

Université de Reims Champagne-Ardenne
Faculté d'odontologie

THESE

préparée en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE

par

Doriane RICHARD

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2005

Comportement de cellules osseuses humaines en culture en présence du lipopeptide Ea-KRFK et au contact d'un revêtement phosphocalcique en vue de la fonctionnalisation de biomatériaux

INSERM ERM 0203, Interfaces Biomatériaux Tissus Hôtes

Directeur : Pr. D. LAURENT-MAQUIN

JE 2428, Onco-Pharmacologie

Directeur : Pr. JF. RIOU

Membres du Jury

Georges BELLON, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, URCA – Président

Marie-Danielle NAGEL, Professeur des Universités, Université Technologique de Compiègne - Rapporteur

Jean-Michel SAUTIER, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Paris VII - Rapporteur

Sandrine LORIMIER, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, URCA - Examineur

Benoît CHENAIS, Professeur des Universités, Le Mans - Co-Directeur de Thèse

Dominique LAURENT-MAQUIN, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, URCA - Co-Directeur de Thèse

À Madame le Professeur Marie-Danielle NAGEL,
Responsable de l'équipe "Biomatériaux-Biocompatibilité", UMR CNRS 6600 " Biomécanique
et Génie biomédical",
Université Technologique de Compiègne,

À Monsieur le Professeur Jean-Michel SAUTIER,
Laboratoire de biologie Orofaciale et Pathologie, INSERM U 0110,
Université Paris VII,

*Qu'ils soient remerciés d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.
En témoignage de ma respectueuse reconnaissance.*

À Monsieur le Docteur Georges BELLON,
Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198,
IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne,

À Mademoiselle le Docteur Sandrine LORIMIER,
"Interfaces Biomatériaux / Tissus Hôtes", INSERM ERM 0203,
IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne,

*Soyez tous deux remerciés d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury.
Merci pour votre collaboration et vos précieux conseils.
En témoignage de mon profond respect.*

À Monsieur le Professeur Benoit CHENAIS,
Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive,
Université du Maine,

*Qui a accepté de co-diriger ce travail. Merci de m'avoir accueilli en maîtrise et formé tout au long de ces
années. Je tiens également à vous remercier pour votre aide, votre rigueur scientifique et vos conseils.
Veuillez croire en ma profonde gratitude et en mon réel attachement.*

À Madame le Professeur Dominique LAURENT-MAQUIN,
Directeur de l'équipe INSERM ERM 0203 "Interfaces Biomatériaux / Tissus Hôtes",
IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne,

*Qui m'a confié ce travail et m'a prodigué une confiance de tous les instants. Je ne saurais pas trouver les
mots justes pour vous exprimer ma profonde reconnaissance alors je vous dirais juste un grand merci.
En témoignage de mon sincère dévouement. . .*

Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur William Hornebeck (DR1 CNRS) de l'unité CNRS UMR 6198 pour avoir collaboré à ce travail.

Veuillez croire en ma reconnaissance.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire INSERM ERM 0203, ce fut une joie de travailler dans cette équipe. Merci à tous pour votre aide.

Merci à Hicham et Nicolas, j'apprécie réellement le travail que l'on fait ensemble. En espérant que cela ne s'arrête pas là.

Merci à Patrice et Alexia pour leurs conseils.

Et enfin, je tiens à m'attarder sur la petite famille du laboratoire de biologie de l'ERM 0203. Évidemment, c'est à Madame la chef, à Christine, à Grand-mère, à Nathalie et à Sandrine que je m'adresse, (sans oublier le gamin).

Tout d'abord merci pour tout, merci d'avoir été là dans les moments difficiles (et il y en a eu). Merci pour votre bonne humeur, vos précieux conseils (en ce qui concerne le travail et la vie en général). Restez telles que vous êtes, ne changez rien.

Je ne pense pas que je vous oublierai...

Maintenant un remerciement tout particulier pour Christine qui, ses derniers mois, s'est presque exclusivement consacrée à mes manip. Merci, merci et encore merci. Vivement le prochain dialogue de sourds autour d'un ELISA.

Merci à grand-mère (Sylvie) pour les chaussettes chaussons, le titi et le MEB.

Merci à Nathalie qui s'est également joint à Christine pour mes manip et qui a réalisé toutes les observations d'immunofluorescence. Nos petites séances de cinéma vont me manquer. On va peut-être en refaire quelques-unes...

Sandrine, merci pour ta bonne humeur et ton entrain qui font que tu passes rarement inaperçue. Merci de m'avoir permis de rencontrer les moniteurs de TP d'histo enfin surtout un. Merci de nous accueillir de temps en temps autour de pâtes au saumon.

Je tiens également à remercier tous mes amis qui n'ont jamais quitté le navire même dans les mauvais moments.

Je tiens tout particulièrement à remercier Virginie (par décence je ne peux pas t'appeler par ton surnom, dommage). Tu m'as toujours épaulée depuis de très nombreuses années. Merci d'être ma conscience parfois et n'oublies pas la somme de nous deux donne une personne tout à fait normale (selon nos critères bien sûr). J'espère que l'on va passer encore de nombreuses années ensemble et que je vais bientôt devenir tata dodo (promis je ne le ou la gêterai pas trop et je ne lui ferai pas faire trop de bêtises enfin ça c'est pas sûr à 100 %).

Allez viens j'l'emmène au vent... Je voudrais que tu te souviennes...

Mon lolo, que te dire si ce n'est : quand tu étais petit, tu étais un JEDI. Merci d'être tout simplement toi, mon meilleur ami quoiqu'il arrive. Rendez-vous à Toulouse dans pas très longtemps.

Ma Poulette, merci pour tous les fous rires que l'on a pu avoir et que l'on aura sûrement encore souvent. Bon, comme tu as pu le constater des fois j'écoute ce que tu me dis et je suis tes conseils (je sais c'est rare). Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et ce que tu continues de faire.

Yan, à quand le prochain périple ? Cela fait déjà trois ans que l'on s'est rencontré à Montréal et l'on ne s'est plus quitté. Merci pour ta présence de tous les instants, ton soutien et ton amitié inconditionnelle. Allez Yan, souris !!! Tu vois ça se transpose finalement (c'est une joke).

Karine et Fred, merci d'être là sur le net, autour d'un barbecue, de pâtisseries. Merci pour vos discussions. Vous allez si bien ensemble, que vous êtes chanceux. Courage, tout vient à point à qui sait attendre (est-ce que je pourrais aussi être sa tata dodo ?).

Giv (ou Seb au choix), tout d'abord merci pour tout ce que tu as fait au cours de la rédaction de cette thèse. Merci d'avoir sacrifié une partie de ta nuit pour l'impression du manuscrit et pour m'avoir expliqué le fonctionnement de la relieuse. Promis je fais pas exprès d'être blonde. Tiens le coup. Et tu sais dorénavant que je serai toujours là pour toi, mon petit Giv.

À tous ceux que j'oublie (et il y en a beaucoup mais sinon je vais écrire un roman).

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de ma famille. Si vous êtes placés parmi les derniers, ne vous vexez pas, ce n'est pas parce que vous êtes moins importants que tous ceux qui vous précèdent, mais parce que vous êtes chers à mon cœur.

Tout d'abord merci à mes grands-parents paternels et maternels. Sans vous, je ne serais pas celle que je suis (le mélange de vous). Merci à pépère et mémère, sans vous ce n'est plus pareil, mais c'est dans l'ordre des choses. Merci d'avoir rendu mon enfance inoubliable, de m'avoir aimé quoiqu'il puisse arriver et de m'avoir inculqué vos valeurs, je vous dédie toutes ces années de travail.

À mes parents, je suis parfois maladroite, mais je sais tous les sacrifices que vous avez faits pour que tout me soit agréable. J'espère que vous êtes fiers de ce que vous avez fait. En témoignage de ma reconnaissance et de mon amour.

À Antoine, the last but not least. Merci de m'aimer tout simplement. Certains silences valent mieux que de beaux discours alors je me tais sinon tu vas rougir.

Voilà c'est fini.

-LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS-

Publications internationales :

Human osteoblast-like cells behavior in contact with electrodeposited calcium phosphate coatings.

D. Richard, N. Dumelie, H. Benhayoune, S. Bouthors, C. Guillaume, N. Lalun, G. Balossier and D. Laurent-Maquin.

J Biomed Mater Res part B (soumis)

Lipopeptide activation of TGF- β 1 in human osteoblast cells stimulates matrix metalloproteinase secretion and bone matrix proteins expression.

Doriane Richard, Benoît Chénais, Christine Guillaume, Alexia Grandjean-Laquerriere, Sandrine Lorimier, William Hornebeck, Georges Bellon and Dominique Laurent-Maquin.

En préparation, prochainement soumis

Communications orales :

Les Lipopeptides Ea-KFK et Ea-KRFK associés au TGF- β 1 latent modulent l'expression phénotypique de cellules osseuses humaines.

Richard D, Lorimier S, Guillaume C, Lalun N, Bouthors S, Hornebeck W, Chénais B, Laurent-Maquin D.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR 53

28 juin 2004, Reims, France

Evolution des revêtements phosphocalciques électrodéposés après étude "*in vitro*"

Dumélié N, Richard D, Benhayoune H, Bouthors S, Guillaume C, Balossier G et Laurent-Maquin D.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR 53

28 juin 2004, Reims, France

Elaidyl-KFK et Elaidyl-KRFK associés au TGF- β latent modulent l'expression phénotypique de cellules osseuses humaines.

Richard D, Lorimier S, Guillaume C, Lalun N, Bouthors S, Hornebeck W, Chénais B, Laurent-Maquin D.

