforme dans la matrice (figure 58). De plus, l'analyse en microscopie électronique à transmission montre la présence de contacts étroits entre les cellules dans la matrice, une jonction de type communicante a également pu être mise en évidence (figure 59).

Des analyses génétiques récentes chez l'homme et la souris ont mis en évidence la sclérostine comme étant spécifiquement exprimée par les ostéocytes. Cette protéine est retrouvée mutée chez les individus atteints de la maladie de Van Buchem qui se traduit par une hyper ostéose, et apparaît avoir une action inhibitrice sur la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes (van Bezooijen *et al*, 2005 ; Zhang *et al*, 2006). Dans nos échantillons, l'utilisation par immunohistologie d'anticorps, dirigés contre cette protéine, n'a pas permis de révéler sa présence dans les cellules enchâssées à l'intérieur des matrices fibrillaires. Toutefois, cette absence de marquage, malgré des tentatives répétées avec plusieurs anticorps dirigés contre la sclérostine humaine, semble plutôt liée à des problèmes de mises au point

méthodologiques, la détection de la sclérostine dans les ostéocytes de coupes contrôles d'os humains, étant également négative.

A la vue des données décrites pour les ostéocytes dans la littérature, nos observations morphologiques des ostéoblastes primaires dans les matrices de collagènes, apparaissent en adéquation avec leur différenciation en ostéocytes. La sclérostine reste à ce jour le seul marqueur identifié comme étant spécifiquement ostéocytaire. A défaut de pouvoir en tester d'autres, la morphologie dendritique, avec la présence de prolongements connectés entre eux ou avec les corps cellulaires par des jonctions communicantes, reste aujourd'hui un moyen pertinent pour identifier les ostéocytes (Knothe Tate *et al*, 2004 ; Franz-Odenaal *et al*, 2006).

Conclusion Générale

Lorsque cette étude a été initiée, il existait des réticences quant à l'utilisation de matériaux denses de collagène pour la reconstruction osseuse. Leur structure monolithique et l'absence de pores apparaissaient rédhibitoires pour leur colonisation par les cellules osseuses et celles du système vasculaire. La molécule de collagène était cependant reconnue comme biocompatible et résorbable, et déjà utilisée dans certains cas cliniques sous la forme d'éponges préparées à partir de solutions de collagène lyophilisées. Ce procédé permet d'obtenir un matériau très poreux, mais nous avons pu constater qu'en plus de propriétés mécaniques faibles, leur structure poreuse n'a pas été suffisante pour permettre leur colonisation par les ostéoblastes du fait de la formation d'une croûte rigide à leur surface, sans connexion avec les pores du matériau. Des solutions ont été mises en œuvre pour surpasser les défauts des éponges mais pas sans inconvénient, et avec des procédés de fabrication plus complexes.

Notre motivation à utiliser des matériaux denses en collagène résidait tout d'abord en l'amélioration des propriétés mécaniques globales du matériau obtenu à fortes concentrations. Les caractéristiques mécaniques d'un matériau à destinée clinique sont non seulement essentielles pour son implantation dans un tissu comme l'os, mais également nécessaires pour faciliter l'acte du chirurgien. Sur le plan mécanique, le procédé de formation d'un matériau à partir de solutions acides de collagène neutralisées par diffusion de vapeurs s'est avéré plus performant que la lyophilisation, et ce à concentration égale en collagène. L'augmentation de la concentration améliore la tenue mécanique des matériaux préparés suivant ce *process*, et la fluidité des solutions permet de donner au matériau la forme choisie.