Congrès international de biochimie, Forum des jeunes chercheurs
3-7 mai 2004, Marrakech, Maroc

Etude des effets du TGF β_1 et de la 1 α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ sur l'expression phénotypique de cellules osseuses humaines de type ostéoblastique en culture 2D.

Morin A, Richard D, Guillaume C, Kaplan H, Laurent-Maquin D, Lorimier S.
Forum des jeunes chercheurs en Odontologie
Mai 2004, Rennes, France

Communications par affiche :

Comportement d'ostéoblastes humains au contact de revêtements phosphocalciques électrodéposés.

D. Richard, N. Dumélié, H. Benhayoune, S. Bouthors, C. Guillaume, N. Lalun, G. Balossier, D. Laurent-Maquin

9^{ème} colloque de la Société Française des Microscopies
4-8 juillet 2005, Caen, France

The Elaidyl-KRFK lipopeptide is a potent activator of Latent Transforming Growth Factor- β_1 in cultures of human bone cells.

D. Richard, C. Guillaume, B. Chénais, G. Bellon, S. Lorimier and D. Laurent-Maquin.

Workshop in Biomatériaux
5 juillet 2004, Villetaneuse, France

Elaidyl-KFK et KRFK : peptides activateurs du TGF- β latent dans le cadre de la régénération osseuse.

Richard D, Hurteaux R, Morin A, Laronze J-Y, Bellon G, Hornebeck W, Lorimier S, Laurent-Maquin D.

Congrès annuel de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire
4-5 novembre 2003, Lyon, France

-TABLE DES MATIERES-

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

SITUATION DU SUJET.....	1
I- INTRODUCTION.....	3
1- Biologie du tissu osseux.....	3
<i>1-1 Le remodelage osseux.....</i>	<i>3</i>
<i>1-2 L'ostéoblaste : cellule impliquée dans l'ostéogenèse.....</i>	<i>8</i>
1-2-1 Origine et plasticité de l'ostéoblaste.....	8
1-2-2 Différenciation et contrôle de l'ostéoblaste.....	9
1-2-3 Expression du phénotype ostéoblastique.....	13
2- Le TGF-β.....	18
2-1 Généralités.....	18
2-2 Les différentes formes latentes de TGF- β 1.....	19
2-3 Activation du TGF- β latent	23
2-3-1 Mécanismes physiologiques de l'activation et de la régulation.....	23
2-3-2 Activation par la Thrombospondine de type I.....	25
2-4 Récepteurs du TGF- β et voie de signalisation	29
2-5 Le TGF- β et les ostéoblastes.....	31
3- Les métalloprotéinases matricielles.....	32
4- Les biomatériaux implantables en sites osseux.....	39
4-1 Généralités.....	39
4-2 Classification des matériaux implantables en site osseux.....	40
5-But du travail.....	42

II- MATERIELS ET METHODES	44
1- Matériels	44
1-1 Produits chimiques et réactifs.....	44
1-2 Matériels.....	45
1-3 Lipopeptide élaïdyl-KRFK.....	46
1-4 Elaboration d'un revêtement de phosphate de calcium par électrodéposition.....	47
2- Méthodes	49
2-1 Culture cellulaire.....	49
2-1-1 Culture primaire d'ostéoblastes humains.....	49
2-1-2 MG-63.....	50
2-1-3 Culture en plaques de 24 et 6 puits dans le cadre de l'étude de l'effet du TGF- β 1 sur les cellules osseuses humaines.....	50
2-1-4 Culture en plaques de 24 et 6 puits dans le cadre de l'étude de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK.....	51
2-1-5 Culture en plaques de 6 et 24 puits dans le cadre de l'étude de la biocompatibilité d'un revêtement de phosphate de calcium.....	51
2-2 Comptage cellulaire et test de viabilité.....	52
2-2-1 Comptage cellulaire.....	52
2-2-2 Test d'exclusion au Bleu Trypan.....	52
2-2-3 Test de viabilité au MTS (Méthyl Thiazol Sulfate).....	53
2-3 Etude en microscopie électronique à balayage.....	54
2-4 Etude de l'expression des gènes par RT-PCR.....	54
2-4-1 Extraction des ARNs totaux.....	55
2-4-2 RT-PCR semi-quantitative.....	55
2-5 Etude immunohistochimique.....	58
2-6 Dosage quantitatif de protéines par ELISA.....	59
2-7 Etudes statistiques.....	59

III- RESULTATS.....	60
1- Effets du TGF-β1 sur les cellules osseuses humaines en culture.....	60
<i>1-1 Effet du TGF-β1 sur la prolifération des cellules osseuses humaines.....</i>	<i>60</i>
<i>1-2 Effet du TGF-β1 sur la morphologie de cellules osseuses humaines au cours du temps.....</i>	<i>62</i>
<i>1-3 Effet du TGF-β1 sur l'expression de gènes de la matrice extracellulaire osseuse et de MMPs par les cellules osseuses humaines au cours du temps.....</i>	<i>66</i>
1-3-1 Gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire osseuse.....	66
1-3-2 Gènes codant les métalloprotéinases matricielles (MMPs-1, -2, -3 et -13) et leurs inhibiteurs (TIMPs-1 et -2).....	68
<i>1-4 Effet du TGF-β1 sur la synthèse protéique de cellules osseuses humaines en fonction de la cinétique de prolifération par immunohistochimie.....</i>	<i>70</i>
1-4-1 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse de fibronectine par les ostéoblastes en culture primaire.....	70
1-4-2 Effet du TGF- β 1 en fonction du temps sur la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes en culture primaire.....	72
1-4-3 Effet du TGF- β 1 en fonction du temps sur la synthèse de sialoprotéine osseuse par les ostéoblastes en culture primaire.....	74
1-4-4 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse d'ostéopontine par les ostéoblastes en culture primaire.....	76
1-4-5 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes en culture primaire.....	78
<i>1-5 Influence du TGF-β1 sur la sécrétion des MMPs-1 et -3 et des inhibiteurs tissulaires TIMPs-1 et -2 par les cellules osseuses humaines.....</i>	<i>80</i>
1-5-1 Etude de la sécrétion de la MMP-1 par les cellules osseuses humaines.....	80
1-5-2 Etude de la sécrétion de la MMP-3 par les cellules osseuses humaines.....	82
1-5-3 Etude de la sécrétion du TIMP-1 par les cellules osseuses humaines.....	84
1-5-4 Etude de la sécrétion du TIMP-2 par les cellules osseuses humaines.....	86
<i>1-6 Effet du TGF-β1 sur la sécrétion d'ostéopontine au cours de la cinétique de prolifération cellulaire de cellules osseuses humaines.....</i>	<i>88</i>

2- Activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Elaïdyl-KRFK dans un modèle d'ostéoblastes humains en culture.....	90
2-1 <i>Influence de la partie lipidique du lipopeptide (acide élaïdique) sur les ostéoblastes humains.....</i>	90
2-1-1 Influence de l'acide élaïdique sur la prolifération d'ostéoblastes humains en culture.....	90
2-1-2 Influence de l'acide élaïdique sur la morphologie d'ostéoblastes humains en culture.....	92
2-2 <i>Activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK dans les ostéoblastes humains.....</i>	95
2-2-1 Effet de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la prolifération des ostéoblastes humains.....	95
2-2-2 Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des MMPs-1, -3 et des TIMPs-1 et -2 dans les cellules osseuses humaines.....	99
2-2-3 Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression de gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire osseuse dans les cellules osseuses humaines.....	109
3- Evaluation de la biocompatibilité d'un revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition.....	111
3-1 <i>Caractérisation du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition.....</i>	111
3-2 <i>Influence du revêtement phosphocalcique sur la viabilité et la prolifération des cellules MG-63.....</i>	114
3-3 <i>Etude morphologique des cellules MG-63 au contact du revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition.....</i>	117
3-4 <i>Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur le phénotype ostéoblastique des cellules MG-63.....</i>	123
IV- DISCUSSION.....	125
1- Etude cinétique des effets du TGF-β1 sur les cellules osseuses humaines en culture.....	125
2- Activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK dans un modèle d'ostéoblastes humains.....	130
3- Evaluation de la biocompatibilité d'un revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition.....	133
V- CONCLUSIONS-PERSPECTIVES.....	136
1- Conclusions.....	136
2- Perspectives.....	137
VI- BIBLIOGRAPHIE.....	139

-LISTE DES ABREVIATIONS-

α 2M	alpha 2 macroglobuline,
BMP	"Bone Morphogenetic Protein",
BSP	"Bone Sialoprotein",
Cbfa 1	"Core Binding Factor alpha 1",
COL 1	Collagène de type I,
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco,
Ea	Acide élaïdique,
Ea-KRFLK	Lipopeptide élaïdyl-Lysine-Arginine-Phénylalanine-Lysine,
ELISA	"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay",
FN	Fibronectine,
KRFLK	peptide Lysine-Arginine-Phénylalanine-Lysine,
LAP	"Latency Associated Peptide",
LTBP	"Latent TGF- β Binding Protein",
MEB	Microscopie électronique à balayage,
MEC	Matrice extracellulaire,
MMP	Métalloprotéinase matricielle,
OC	Ostéocalcine,
ON	Ostéonectine,
OPN	Ostéopontine,
PAL	Phosphatase alcaline,
PS	Antibiotique Pénicilline/Streptomycine
SVF	Sérum de veau fœtal,
T β R	Récepteur du TGF- β ,
TGF- β	"Transforming Growth Factor",
TIMP	"Tissular Inhibitor of Matrix Metalloproteinase",
TSP-1	Thrombospondine de type I.

-LISTE DES FIGURES-

Figure 1 : Le remodelage osseux.....	4
Figure 2 : Schéma soulignant la plasticité cellulaire lors de l'induction de la différenciation ostéoblastique.....	9
Figure 3 : Principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogenèse.....	13
Figure 4 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste.....	14
Figure 5 : Biosynthèse du TGF- β 1.....	20
Figure 6 : Représentation de l'association du TGF- β 1 latent aux microfibrilles.....	21
Figure 7 : Les complexes α 2M/TGF- β	23
Figure 8 : Mécanisme d'activation du TGF- β 1 latent par l'intégrine α v β 6.....	24
Figure 9 : Mécanismes d'activation du TGF- β latent.....	25
Figure 10 : Représentation schématique de la TSP-1.....	26
Figure 11 : Schéma de l'activation du TGF- β 1 par la TSP-1.....	28
Figure 12 : Mécanisme de signalisation du TGF- β 1.....	30
Figure 13 : Organisation structurale des différentes sous-familles de MMPs.....	36
Figure 14 : Régulation des MMPs.....	37
Figure 15 : Voies d'activation des MMPs.....	38
Figure 16 : Structure du lipopeptide Ea-KRFK.....	46
Figure 17 : Représentation schématique de la cellule d'électrolyse utilisée pour l'élaboration du revêtement phosphocalcique.....	48
Figure 18 : Influence du TGF- β 1 sur la prolifération d'ostéoblastes humains en culture primaire et des cellules MG-63 au cours du temps.....	61
Figure 19 : Observation en MEB d'ostéoblastes humains en culture primaire cultivés en l'absence (A, C, E, G) ou en présence de TGF- β 1 (B, D, F, H) pendant 1, 7, 14 et 28 jours.....	63

Figure 20 : Observation en M.E.B de cellules MG-63 cultivées en l'absence (A, C, E, G) ou en présence de TGF- β 1 (B, D, F, H) pendant 1, 7, 14 et 28 jours.....	65
Figure 21 : Etude de l'expression de gènes codant des protéines de la MEC osseuse en fonction du temps dans les ostéoblastes en culture primaire.....	67
Figure 22 : Etude de l'expression de gènes codant les MMPs-1, -2, -3 et -13 et leurs inhibiteurs en fonction du temps et de la présence du TGF- β 1 dans des cultures primaires d'ostéoblastes.....	69
Figure 23 : Etude immunohistochimique de la synthèse de fibronectine en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes issus de culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture.....	71
Figure 24 : Etude immunohistochimique de la synthèse de COL I en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 21 et 28 jours de culture.....	73
Figure 25 : Etude immunohistochimique de la synthèse de BSP en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture.....	75
Figure 26 : Etude immunohistochimique de la synthèse d'ostéopontine en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture.....	77
Figure 27 : Etude immunohistochimique de la synthèse d'ostéocalcine en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture.....	79
Figure 28 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de MMP-1 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération.....	81
Figure 29 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de MMP-3 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération.....	83

Figure 30 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de TIMP-1 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération.....	85
Figure 31 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de TIMP-2 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération.....	87
Figure 32 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion d'ostéopontine par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération.....	89
Figure 33: Influence de l'acide élaïdique sur la prolifération des ostéoblastes humains.....	91
Figure 34 : Influence de l'acide élaïdique sur la morphologie cellulaire des ostéoblastes en culture primaire.....	93
Figure 35 : Influence de l'acide élaïdique sur la morphologie des cellules MG-63.....	94
Figure 36 : Effet de l'association Ea-KRFK/ TGF- β 1 latent sur la prolifération des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B).....	96
Figure 37: Effet de l'association TGF- β 1 latent et Ea-KRFK sur la sécrétion de TGF- β 1 par les ostéoblastes humains.....	98
Figure 38 : Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des gènes des MMPs-1 et -3 et des TIMPs-1 et -2 dans les cellules osseuses humaines.....	100
Figure 39 : Influence de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion de la MMP-1 par les ostéoblastes humains.....	102
Figure 40 : Influence de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion de la MMP-3 par les ostéoblastes humains.....	104
Figure 41 : Influence de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion du TIMP-1 par les ostéoblastes humains.....	106

Figure 42 : Influence de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion du TIMP-2 par les ostéoblastes humains.....	108
Figure 43 : Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des gènes codant le COL I, la PAL et l'OPN dans les cellules osseuses humaines.....	110
Figure 44 : Caractérisation morphologique du revêtement de phosphate de calcium électrodéposé avec une densité de courant 5 mA/cm ²	112
Figure 45 : Spectre de diffraction des rayons X du revêtement de phosphate de calcium.....	113
Figure 46 : Mesure de la viabilité des cellules MG-63 au contact du revêtement phosphocalcique pendant une période de 28 jours.....	115
Figure 47 : Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur la prolifération des cellules MG-63.....	116
Figure 48 : Morphologie des cellules MG-63 cultivées sur lamelle de thermanox.....	119
Figure 49 : Morphologie des cellules MG-63 cultivées sur lamelle de thermanox.....	120
Figure 50 : Influence du revêtement phosphocalcique sur la morphologie des cellules MG-63.....	121
Figure 51 : Influence du revêtement phosphocalcique sur la morphologie des cellules MG-63.....	122
Figure 52 : Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur l'expression de gènes de la matrice osseuse dans les cellules MG-63.....	124

-LISTE DES TABLEAUX-

Tableau 1. Tableau récapitulatif de l'ensemble des régulateurs potentiels du remodelage osseux	7
Tableau 2. Classification des principales MMPs selon leur structure et spécificité de substrat.....	34
Tableau 3. Description des amorces utilisées en PCR.....	57

SITUATION DU SUJET

Les pertes de substances osseuses, liées à l'âge ou à certaines pathologies, quand elles sont conséquentes, entravent les capacités naturelles de réparation de l'os. Leur traitement repose essentiellement sur l'apport d'os autologue. Toutefois cette technique présente certaines limites, en effet la quantité d'os prélevée est limitée et elle engendre une morbidité non négligeable. Une alternative à ces inconvénients est l'utilisation de biomatériaux.

Depuis une quinzaine d'années, des avancées dans le domaine des biomatériaux, de la médecine et de la biologie ont permis le développement de la bioingénierie osseuse. En effet ces progrès permettent d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques en implantologie dentaire ou orthopédique grâce au développement de substituts du tissu osseux ayant un fort pouvoir ostéogène.

Ainsi le domaine des biomatériaux a connu plusieurs grandes périodes de développement. En effet dès 1892, Dressman utilisait le plâtre de Paris (sulfate de calcium) pour combler certains défauts osseux. Toutefois cette première génération de biomatériaux n'était pas destinée à un long séjour dans l'organisme entraînant des rejets de l'implant. De ce fait, des matériaux bioinertes comme le titane et l'alumine ont été développés. Ces matériaux n'induisaient aucune réaction sur les tissus environnants et ne subissaient aucune dégradation à l'intérieur de l'organisme. Ce sont principalement des métaux choisis pour leur résistance à la corrosion, aux contraintes mécaniques et à l'usure. La recherche actuelle en biomatériaux se destine à développer des matériaux dotés de propriétés bioactives sur l'os. Ces matériaux peuvent produire de véritables ponts ostéogéniques entre l'implant et l'os néoformé permettant ainsi une accélération du processus de régénération osseuse et une meilleure intégration de l'implant au sein de l'organisme. Les propriétés bioactives de ces matériaux peuvent être obtenues par modification de surface du matériau ou par la fonctionnalisation de celui-ci.

Le programme de recherche de notre laboratoire vise à élaborer des biomatériaux fonctionnalisés. Cette approche vise en premier lieu à élaborer des biomatériaux bioactifs (bioverres, revêtements de phosphate de calcium élaborés par électrodéposition), puis à fonctionnaliser ces substituts implantables en site osseux par adjonction de système de libération prolongée de peptides stimulateurs de l'activité ostéoblastique et de la formation osseuse.

Dans ce projet, les objectifs de notre travail ont été :

1. de déterminer la capacité d'un lipopeptide, futur candidat à l'encapsulation, à activer le TGF- β 1 latent dans des ostéoblastes humains en culture et d'évaluer ses effets sur ces ostéoblastes et la formation osseuse.

2. d'évaluer la biocompatibilité d'un revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition au sein de notre laboratoire.

I- INTRODUCTION

1- Biologie du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif formé de cellules dispersées au sein d'une matrice extracellulaire. La caractéristique de ce tissu réside dans la nature solide de cette matrice dans le sens où celle-ci est largement calcifiée lui permettant ainsi d'assurer trois fonctions principales : une fonction de support de l'organisme, une fonction de protection des organes essentiels et une fonction métabolique lui permettant de stocker et libérer des minéraux, en particulier le phosphore et le calcium.

L'origine embryonnaire du tissu osseux varie selon sa localisation au sein de l'organisme, ainsi l'os cranio-facial dérive des crêtes neurales faciales, le squelette axial est formé à partir des somites et les membres se développent à partir des plaques latérales du mésoderme.

1-1 Le remodelage osseux

L'une des caractéristiques physiologiques du tissu osseux est qu'il se renouvelle continuellement tout en maintenant sa masse constante grâce à un processus complexe et dynamique appelé remodelage osseux [Karsenty et al., 1999]. La finalité de ce remodelage est de permettre la réparation d'infimes dégâts du squelette et d'assurer l'homéostasie calcique.