Un second objectif dans l'utilisation de concentrations importantes en collagène était, à terme, d'obtenir un matériau dont l'organisation microscopique, et à grande distance, des fibrilles de collagène serait proche de celle observée dans l'os compact. Même si des différences importantes dans l'organisation des molécules et fibrilles de collagène ont été observées entre les matrices les moins et les plus concentrées, l'organisation rencontrée dans la matrice osseuse *in vivo* n'a pas été reproduite dans nos matériaux. L'utilisation d'une concentration en collagène de 40mg/mL pour la constitution des matrices les plus concentrées

Conclusion Générale

était un choix délibéré. Une concentration au moins trois fois supérieure aurait été requise pour obtenir *in vitro* une phase cholestérique stabilisée. Dans cette première approche, correspondant à nos premiers essais de ces matériaux en présence d'ostéoblastes, et liée à des considérations rationnelles d'obtention et de reproductibilité du matériau, nous sommes restés à des concentrations inférieures à celles rencontrées dans la matrice de l'os compact.

Les résultats de reconstruction d'un défaut osseux crânien avec les matrices 40MG sont prometteurs et leur colonisation par les cellules vasculaires et les progéniteurs ostéoblastiques indique que la concentration n'est pas une limite à la pénétration des cellules. Ces résultats permettent d'ouvrir la voie dans l'observation du comportement de cellules osseuses en contact avec une matrice cholestérique dans un contexte *in vitro* ou *in vivo*.

Toutefois, le modèle de réparation osseuse dans lequel les matrices fibrillaires ont été testées reste encore éloigné des attentes réelles de la médecine de reconstruction de l'os. Une étude de ces matériaux dans un *critical size defect* (i.e. ne pouvant se réparer spontanément) s'avère nécessaire pour nous renseigner sur leur potentiel d'utilisation clinique.

Il est tout de même plaisant de constater que c'est par le défaut supposé des matrices fibrillaires (i.e. colonisation cellulaire) qu'a été obtenu un des résultats les plus excitants de cette étude. Les ostéoblastes en culture *in vitro*, ensemencés en surface, ont pénétré dans les matrices 5MG et ont changé de forme. Les ostéoblastes de la lignée transformée utilisée dans cette étude sont apparus, à l'intérieur des matrices, avec une morphologie en fuseau bipolaire de type mésenchymateuse, en adéquation avec un phénotype migratoire. Les ostéoblastes primaires présents dans les matrices 1MG et 5MG sont apparus avec une morphologie dendritique tout à fait différente.

La description morphologique des ostéoblastes primaires qui se sont retrouvés dans un contexte tridimensionnel a montré la formation de nombreux et longs prolongements autour d'un corps cellulaire plus ramassé. De plus, nous avons pu mettre en évidence la présence de jonctions communicantes entre les cellules en contact. Ces résultats apparaissent suffisamment en accord avec les données de la littérature, pour émettre l'hypothèse que les ostéoblastes qui se sont retrouvés entourés par le réseau fibrillaire des matrices de collagène ont déclenché leur processus de différenciation ultime en ostéocyte. Toutefois, l'absence de preuves moléculaires du phénotype ostéocyte de ces cellules ne nous permet pas de l'affirmer.

Conclusion Générale

Des expériences supplémentaires, très certainement avec un nombre plus important d'ostéoblastes ensemencés à la surface des matrices, devront être entreprises pour voir se former un réseau étendu de cellules connectées, et mettre en évidence l'expression par ces cellules de la sclérostine. Des études par vidéomicroscopie permettraient également de comprendre les mécanismes de pénétration et de transformation de ces cellules dans les matrices fibrillaires.

Au parcours de ce manuscrit on retiendra l'intérêt d'une organisation structurale spécifique du collagène dans la constitution de biomatériaux pour leurs propriétés mécaniques et fonctionnelles. Nous montrons que l'augmentation conséquente de la concentration en collagène et sa nature fibrillaire permet d'obtenir des matériaux avec un réel potentiel thérapeutique pour la reconstruction osseuse. Etudes qu'il faudra bien sur amplifier dans l'avenir et approcher d'un modèle clinique.