Le remodelage osseux est régulé par des interactions complexes entre les hormones systémiques, les facteurs de croissance dont la synthèse se fait au niveau local et les cellules osseuses. Ce remodelage est basé sur l'activité synchronisée de deux groupes de cellules, les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes responsables de la formation osseuse (figure 1).

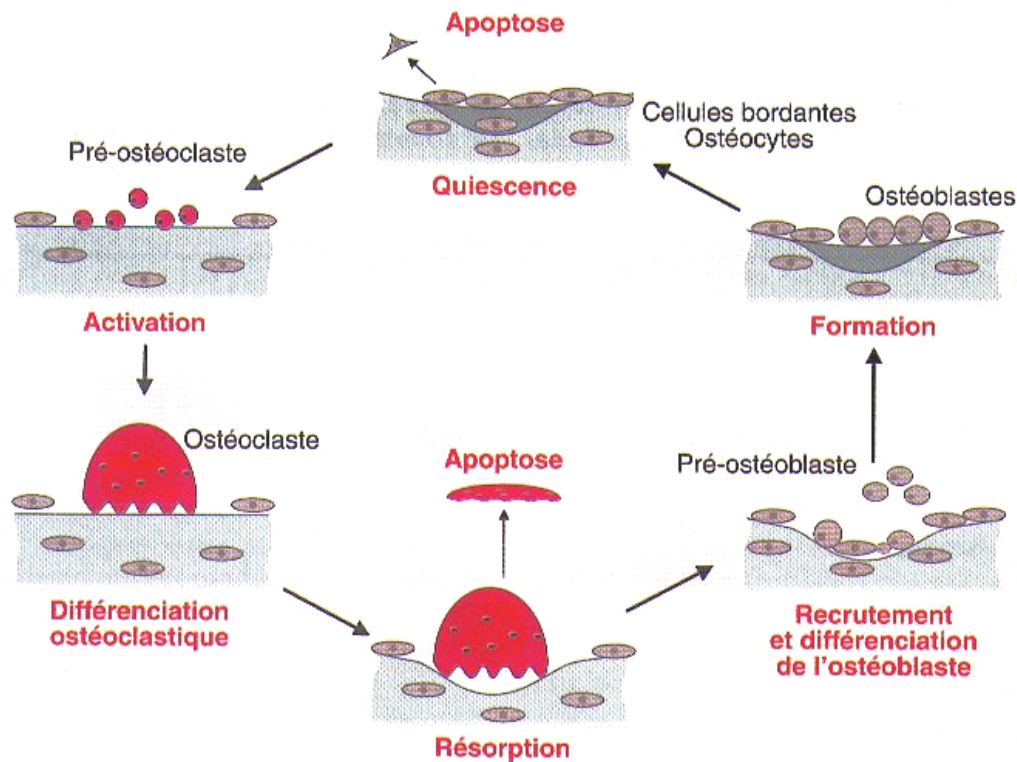


Figure 1 : le remodelage osseux d'après Marie (2001)

Le remodelage osseux suit un cycle défini qui débute par une phase d'activation caractérisée par la différenciation des ostéoclastes suivie d'une phase de résorption de la matrice osseuse par ces ostéoclastes différenciés. Puis les ostéoclastes se détachent de la matrice résorbée et les précurseurs des ostéoblastes se différencient en préostéoblastes puis en ostéoblastes capables de synthétiser une nouvelle matrice osseuse comblant ainsi la lacune de résorption (lacune de Howship) formée par les ostéoclastes. Une fois la matrice osseuse synthétisée, la majorité des cellules s'aplatissent et bordent la surface de l'os. Une partie des ostéoblastes subissent alors le phénomène d'apoptose, le reste se laissant inclure dans la matrice osseuse qu'ils ont synthétisée devenant des ostéocytes reliés par un réseau d'extensions cytoplasmiques présentes dans des canalicules.

La phase d'activation se caractérise par le recrutement d'ostéoclastes provenant de la prolifération et de la fusion de cellules précurseurs. La phase de résorption débute par l'adhésion des ostéoclastes à la surface de l'os à éliminer. Cet attachement se fait grâce à l'intégrine $\alpha\beta3$ [Nakamura et al., 2003] qui a pour ligand des protéines adhésives synthétisées par les ostéoblastes et incorporées dans la matrice osseuse telles que la

thrombospondine, l'ostéopontine, la fibronectine et la sialoprotéine osseuse [Helfrich et al., 1992]. La destruction osseuse est principalement due à l'acidification du micro-environnement situé entre la bordure en brosse de l'ostéoclaste et l'os, ce qui favorise la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite libérant des minéraux (calcium et phosphore) et permettant la mise à nu de la matrice organique et l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMPs) comme les MMPs-2, -3, -9 et -13 [Uchida et al., 2000].

La régulation de la résorption osseuse intervient principalement au moment de la différenciation ostéoclastique. Les principaux facteurs intervenant au cours de cette étape sont l'hormone parathyroïdienne (PTH), les Interleukines 1 et 6 (qui activent la prolifération des précurseurs) ainsi que le "Macrophage Colony Stimulating Factor" ou M-CSF (qui stimule les précurseurs ostéoclastiques et augmente le nombre d'ostéoclastes). Le "Transforming Growth Factor- β " (TGF- β), quant à lui, diminue la prolifération des précurseurs et stimule leur différenciation en ostéoclastes [Reddy, 2004].

Cette phase de résorption est ensuite suivie d'une phase d'inversion qui correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononuclées de type macrophagique qui vont tapisser le fond de la lacune de résorption. C'est au cours de la phase d'inversion que s'effectue et se transmet le signal inducteur de la formation osseuse.

La phase de formation osseuse est caractérisée par la différenciation et le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune. Ils vont ensuite apposer au fond de la lacune, afin de la combler, une nouvelle matrice collagénique qui après un temps de maturation se minéralise. L'activité de formation dépend davantage du nombre initial d'ostéoblastes que de l'activité propre de chaque cellule. Les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme et des facteurs régulant le métabolisme des cellules voisines (IL-1 et IL-6, facteurs stimulant la formation ou l'activité des ostéoclastes). Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice et seront ultérieurement libérés lorsque l'os sera résorbé.

La régulation de la formation osseuse fait principalement appel à des facteurs de croissance et à des cytokines [De Vernejoul et al., 1993]. Les facteurs de croissance synthétisés par les ostéoblastes peuvent jouer un rôle autocrine et paracrine sur les cellules et sont présents dans la matrice extracellulaire. Celle-ci sert ainsi de réservoir à ces facteurs qui sont protégés de la protéolyse enzymatique par leur liaison aux glycosaminoglycannes et aux protéines matricielles. Les principaux facteurs de croissance identifiés dans la matrice osseuse

sont les "Fibroblast Growth Factors" (FGFs), les "Insulin-like Growth Factors" (IGF) I et II, le TGF- β et les "Bone Morphogenetic Proteins" (BMPs) qui ont des propriétés ostéoinductives *in vivo* (tableau I). Le fait que ces facteurs, en particulier les IGFs et le TGF- β soient sécrétés par les ostéoclastes et présents dans la matrice osseuse, libérés lors de la résorption osseuse et qu'ils agissent sur la prolifération et la différenciation ostéoblastique indique qu'ils pourraient intervenir comme facteurs de couplage entre la résorption et la formation osseuse.

Tableau 1. Tableau récapitulatif de l'ensemble des régulateurs potentiels du remodelage osseux [Hurteaux, 2003]

		Facteurs systémiques	Facteurs locaux
Résorption	Stimulation	PTH	IL-1
		Calcitriol	TGF- α
		Hormones thyroïdiennes	TNFs
			EGF
			VIP
	Inhibition	Calcitonine	
		Oestrogènes	Interféron- γ
		Androgènes	TGF- β
Progestérone		Ostéostatines	
Formation	Stimulation	PTH	
		Calcitriol	
		Insuline	IGFs
		Hormones thyroïdiennes	Prostaglandines
		Oestrogènes	TGF- β
		Androgènes	BMPs
		Progestérone	
	Inhibition	Glucocorticoïdes	Interféron- α
			IL-1

TGF : Transforming Growth Factor; TNF : Tumor Necrosis Growth Factor; EGF: Epidermal Growth Factor; VIP: Vasoactive Intestinal Peptide; BMP: Bone Morphogenetic Protein; PTH: Parathormone; IL: Interleukine; IGF: Insulin-like Growth Factor

1-2 L'ostéoblaste : cellule impliquée dans l'ostéogenèse

L'ostéogenèse se produit dans l'organisme au cours du développement embryonnaire, de la croissance de l'individu, du remodelage osseux et de la cicatrisation.

Les grandes étapes de l'ostéogenèse sont caractérisées par l'engagement, la prolifération et la différenciation de cellules souches multipotentes, qui se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice extracellulaire du tissu osseux.

1-2-1 Origine et plasticité de l'ostéoblaste

L'ossification endochondrale responsable de la formation des os longs est caractérisée par le dépôt de matrice osseuse sur une matrice cartilagineuse, alors que l'ossification membranaire au niveau des os plats procède par une apposition de matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes [Ducy et al., 2001]. Cependant, les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans ces deux types d'ossification ne sont pas fondamentalement différents. Au niveau des os plats, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules précurseurs mésenchymateuses dérivées de la crête neurale. La formation se fait alors par condensation du mésenchyme. Au niveau de l'endoste, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire, capables de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipeuses sous l'action de facteurs locaux et systémiques. Le renouvellement des ostéoblastes se fait à partir de cellules souches mésenchymateuses médullaires.

Ces cellules mésenchymateuses ont une certaine plasticité et peuvent se différencier en ostéoblastes, chondroblastes ou adipocytes [Pittenger et al., 1999]. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription tels que Sox-9 en ce qui concerne la voie chondroblastique, MyoD pour la voie myoblastique, la protéine PPAR γ 2 ("Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 2) pour la voie adipocytaire, et enfin Cbfa1("Core binding factor"1)/Runx2 pour la voie ostéoblastique. L'expression de ces facteurs détermine la plasticité cellulaire (figure 2).

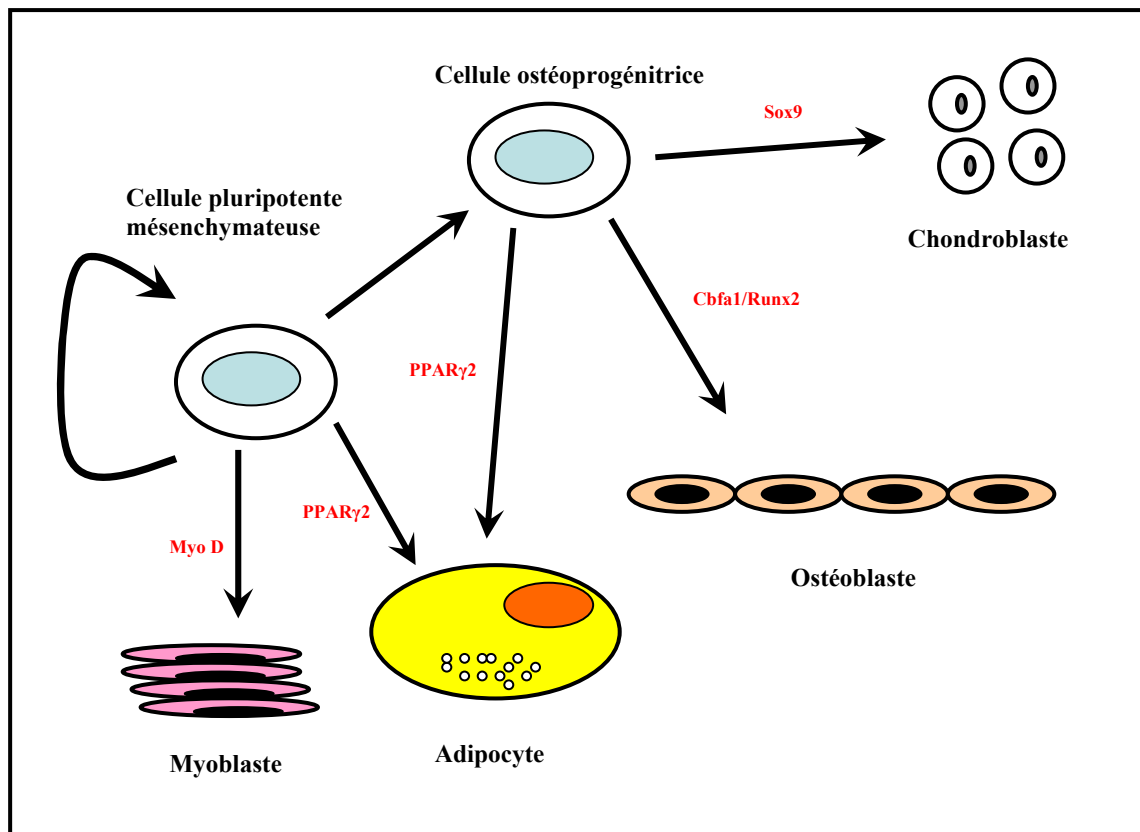


Figure 2 : Schéma soulignant la plasticité cellulaire lors de l'induction de la différenciation ostéoblastique (d'après Marie, 2001)

1-2-2 Différenciation et contrôle de l'ostéoblaste

Le développement de modèles de culture de cellules ostéoblastiques murines et humaines a permis de déterminer les grandes étapes du programme de différenciation de l'ostéoblaste et de déterminer la régulation de l'expression des gènes au cours de l'ostéogenèse *in vitro* [Stein et Lian, 1993; Marie, 2001].

L'ostéogenèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui, après arrêt de la division cellulaire, se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse.

La cinétique de différenciation de l'ostéoblaste suit un programme génétique précis et l'expression temporo-spatiale de gènes va suivre trois phases bien distinctes : la phase d'engagement et de prolifération, la phase de production et de maturation de la matrice extracellulaire (MEC) et enfin la minéralisation de cette matrice. Ainsi, plusieurs marqueurs de la différenciation ostéoblastique sont exprimés de façon séquentielle au cours de la différenciation ostéoblastique : lors de la phase d'engagement vers la voie ostéoblastique, ce sont surtout des facteurs de transcription qui sont exprimés comme Cbfa1/Runx2 puis la phase de maturation est caractérisée par l'expression de gènes associés à la production de matrice (collagène de type I, phosphatase alcaline, ostéopontine, TGF- β). Les ostéoblastes différenciés expriment des marqueurs tardifs de la différenciation comme l'ostéocalcine ou la sialoprotéine osseuse.

La différenciation de l'ostéoblaste est donc sous le contrôle de nombreux facteurs permettant d'en assurer le parfait déroulement : facteurs de transcription, facteurs d'interaction avec la matrice extracellulaire et facteurs locaux et systémiques.

Les facteurs de transcription intervenant dans la différenciation ostéoblastique

Le rôle de ces facteurs de transcription est de maintenir la cohésion entre la prolifération et la différenciation des cellules, cette balance étant un élément critique pour le bon fonctionnement des tissus quelle que soit leur origine.

Le facteur de transcription majeur impliqué dans la différenciation ostéoblastique est le facteur Cbfa1/Runx2. Cloné en 1993 par Ogawa et al., il représente chez les mammifères un des trois homologues du facteur de transcription Runt chez la drosophile [Kagoshima et al., 1993]. Cbfa1 est un facteur essentiel de l'engagement et de la différenciation des ostéoblastes, son expression augmente avec l'état de différenciation des ostéoblastes [Chang et al., 1998]. Ce facteur de transcription peut se lier à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaîne alpha 1 du collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Des études ont montré qu'il existe des sites de liaison de Cbfa1 de type OSE2 ("Osteoblast Specific Element" 2) dans les régions régulatrices de ces gènes [Ducy et al., 1999]. De plus le blocage de son activité grâce à des transfections d'oligonucléotides antisens entraîne la diminution de l'expression des gènes qui sont sous son contrôle soulignant ainsi son rôle non seulement dans la différenciation mais aussi dans la fonction de l'ostéoblaste. Les souris Cbfa1^{-/-} meurent à la naissance avec une

absence totale de tissu osseux et d'ostéoblastes. Ces souris ont un squelette de forme normale mais complètement cartilagineux ce qui démontre le rôle essentiel de Cbfa1/Runx2 dans la formation osseuse [Otto et al., 1997 ; Komori et al., 1997 ; Tsuji et al., 2004]

D'autres facteurs de transcription interviennent également dans le contrôle de la différenciation ostéoblastique, c'est le cas de Dlx-5 ("Distal less homeobox-5") dont l'inactivation chez la souris induit un retard d'ossification sans altérer la morphogénèse [Acampora et al., 1999]. Le facteur de transcription Msx2 ("Muscle segment homeobox gene") pourrait interférer avec Dlx5 afin de contrôler l'expression de la sialoprotéine osseuse et de l'ostéocalcine. L'inactivation de Msx2 retarde la différenciation ostéoblastique par contre sa surexpression accélère l'ossification membranaire suggérant ainsi un rôle régulateur positif de l'ostéogénèse [Liu et al., 1996].

De même certains facteurs de la famille AP-1, dont c-fos, contrôlent la prolifération des ostéoblastes et l'expression des gènes dont le promoteur contient des sites AP-1 [Grigoriadis et al., 1995].

Plus récemment, le facteur de transcription Ostérix a été identifié comme étant nécessaire au passage pré-ostéoblaste/ostéoblaste [Nakashima et al., 2002]. C'est un facteur de transcription à doigt de zinc spécifiquement exprimé dans tous les os en développement.

A l'inverse, le facteur de transcription Twist est un régulateur négatif puisque son inactivation augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes [Bialek et al., 2004].

Rôle des interactions cellulaires

Plusieurs types d'interactions cellulaires ont un rôle inducteur sur la différenciation des ostéoblastes. C'est le cas de certaines molécules d'adhérence intercellulaire telle que la N-cadhérine qui est impliquée dans l'induction des gènes de différenciation dont Cbfa1/Runx2 dans les ostéoblastes [Hay et al., 2000]. Les jonctions communicantes de type gap contrôlent également l'activité fonctionnelle des ostéoblastes, ainsi la surexpression des connexines 43 et 45 module l'expression de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse.

Rôle des facteurs locaux et systémiques

Parmi les hormones connues pour contrôler la formation osseuse, la PTH, les glucocorticoïdes et la vitamine D sous sa forme métaboliquement active (1,25 dihydroxyvitamine D₃) sont les plus importantes.

La PTH a pour cible les ostéoblastes qui expriment son récepteur PTHrP ("parathyroid hormone related peptide") et a des effets anaboliques sur la formation osseuse [Strewler et al., 2001]. *In vitro*, la PTH stimule la prolifération des précurseurs ostéoblastiques et inhibe l'apoptose augmentant ainsi la durée de vie de l'ostéoblaste.

Les glucocorticoïdes ont des effets complexes sur les ostéoblastes qui varient selon leur stade de maturation. La dexaméthasone inhibe la prolifération de préostéoblastes murins [Taira et al., 2003] mais stimule la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes humains [Yang et al., 2003]. Les glucocorticoïdes vont également stimuler l'apoptose diminuant ainsi la durée de vie de l'ostéoblaste [Manolagas, 2000].