La nature fibrillaire du collagène crée un réseau à travers lequel les cellules peuvent se déplacer et se retrouver dans un contexte tridimensionnel équivalent à celui qu'elles connaissent *in vivo*. Le fait de disposer de matériaux pouvant constituer des modèles tridimensionnels de matrices extra cellulaires pour l'étude de cellules *in vitro* apparaît de plus en plus nécessaire. Ces matrices, et notamment les plus denses, pourront être utilisées dans la détermination du caractère invasif de cellules tumorales, ou dans l'étude du remodelage osseux par les ostéoclastes sur des matrices fibrillaires minéralisées.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

Anselme K, Bacques C, Charriere G, Hartmann DJ, Herbage D, Garrone R. Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural and immunological study. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24: 689-703.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000; 21: 667-681.

Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/Sciences.* 2001 ; 17 : 1260-1269.

Bauch H et Schaffer J. Optical sections by means of structured illumination: background and application in fluorescence microscopy. *Photonik Int.* 2006. 86-88.

Bergaman I et Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* 1963; 35: 1961-63.

Berthod F, Sahuc F, Hayek D, Dalour O, Collombel C. Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblast in a collagen sponge. *J. Biomed. Mat. Res.* 1996; 32: 87-94.

Bertrand L, Roubaud M. L'emploi du microscope polarisant. Ed. Lemarre J. Paris. 1969.

Besseau L et Giraud-Guille MM. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelled matrices. *J. Mol. Biol.* 1995; 251: 197-201.

Blanquaert F, Saffar JL, Colombier ML, Carpentier G, Barritault D, Caruelle JP. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone.* 1995; 17: 499-506.

Bloom W et Fawcett DW. A textbook of histology. Ninth edition. W.B. Saunders Compagny 1968.

Références Bibliographiques

- Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J. Cell. Biochem.* 1998; 72 S30/31: 297–303.
- Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008; 42: 606-615.
- Boot-Handford RP, Tuckwell DS. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays.* 2003; 25: 142–151.
- Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J. Bone. Miner. Res.* 1999; 14: 330-334.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Bruder SP et Fox BS. Tissue engineering of bone, cell based strategies. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1999; 367S: S68-S83.
- Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000; 21: 2347-2359.
- Buxton PG, Bitar M, Gellynck K, Parkar M, Brown RA, Young AM, Knowles JC, Nazhat SN. Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition. *Bone.* 2008; 43: 377-385.
- Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials.* 2007; 28: 4240-4250.
- Canty EG et Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell. Science.* 2005; 118: 1341-1353.
- Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 961: 96-105.

Références Bibliographiques

Chang HH, Wu CB, Chen YJ, Weng CY, Wong WP, Chen YJ, Chang BE, Chen MH, Yao CC. MMP-3 response to compressive forces in vitro and in vivo. *J. Dent. Res.* 2008; 87: 692-696.

Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, Pagani S, Guizzardi S, Causa F, Giunti A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials.* 2003; 24: 3815-3824.

Colombier ML, Lafont J, Blanquaert F, Caruelle JP, Barritault D, Saffar JL. A single low dose of RGTA, a new healing agent, hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cell. Tissue. Organ.* 1999; 164: 131-40.

Colombier ML, Lafont J, Blanquaert F, Caruelle JP, Barritault D, Saffar JL. A single low dose of RGTA, a new healing agent, Hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cell Tissue Organs.* 1999; 164: 131-140.

Cornell CN. Proper design of clinical trials for the assessment of bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1998; 355S: S347-S352.

Cukierman E, Roumen P, Yamada KM. Cell interactions with tree-dimensional matrices. *Cur. Opin. Cell. Biol.* 2002; 14: 633-639.

Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GE. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1489-1498.

de Pollak C, Arnaud E, Renier D, Marie PJ. Age-related changes in bone formation, osteoblastic cell proliferation, and differentiation during postnatal osteogenesis in human calvaria. *J. Cell. Biochem.* 1997; 64: 128-139.

Débarre D, Pena AM, Supatto W, Boulesteix T, Strupler M, Sauviat MP, Martin JL, Schanne-Klein MC, Beaurepaire E. Microscopies multiharmoniques pour l'imagerie structurale de tissus intacts. *Medicine/Sciences.* 2006; 22: 845-850.