La 1,25 dihydroxyvitamine D₃ va également influencer la différenciation ostéoblastique : elle inhibe la prolifération des ostéoblastes, la transcription de la chaîne $\alpha 1$ (I) du collagène de type I et stimule l'expression de gènes tels que l'ostéopontine et l'ostéocalcine [Viereck et al., 2002].

Plusieurs facteurs locaux sont d'importants régulateurs de la différenciation ostéoblastique. Les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes eux-mêmes et qui s'incorporent dans la matrice osseuse. On peut citer notamment les IGFs, les BMPs, les FGFs et le TGF- β . L'IGF-1 va activer la prolifération ostéoblastique et la synthèse de collagène de type 1 *in vitro* et la formation osseuse *in vivo*.

Les BMPs (BMPs -2, -4, -6, -7), membres de la superfamille des TGFs- β , augmentent l'expression de Cbfa1/Runx2 dans les précurseurs ostéoblastiques et stimulent les gènes de la phosphatase alcaline, du collagène de type 1 et de l'ostéocalcine dans les ostéoblastes proprement dit. [Yamaguchi et al., 2000].

Les FGFs sont des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes. *In vitro*, les effets du FGF dépendent du stade de différenciation cellulaire.

La figure 3 résume les principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogenèse (d'après Marie, 2001)

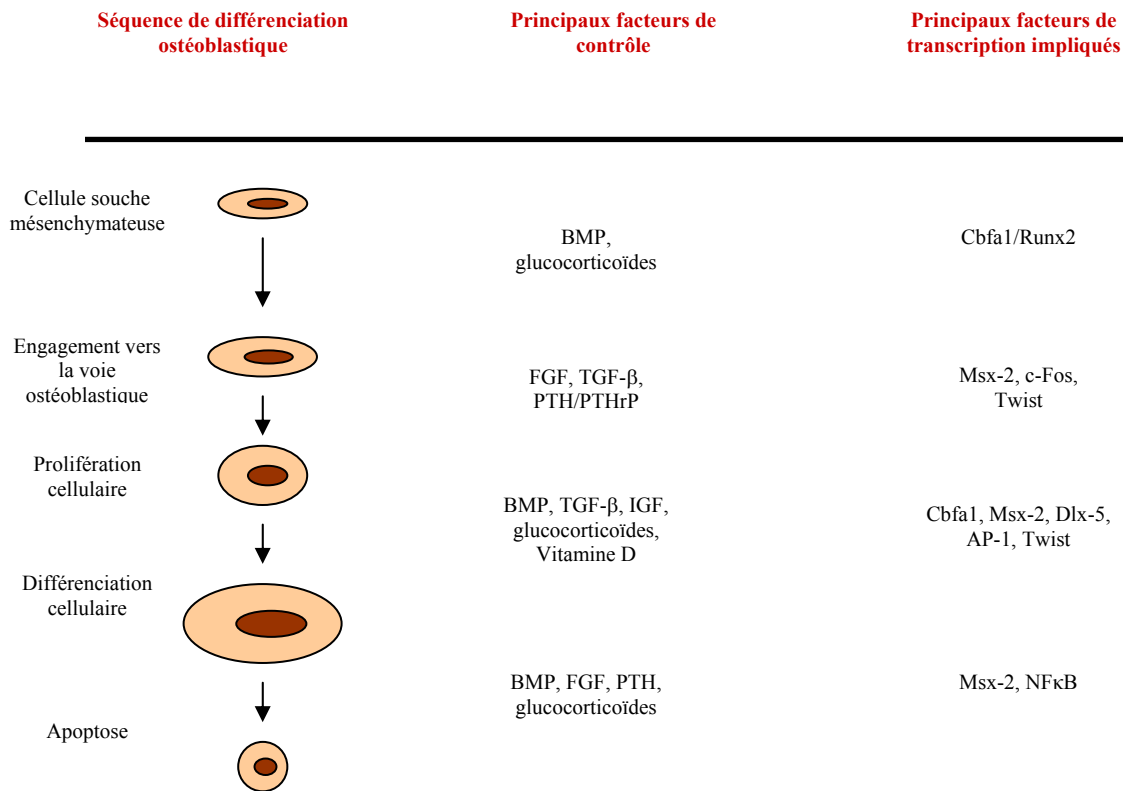


Figure 3 : Principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogénèse

1-2-3 Expression du phénotype ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique présentent plusieurs caractéristiques permettant leur identification. Ainsi, elles présentent une forte activité phosphatase alcaline et produisent des protéines spécifiques de la matrice extracellulaire osseuse telles que le collagène de type I (COL I) et des protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine (OC), l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéonectine (ON) et la fibronectine cellulaire (FN). Les ostéoblastes ont également une spécificité fonctionnelle liée à leur capacité à minéraliser la matrice extracellulaire osseuse.

Ces protéines sont impliquées dans l'organisation de la matrice collagénique ainsi que dans la régulation de la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite [Goldberg et al., 2001].

Il est à noter que l'expression ostéoblastique de ces différents composés varie au cours des phases de différenciation de l'ostéoblaste (figure 4).

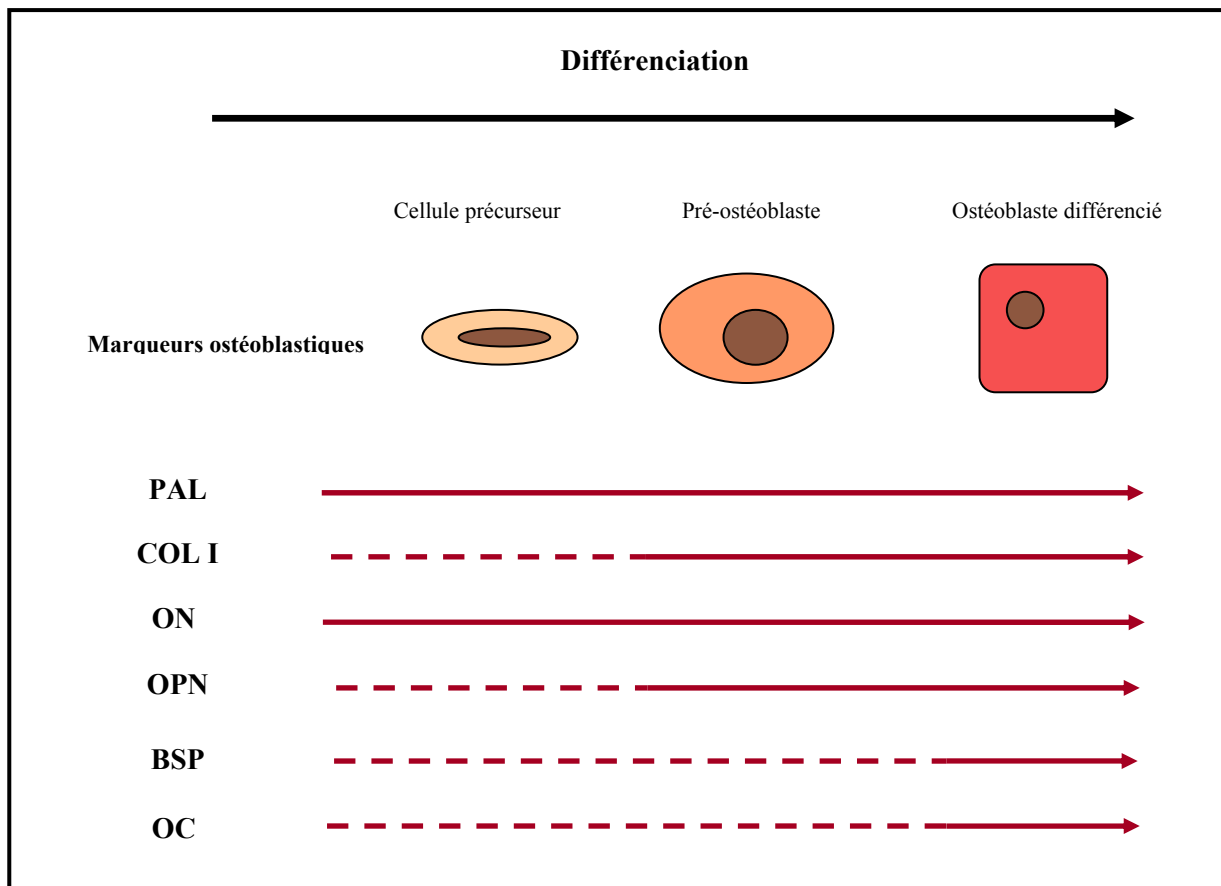


Figure 4 : Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste (d'après Marie, 2001). - - - - - : faible expression, — : forte expression.

Les collagènes

Le collagène constitue 80 à 90% de la fraction organique de l'os. Ses fibres s'organisent avec les cristaux inorganiques d'hydroxyapatite de façon différente en fonction de leur localisation. Le collagène de type I représente plus de 95% du collagène total présent dans la matrice osseuse. Les collagènes de type III, V, VII et XII sont également présents mais en quantité moindre.

Les protéines non collagéniques (PNC) présentes dans la matrice osseuse

La fibronectine cellulaire

Il s'agit d'une molécule multifonctionnelle qui participe à un grand nombre de processus extracellulaires comme l'attachement, la migration cellulaire et l'organisation de la

matrice [Moursi et al., 1997]. Cette molécule est un dimère composé de deux sous-unités contenant chacune 9 domaines pour la fixation des protéines diverses comme le collagène et la fibrine par exemple.

L'ostéonectine

L'ostéonectine est une glycoprotéine qui peut représenter jusqu'à 25% des PNC. Toutefois, elle n'est pas exclusivement synthétisée par les ostéoblastes. Elle présente une affinité élevée pour le COL I et l'hydroxyapatite. Son association à l'hydroxyapatite est principalement due à la présence dans la région amino-terminale de nombreux sites de liaison au calcium, de plus ou moins grande affinité. L'ON jouerait un rôle important dans la régulation de l'adhésion et de la prolifération cellulaire.

La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme capable d'hydrolyser les esters monophosphates à pH physiologique [Wuthier et Register, 1984]. Des études structurales ont montré que cette enzyme est associée à des phospholipides spécifiques au niveau de la membrane plasmique des ostéoblastes. La PAL fait partie de la classe des protéines de membrane cellulaire (Thy-1 et N-CAM) qui sont liées, de manière covalente, au complexe phospholipidique du phosphatidyl inositol (PI) dans la membrane plasmique. Ainsi la PAL peut être libérée de la membrane cellulaire par une phospholipase C. Cette protéine liée à la membrane plasmique est un marqueur précoce de l'ostéogenèse et sa fonction est de fournir du calcium et du phosphate pour la croissance des cristaux d'hydroxyapatite [Owen et al., 1990]. L'activité PAL est présente dans les pré-ostéoblastes et ostéoblastes différenciés mais pas dans les ostéocytes (ostéoblastes enchâssés dans la matrice osseuse). Ainsi l'activité PAL augmente dès la phase de prolifération pour atteindre son maximum pendant la phase de synthèse de la MEC puis diminue au début de la minéralisation [Owen et al., 1990]. Il a été clairement admis que l'augmentation de l'activité spécifique de la PAL dans une population de cellules osseuses reflète l'évolution vers un stade plus différencié. Le taux d'expression de cette protéine est utilisé dans les expérimentations *in vitro* comme marqueur relatif de la différenciation ostéoblastique [Siebers et al., 2004; Rodan et al., 1984].

L'ostéopontine

Cette protéine est produite par les ostéoblastes et est présente dans la matrice osseuse [Denhardt et Noda, 1998]. Toutefois, elle n'est pas spécifique de l'os : on la retrouve ainsi dans la dentine, le sang circulant, les fluides biologiques et les muscles par exemple [Gericke et al., 2005]. La présence de cette protéine dans divers organes et dans le sang peut suggérer que l'ostéopontine possède non seulement un rôle structural mais aussi celui d'une cytokine. Elle possède une séquence RGD et est ainsi capable de se lier à un grand nombre de récepteurs de la famille des intégrines. Le plus souvent les chaînes αv et $\beta 3$ sont responsables de la majorité des signalisations induites par l'OPN. Cette protéine est présente dans les ostéoblastes, les ostéocytes et dans les cellules stromales de la moelle. Le rôle de l'OPN dans l'os est essentiellement associé à l'attachement, à l'étalement des ostéoblastes et à l'interaction avec d'autres molécules collagéniques ou non de la matrice osseuse, telle que la fibronectine. Cette protéine subit une régulation post-transcriptionnelle comme des phosphorylations et sulfatations [Gericke et al., 2005]. Les ostéoblastes produisent une forme d'OPN hautement sulfatée et phosphorylée. L'OPN contient également 10 à 12 résidus d'acide aspartique lui permettant de se lier ainsi à la phase minérale de l'os et de réguler sa nucléation [Sodek et al., 2000]. Elle a été localisée dans l'os en développement, dans les fémurs embryonnaires pendant les stades précoces de l'ostéogenèse et apparaît avant la minéralisation plus tôt que d'autres protéines non collagéniques de la matrice osseuse, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine. On la retrouve dans les pré-ostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes. Son expression apparaît durant la phase de prolifération mais son niveau maximal d'expression est atteint durant la phase de minéralisation.

La sialoprotéine osseuse

La sialoprotéine osseuse est une glycoprotéine phosphorylée et sulfatée riche en acide sialique. Elle présente des analogies de structure avec l'OPN et possède notamment une séquence RGD lui permettant de se lier à des récepteurs tels que les intégrines notamment les intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ [Sung et al., 1998]. Elle n'est pas exclusivement produite par les ostéoblastes, des ARNm codant la BSP sont détectés également dans les ostéoclastes [Bianco et al, 1991 ; Masi et al., 1995] et les plaquettes [Chenu et Delmas, 1992]. Elle fonctionne comme un nucléateur de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse *in*

vitro et *in vivo* [Hunter et Goldberg 1993 ; 1994]. Il s'agit d'un des marqueurs primaires de la phase terminale de la différenciation ostéoblastique. Des études menées sur le gène de la BSP révèlent qu'un certain nombre de facteurs présentent des sites de réponse sur son promoteur, elle est ainsi modulée par la vitamine D, les glucocorticoïdes, le TGF- β , la PTH mais également des facteurs de transcription comme le Cbfa1 et AP-1 [Yamauchi et al., 1996 ; Ogata et al., 1997 ; Yang et al., 1996].

De récentes études suggèrent que la BSP autorégule sa propre expression par un rétrocontrôle positif sur son promoteur. Cette autorégulation est nécessaire au contrôle de l'expression de la BSP, de la différenciation de l'ostéoblaste et de la minéralisation de la matrice extracellulaire pendant la formation osseuse [Tu et al., 2004].

L'ostéocalcine

L'ostéocalcine est une protéine carboxylée au niveau de ses trois résidus d'acide glutamique par un processus vitamine K dépendant. Elle n'a pas été détectée dans d'autres types cellulaires que ceux produisant de l'os ou de la dentine [Hauschka et al., 1989]. Elle est exprimée par les ostéoblastes matures et est souvent considérée comme le marqueur terminal de la différenciation ostéoblastique.

L'expression de l'OC coïncide avec le début de la formation des nodules osseux et atteint un taux maximal durant la phase de minéralisation *in vivo* et *in vitro* [Owen et al., 1990]. La fonction de l'OC semble être la régulation de la partie minérale de l'os, elle a en effet une grande affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite. *In vitro*, elle est un inhibiteur puissant de la croissance du cristal d'hydroxyapatite, ainsi que de sa nucléation [Boskey et al., 1985 ; Hunter et al., 1996].

Il existe d'autres protéines produites par les ostéoblastes comme la thrombospondine de type I, décrite comme une protéine d'adhésion, ou des protéoglycannes tels que chondroïtine-sulfate, héparane sulfate, décorine et biglycane.

2- Le TGF- β

2-1 Généralités

Le TGF- β doit son nom aux hypothèses qui ont conduit à sa purification plus qu'à ses véritables fonctions biologiques. Ainsi, le nom de TGF- β a été donné à une protéine isolée du milieu de culture de cellules de sarcome capable de transformer des cellules saines avoisinantes. La super-famille des TGF- β comprend une multitude de facteurs distincts qui peuvent être regroupés en sous-familles en fonction de leur identité de séquence [Feige et al., 1996]. La plupart des membres de la famille des TGF- β a été caractérisée chez les mammifères. Au sein de la sous-famille TGF- β (TGF- β 1 à 5), les molécules présentent une analogie de séquence supérieure à 70% et une similitude fonctionnelle. Parmi les cinq gènes connus de TGF- β , trois seulement sont exprimés chez les mammifères (TGF- β 1, β 2 et β 3). Bien que des différences fonctionnelles existent entre ces trois membres, ils partagent une grande diversité de fonctions et peuvent être considérés comme le produit de gènes redondants. Le plus étudié de ces facteurs, le TGF- β 1, a parmi d'autres activités la capacité d'induire la formation du mésoderme au cours de l'embryogenèse, de stimuler la prolifération des ostéoblastes et des chondrocytes et d'être chémoattractif pour les monocytes.

Ainsi au niveau des ostéoblastes, des chondrocytes ou des ostéoclastes, il intervient dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de la maturation ostéoblastique [Kassem et al., 2000 ; Centrella et al., 1994]. Ses effets sur les ostéoblastes varient en fonction de sa concentration, de la densité cellulaire, de l'origine des cellules et de leur maturité [Centrella et al., 1987 ; Centrella et al., 1991]. Le TGF- β 1 est produit par les ostéoblastes et stocké dans la matrice osseuse faisant de l'os le plus important réservoir de TGF- β du corps humain. Les ostéoblastes sont les cellules présentant le plus grand nombre de récepteurs au TGF- β [Lind, 1996]. Au niveau des ostéoblastes humains normaux, le TGF- β 1 stimule la prolifération cellulaire, induit des changements morphologiques, une réorganisation et des variations de synthèse des protéines du cytosquelette [Lomri et Marie, 1990].

2-2 Les différentes formes latentes de TGF- β 1

La molécule de TGF- β 1 est constituée de deux chaînes identiques de 12 kDa, associées par un pont disulfure intercaténaire en position 355 et de nombreuses liaisons hydrophobes. L'assemblage des deux chaînes de manière antiparallèle laisse persister une poche hydrophobe au cœur de la molécule. Le TGF- β 1 est un homodimère de 25 kDa, il est synthétisé sous forme d'un précurseur inactif qui est clivé au cours de la maturation de la molécule en un propeptide amino-terminal appelé LAP ("Latency Associated Peptide") et un fragment carboxy-terminal qui constitue le facteur de croissance actif proprement dit. A la différence de la plupart des autres cytokines, le TGF- β 1 mature reste associé de façon non covalente à son propeptide après sa sécrétion.