Références Bibliographiques

Debiais F, Hott M, Graulet AM, Marie PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J. Bone. Miner. Res.* 1998; 13: 645–654.

Doillon CJ, Whyne CF, Brandwein S, Silver FH. Collagen-based wound dressings: control of the pore structure and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.* 1986; 20: 1219-1228.

Donahue HJ. Gap Junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone.* 2000; 26: 417-422.

Doty SB. Morphological evidence gap junctions between bone cells. *Calcif. Tissue. Int.* 1981; 33: 509–512.

Dubernard JM. L'éthique biomédicale. Rencontres Jacques Cartier. Lyon, 2007.

Eglin D, Mosser G, Giraud-Guille MM, Livage J, Coradin T. Type I collagen, a versatile liquid crystal biological template for silica structuration from nano to microscopic scales. *Soft Matter.* 2005; 1: 129-131.

Elsdale T et Bard J. Collagen substrata for studies on cell behaviour. *J Cell Biol.* 1972; 54: 626-637.

Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Dischery D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal.* 2004; 86: 617–628.

Ferdous Z, Grande-Allen KJ. Utility and control of proteoglycans in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007; 13: 1893-1903.

Franz-Odendaal TA, Brian KH, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 2006; 235: 176-190.

Frost HM. In vivo osteocyte death. *J. Bone Joint. Surg.* 1960. 42A. 138-143.

Références Bibliographiques

Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2003; 55: 1613-1629.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003; 55: 1531-46.

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; 88: 873–884.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2005; S35: S20-S27.

Giraud-Guille MM, Mosser G, Hélyary C, Eglin D. Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials. *Micron.* 2005; 36: 602-608.

Giraud-Guille MM. Twisted liquid crystalline supramolecular arrangements in morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 1996; 166: 59-101.

Giraud-Guille MM. Twisted Plywood Architecture of collagène fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue. Int.* 1988; 42: 167-180.

Glowacki J et Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2007; 89: 338-344.

Gobeaux F, Belamie E, Mosser M, Davidson P, Panine P, Giraud-Guille MM. Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state. *Langmuir.* 2007; 23: 6411-6417.

Gobeaux F, Mosser G, Anglo A, Panine P, Davidson P, Giraud-Guille MM, Belamie E. Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study. *J. Mol. Biol.* 2008; 376: 1509-1522.

Goda S, Inoue H, Kaneshita Y, Nagano Y, Ikeo YT, Iida J, Domae N. Emdogain stimulates matrix degradation by osteoblasts. *J. Dent. Res.* 2008; 87: 782-787.

Références Bibliographiques

Griffith LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 961: 83-95.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends. Cell. Biol.* 2003; 13: 264-269.

Hay E, Hott M, Graulet AM, Lomri A, Marie PJ. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* 1999; 72: 81–93.

Hélary C, Foucault-Bertaud A, Godeau G, Coulomb B, Giraud-Guille MM. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials.* 2005; 26: 1533-1543.

Hélary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials.* 2006; 27: 4443-4452.

Hill PA et Orth M. Bone Remodelling. *Br. J. Orthodont.* 1998 ; 25: 101-107.

Hodge AJ et Petruska JA. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecules. *Aspects of Protein Structure.* ed. Ramachandran G.N. Academic Press, New-York . 1963: 289-300.

Horch RE. Future perspectives in tissue engineering *J. Cell. Mol. Med.* 2008.

Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials.* 2006; 27: 5089-5098.

Hutmacher DW et Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J. Cell. Moll. Med.* 2007; 11: 654-669.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000; 21: 2529-2543.

Références Bibliographiques

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagen at a glance. *J. Cell. Science.* 2007; 120: 1955-1958.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* 1996; 316: 1-11.

Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Suzuki O. Octacalcium Phosphate Combined with Collagen Orthotopically Enhances Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater.* 2006 ; 79B: 210–217.

Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblast to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J. Bone. Miner. Res.* 2004; 19: 471-478.

Karageorgiou V et Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005; 26: 5474–5491.

Katagiri T et Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral. Diseases.* 2002; 8: 147-159.

Kato Y, Boskey A, Spevak L, Dallas M, Hori M, Bonewald LF. Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *J. Bone. Miner. Res.* 2001; 16: 1622-33.

Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J. Bone. Miner. Res.* 1997; 12: 2014–2023.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.* 2006; 10: 7-19.

Knothe Tate M L, Adamson J R, Tami A E, Bauer TW. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004; 36: 1–8.

Références Bibliographiques

Kuklo TR, Groth AT, Anderson RC, Frisch HM, Islinger RB. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for grade III open segmental tibial fractures from combat injuries in Iraq. *J. Bone. Joint. Surg. [Br]*. 2008; 90-B: 1068-72.

Lafont J, Baroukh B, Berdal A, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, Saffar JL. RGTA11, a new healing agent, triggers developmental event during healing of craniotomy defects in adults rats. *Growth Factors*. 1998; 16: 23-38.

Langer R et Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920–926.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharma*. 2001; 221: 1-22.

Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue. Eng. Part B*. 2008 ; 14: 61-86

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 2002; 395: 81-98.

Levy RJ, Schoen FJ, Sherman FS, Nichols J, Hawley MA, Lund SA. Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponge. *Am. J. Pathol*. 1986; 122: 71-82.

Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med*. 2005; 9: 72-84.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp. Cell. Res*. 1995; 216: 35-45.

Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*. 2004; 71B: 343-354.

Références Bibliographiques

Mackie E J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2003; 35: 1301-1305.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews.* 2000; 21: 115–137.

Marcacci M, Kon K, Mukhachev V, Lavroukov, Kutepov SM, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007; 13: 947-955.

Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Medecine/Sciences.* 2001 ; 17 : 1252-1259.

Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 2000; 1: 133-136.

Martoja R et Martoja-Pierson M. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et C^{ie}. Paris. 1967.

Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons. *Q. J. Med.* 2002: 95 ; 3-13.

McLaughltn SH, Bulleid N. Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix. Biol.* 1998; 16: 369-377.

Meyer U, Büchter A, Nazer N, Wiesmann HP. Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2006; 44: 134–140.

Miyata T, Sohde T, Rubin AL, Stenzel KH. Effects of ultraviolet irradiation on native and telopeptide-poor collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1971; 229: 672-680.

Références Bibliographiques

- Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone*. 1997; 20: 101-107.
- Mosekilde L, Ebbesen E.N., Tornvig L, Thomsen J.S. Trabecular bone structure and strength -remodelling and repair. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 2000; 1: 25-30.
- Mosser G, Anglo A, Hélyary C, Bouligand Y, Giraud-Guille MM. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix. Biol.* 2006; 25: 3-13.
- Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J. Struct. Biol.* 1999; 126: 256–269.
- Nusgens B, Merrill C, Lapière C, Bell E. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vivo. *Collagen. Relat. Res.* 1984; 4: 351-364.
- O’Grady JE, Bordon DM. Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003; 55: 1699– 1721.
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends. Cell. Biol.* 2004; 14: 86-93.
- Palumbo C, Ferretti M, Marotti G. Osteocyte dendrogenesis in static and dynamic bone formation: an ultrastructural study. *Anat. Rec. Part A.* 2004; 278: 474–480.
- Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*. 1990a; 11: 401-406.
- Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: An ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta. Anat.* 1990b; 137: 350–358.

Références Bibliographiques

Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell. Tissue. Res.* 1986; 246: 125-131.

Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling : the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* 1994; 55: 273-286.

Parisuthiman D, Mochida Y, Duarte WR, Yamauchi M. Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *J. Bone. Miner. Res.* 2005 ; 5 : 1878-1886.

Parry DAD. The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophysical Chemistry.* 1988; 29: 195-209.

Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnol.* 2000; 18: 959-963.

Prestwich GD et Matthew H. Hybrid, composite, and complex biomaterials. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 961: 106-108.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 2001; 5: 385-386.

Rah DK. Art of replacing craniofacial bone defects. *Yonsei Medical Journal.* 2000; 41: 756-765.

Ramachandran GN et Kartha G. Structure of collagen. *Nature.* 1954; 174: 269-270.

Ramachandran GN. Treatise on collagen. Volume 1. Academic Press, New York. 1967.

Riggs BL et Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J. Bone. Miner. Res.* 2005; 20: 177-184.

Références Bibliographiques

Rose FRAJ et Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope versus hype. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002; 292: 1-7.

Ross KP et Brady AJ. Individual sarcomere length determination from isolated cardiac cells using high-resolution optical microscopy and digital image processing. *Biophys. J.* 1982; 40: 233-244.

Rubart M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ. Res.* (2004); 95: 1154-1166.

Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions. *Calcif. Tissue. Int.* 1997; 61: 285–293.

Shuichi Mizuno and Julie Glowacki. Three-dimensional composite of demineralized bone powder and collagen for in vitro analysis of chondroinduction of human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 1996; 17: 1819-1825.

Sipe JD. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 961: 1-9.

Stains JP et Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1719: 69 – 81.

Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, LIM SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J. Bone. Miner. Res.* 1998; 13: 1555-68.

Thiery JP et Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006; 7: 131-142.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003; 15: 740-746.

Références Bibliographiques

- Toman PD, Chisholm G, McMullin H, Giere LM, Olsen DR, Kovach RJ, Leigh SD, Fong BE, Chang R, Daniels GA, Berg RA, Hitzeman RA. Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 23303–23309.
- Torikai A et Shibata H. Effect of ultraviolet radiation on photodegradation of collagen. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999; 73: 1259-1265.
- Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1967; 53: 243-283.
- Vaissiere G, Chevally B, Herbage D, Damour D. Comparative analysis of different collagen based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human osteoblasts. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2000; 38: 205-210.
- van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Löwik CWGM. SOST/sclerostine, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 2005; 16: 319-327.
- Van de Putte KA et Urist MR. Experimental mineralization of collagen sponge and decalcified bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1965; 43: 257-270.
- van der Rest M et Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 13: 2814-23.
- Vukicevic S, Luyten FP, Kleinman HK, Reddi AH. Differentiation of canalicular cell process in bone cells by basement membrane matrix components: regulation by discrete domains of laminin. *Cell.* 1990; 63: 437-445.
- Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: structure-function relations. *J. Struct. Biol.* 1999; 126: 241-255.
- Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2003; 61: 1455-1462.

Références Bibliographiques

Wood GC et Keech MK. The formation of fibrils from collagen. *Biochemical Journal*. 1960; 75: 588-598.

Woodhead-Galloway J. Collagen: the anatomy of a protein. Institute of Biology. Studies in biology n° 117. Edward Arnold Limited. 1980.

Woodhead-Galloway J. Structure of collagen fibril: an interpretation. *in* Collagen in health and disease. Chapitre 3. pages 28-48.

Xin Jiang J, Siller-Jackson A J, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci*. 2007; 12: 1450-1462.

Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas S, Dallas M, Lu Y, Zhao S, Harris M, Harris SE, Feng JQ, Bonewald LF. E11/gp38 Selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol. Cell. Biol*. 2006; 26: 4539-4552.

ADDENDA

Les productions des sciences, des arts, et des lettres, sont très souvent liées au contexte social qui les voit naître. De la démonstration de la rotondité de la Terre, à la compréhension des forces de l'atome, chacune de ces découvertes a dépassé la sphère scientifique pour être exploitée par les pouvoirs publics selon leurs besoins. En ce début du XXI^e siècle, la médecine régénératrice apparaît comme un des pans de la science dont la société attend, à juste titre, des avancées qui modifieront leurs modes de vie. Comme toute technologie, la part obscure de l'ingénierie tissulaire est bien réelle. Je souhaite terminer ce manuscrit, en toute humilité, par la reproduction du texte de la scène finale du « Dictateur » de Charles Chaplin. Ce monologue, écrit lors des heures les plus sombres du XX^e siècle, représente à mon sens la vision la plus forte et la plus pertinente des apports de la science pour l'Homme, et de ce que l'homme peut en faire.

A la suite d'un quiproquo, le petit barbier juif, confondu avec le despote Adenoïd Hynkel, gravi les marches de l'estrade frappée en lettres gothiques du nom de LIBERTE, pour un discours improbable sur la fraîche conquête de l'Osterlich. Mais une fois face à la foule, par une transfiguration mémorable, ce n'est plus le timide barbier, mais Charles Chaplin qui s'exprime au Monde par ces mots :

I'm sorry, but I don't want to be an Emperor—that's not my business—I don't want to rule or conquer anyone. I should like to help everyone if possible, Jew, gentile, black man, white. We all want to help one another, human beings are like that. We want to live by each other's happiness, not by each other's misery. We don't want to hate and despise one another. In this world there is room for everyone and the good earth is rich, and can provide for everyone. The way of life can be free and beautiful. But we have lost the way. Greed has poisoned men's souls—has barricaded the world with hate; has goose-stepped us into misery and bloodshed. We have developed speed but we have shut ourselves in. Machinery that gives abundance has left us in want. Our knowledge has made us cynical, our cleverness hard and unkind. We think too much and feel too little. More than machinery, we need humanity; More than cleverness, we need kindness and gentleness. Without these qualities, life will be violent, and all will be lost. The aeroplane and the radio have brought us closer together. The very nature of these inventions cries out for the goodness in men, cries out for universal brotherhood for the unity of us all. Even now my voice is reaching millions throughout the world, millions of despairing men, women and little children, victims of a system that makes men torture and imprison innocent people.

To those who can hear me I say "Do not despair." The misery that is now upon us is but the passing of greed, the bitterness of men who fear the way of human progress: the hate of men will pass and dictators die and the power they took from the people will return to the people, and so long as men die liberty will never perish....

Soldiers—don't give yourselves to brutes, men who despise you and enslave you—who regiment your lives, tell you what to do, what to think or what to feel, who drill you, diet you, treat you like cattle, use you as cannon fodder. Don't give yourselves to these unnatural men, machine men, with machine minds and machine hearts. You are not machines. You are not cattle. You are men. You have the love of humanity in your hearts. You don't hate—only the unloved hate, the unloved and the unnatural. Soldiers—don't fight for slavery, fight for liberty. In the seventeenth chapter of Saint Luke it is written "the kingdom of God is within man"—not one man, nor a group of men—but in all men—in you. You the people have the power, the power to create machines, the power to create happiness. You the people have the power to make life free and beautiful, to make this life a wonderful adventure. Then in the name of democracy let's use that power—let us all unite. Let us fight for a new world, a decent world that will give men a chance to work, that will give you the future and old age and security. By the promise of these things, brutes have risen to power, but they lie. They do not fulfill their promise, they never will. Dictators free themselves but they enslave the people. Now let us fight to fulfill that promise. Let us fight to free the world, to do away with national barriers, to do away with greed, with hate and intolerance. Let us fight for a world of reason, a world where science and progress will lead to all men's happiness.

Soldiers—in the name of democracy, let us all unite!

Hannah. Can you hear me. Wherever you are, look up Hannah. The clouds are lifting—the sun is breaking through. We are coming out of the darkness into the light. We are coming into a new world. A kindly world, where men will rise above their hate, their greed, and brutality. Look up Hannah! The soul of man has been given wings—and at last he is beginning to fly. He is flying into the rainbow—into the light of hope—into the future, the glorious future, that belongs to you, to me, and to all of us.

Look up Hannah! Look up!

Charles Chaplin, "The Great Dictator" (1940)

MATRICES FIBRILLAIRES DE COLLAGÈNE : MATÉRIAUX POUR LA RÉPARATION OSSEUSE
ET L'ÉTUDE D'OSTÉOBLASTES EN TROIS DIMENSIONS

L'os, tissu conjonctif minéralisé, assure les fonctions de protection, de support et de motilité. De nombreuses pathologies osseuses requièrent l'utilisation d'implants naturels ou synthétiques et le vieillissement de la population accroît cette demande. La thèse a eu pour objet d'évaluer les potentiels de reconstruction osseuse de matériaux préparés à partir de solutions de collagène de concentration moyenne (5mg/mL) et haute (40mg/mL). Ces matériaux fibrillaires, simple à façonner, ont été caractérisés par microscopie photonique et électronique et comparés aux éponges de collagène déjà utilisées en thérapeutique. En culture *in vitro* à long terme, des ostéoblastes humains, primaires ou transformés, se multiplient et s'organisent en une monocouche épithélioïde sur les matrices à 5mg/mL, ou en cellules plates et allongées sur les matrices à 40mg/mL. La minéralisation des matrices, en conditions standard, n'a lieu qu'en présence d'ostéoblastes tandis que les éponges minéralisent de façon spontanée. Dans un défaut crânien engendré chez le rat, les matrices ont permis son comblement à plus de 80%. Elles sont colonisées par les ostéoprogéniteurs qui se différencient et synthétisent de l'os minéralisé ; leur concentration module leur dégradation. En contact en 3D avec le réseau fibrillaire les otéoblastes primaires apparaissent dendritiques et s'organisent en syncytium, reliés par des jonctions communicantes. Cette transition morphologique est décrite *in vitro* par une approche combinée de microscopies. Ces travaux valident l'utilité des matrices fibrillaires de collagène pour l'ingénierie de l'os. Ils confirment également l'intérêt que peut tirer la recherche fondamentale de disposer de matrices extracellulaires modèles.

Mots-clefs : Collagène, Matériaux Denses, Ingénierie Tissulaire, Ostéoblaste, Ostéocyte, Matrice 3D.

**DENSE COLLAGEN FIBRILLAR MATRICES : MATERIALS FOR BONE HEALING AND
FOR THE STUDIES OF OSTEOBLASTS IN THREE DIMENSION**

Bone tissue ensures the continuity and strength of the skeleton, so as an essential role in mineral homeostasis. Many pathologies, associated with bone resection, require materials to fill the defect. This thesis evaluates the bone healing properties of materials made with collagen solutions at medium (5mg/mL) and high (40mg/mL) concentrations. These two scaffolds are structurally described by light and electron microscopy and compared with classically used freeze-dried collagen sponges. In long term *in vitro* culture, transformed and primary osteoblasts proliferate, present a cuboidal shape and are arranged in monolayer at the surface of the 5mg/mL matrix, instead of a more resting morphology on the 40mg/mL scaffolds and sponges. In presence of inorganic phosphate, both fibrillar matrices are mineralised by the activity of osteoblasts, despite sponges exhibited spontaneous mineralization. When added inside a rat skull defect, collagen matrices enhanced the healing up to 80% of the surface fill by new bone, compared with 40% without treatment. Collagen density modulates the degradation of the scaffolds, but both are colonized by vascular cells and osteoprogenitors that synthesise new bone. With combined microscopy techniques, we observed that primary osteoblasts, inside the three dimensional collagen fibrils network during *in vitro* cultures, follow a morphological transition. Osteoblasts inside the matrix exhibit long cytoplasmic processes and are connected together, and with the surface, by gap junctions and thus could be related to osteocytes. This work enlightens the potential of the collagen dense fibrillar matrices for bone repair as well as ECM models for *in vitro* studies.

Keywords: Collagen, Dense Materials, Tissue Engineering, Osteoblast, Osteocyte, 3D Matrix.