Le petit complexe latent

Les chaînes constitutives du TGF- β 1 sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif de 390 acides aminés comportant du côté N-terminal un propeptide de 278 résidus et les 112 résidus carboxy-terminaux constitutifs du TGF- β 1 actif. Après clivage du peptide signal de 29 acides aminés, le pro-TGF- β 1 est coupé entre les résidus arginine 278 et 279 par une protéase intracellulaire identifiée à la furine convertase [Dubois et al, 1995]. La partie précurseur (résidus 30-278) reste associée au peptide carboxy-terminal (résidus 279-390) par des liaisons non covalentes. La présence du propeptide appelé LAP, peptide associé à l'état de latence, rend le TGF- β 1 biologiquement inactif empêchant sa reconnaissance par les récepteurs de sa signalisation.

La protéine LAP est un homodimère de 80 kDa qui permet le repliement correct et la sécrétion de TGF- β 1. Il y a trois cystéines par monomère de LAP. Les monomères de LAP sont reliés par des ponts disulfure impliquant les deux cystéines 223 et 225. La troisième cystéine en position 33, proche de la partie amino-terminale est reliée à LTBP-1 ("Latent TGF- β Binding Protein"), protéine de liaison des TGF- β latents, par un pont disulfure [Munger et al., 1997]. Le TGF- β 1 possède trois sites de glycosylation sur les acides aminés asparagine 82, 136 et 176. Deux de ces trois sites de glycosylation sont aussi phosphorylés par un groupement mannose-6-phosphate [Purchio et al., 1988]. Ces groupements glucidiques sont nécessaires à la sécrétion du petit complexe latent. Il est à noter qu'en l'absence de LAP,

le TGF- β 1 mature n'est pas sécrété. Ce petit complexe latent d'une masse moléculaire de 105 kDa est donc le produit d'un seul gène. Il est sécrété par de nombreux types cellulaires en cultures notamment les cellules osseuses normales et tumorales, les fibroblastes, les lignées de glioblastome, etc.

La figure 5 représente les étapes de la biosynthèse du TGF- β 1.

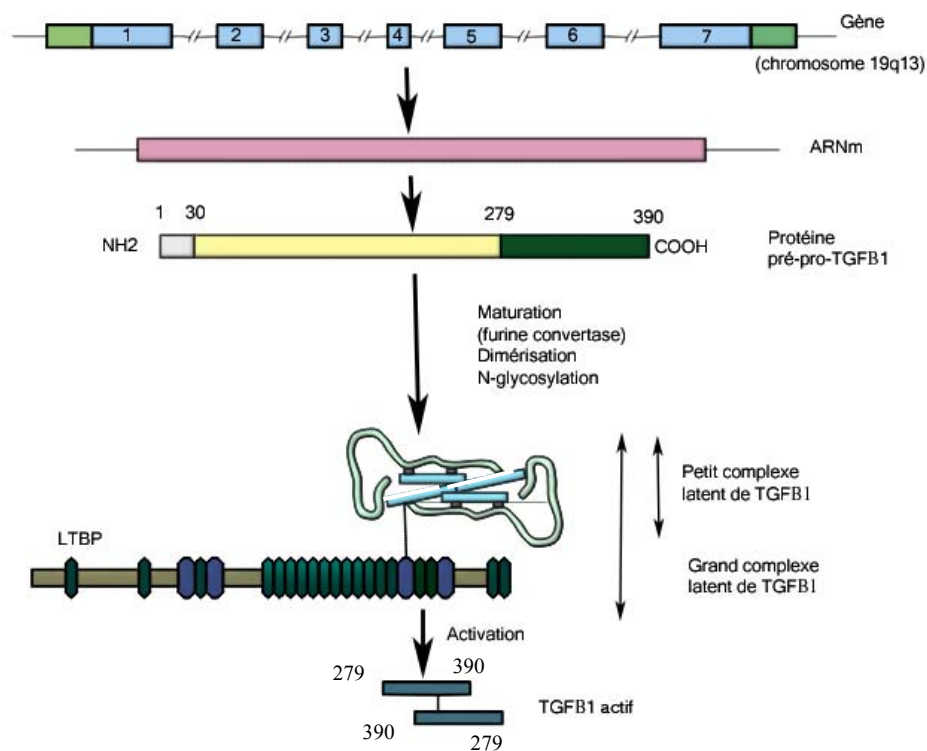


Figure 5 : Biosynthèse du TGF- β 1 (selon Feige et al., 1996)

Le grand complexe latent

Une famille de glycoprotéines connues sous le nom de "Latent TGF- β Binding Protein" (LTBP) se lie de façon covalente au LAP par l'intermédiaire d'un pont disulfure impliquant la cystéine 33 du proTGF- β 1(cf chapitre précédent). Les LTBPs ne sont pas requises pour le maintien de la latence de TGF- β mais peuvent faciliter la sécrétion, le stockage ou l'activation du complexe TGF- β -LAP. Les LTBPs font partie d'une superfamille de protéines appelée Fibrilline-LTBP [Todorovic et al., 2005]. Le clonage de l'ADNc de LTBP a établi qu'il s'agissait d'une protéine de liaison du calcium composée de deux types distincts de modules répétitifs riches en cystéine : des motifs de type EGF et des motifs à huit résidus cystéine [Kanzaki et al., 1990]. Quatre gènes de LTBP sont connus et diffèrent entre eux par le nombre et l'arrangement des groupement répétitifs [Todorovic et al., 2005]. Tout comme la fibrilline, LTBP est observée sous forme de dépôts extracellulaires fibrillaires dans de nombreux tissus et pourrait, de ce fait, cibler le TGF- β à la surface cellulaire (figure 6). Il a été montré que la majorité du TGF- β 1 latent stocké dans la matrice osseuse était associée à LTBP-1 [Dallas et al., 1995 ; Dallas et al., 2000].

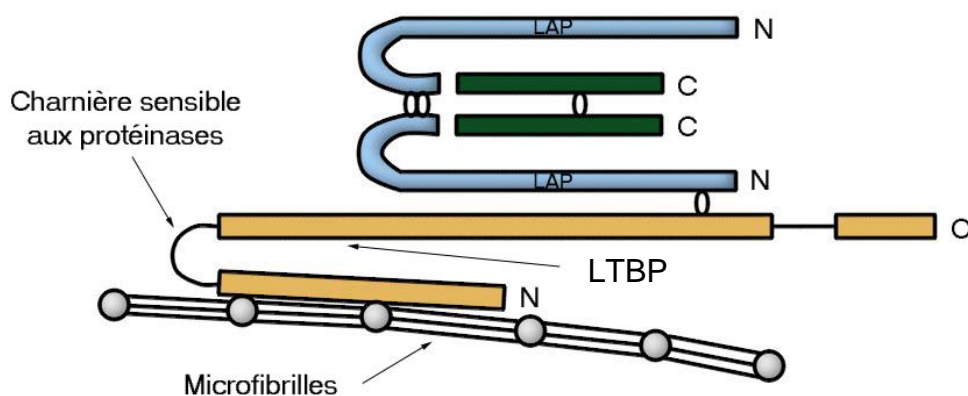


Figure 6 : Représentation de l'association du TGF- β 1 latent aux microfibrilles
(Raghunath et al., 1998)

Le complexe α 2-macroglobuline/TGF- β

L' α 2-macroglobuline (α 2M) est un inhibiteur de protéase à large spectre présent en quantité abondante dans le plasma (2-4 mg/ml). L'inhibition des protéases se fait par un mécanisme suicide où l'attaque protéolytique de l' α 2M induit l'activation d'un groupement réactif thioester qui forme une liaison covalente avec la protéase et l'emprisonne dans la molécule d' α 2M, qui subit une trans-conformation. L' α 2M est synthétisée et sécrétée par divers types cellulaires, en particulier les hépatocytes, les macrophages et les cellules cortico-surréaliennes. L' α 2M est également une protéine de liaison de diverses cytokines dont notamment PDGF, IL1 β , IL2, IL6, TGF- β 1 et TGF- β 2. Dans le plasma humain, la forme latente de TGF- β a été identifiée comme étant un complexe α 2M/TGF- β . Le TGF- β forme rapidement un complexe réversible avec l' α 2M qui se transforme lentement en un complexe irréversible (figure 7). Présent dans la plupart des types cellulaires, le récepteur de l' α 2M, α 2M-LRP ("LDL-Receptor Related Protein") est un homologue des récepteurs des LDL ("low density lipoproteins") qui possèdent la capacité de lier une diversité de ligands. Seule l' α 2M trans-conformée par les protéases est capable de se lier au récepteur de l' α 2M. La liaison est suivie d'une internalisation et d'une entrée dans la voie de dégradation lysosomiale. En aucun cas, le TGF- β n'est capable de provoquer le changement de conformation de l' α 2M à la façon des protéases. Le complexe α 2M native/TGF- β représente probablement une forme de transport du TGF- β ou de neutralisation réversible de son activité. Les complexes non covalents α 2M/TGF- β peuvent être dissociés par l'héparine. Plusieurs types cellulaires, tels que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses sécrètent des quantités importantes de glycosaminoglycannes apparentés à l'héparine et pourraient de ce fait libérer du TGF- β actif à partir de complexes α 2M/TGF- β . Il a été montré par ailleurs que l' α 2M plasmatique contient une molécule de TGF- β pour 200 000 molécules. Mise au contact des cellules cortico-surréaliennes, l' α 2M plasmatique reproduit les effets inhibiteurs du TGF- β sur la synthèse de cortico-stéroïdes. Cette observation suggère que ces cellules sont capables de libérer du TGF- β actif à partir de complexes α 2M/TGF- β [Keramidas et al., 1992 ; Feige et al., 1996].

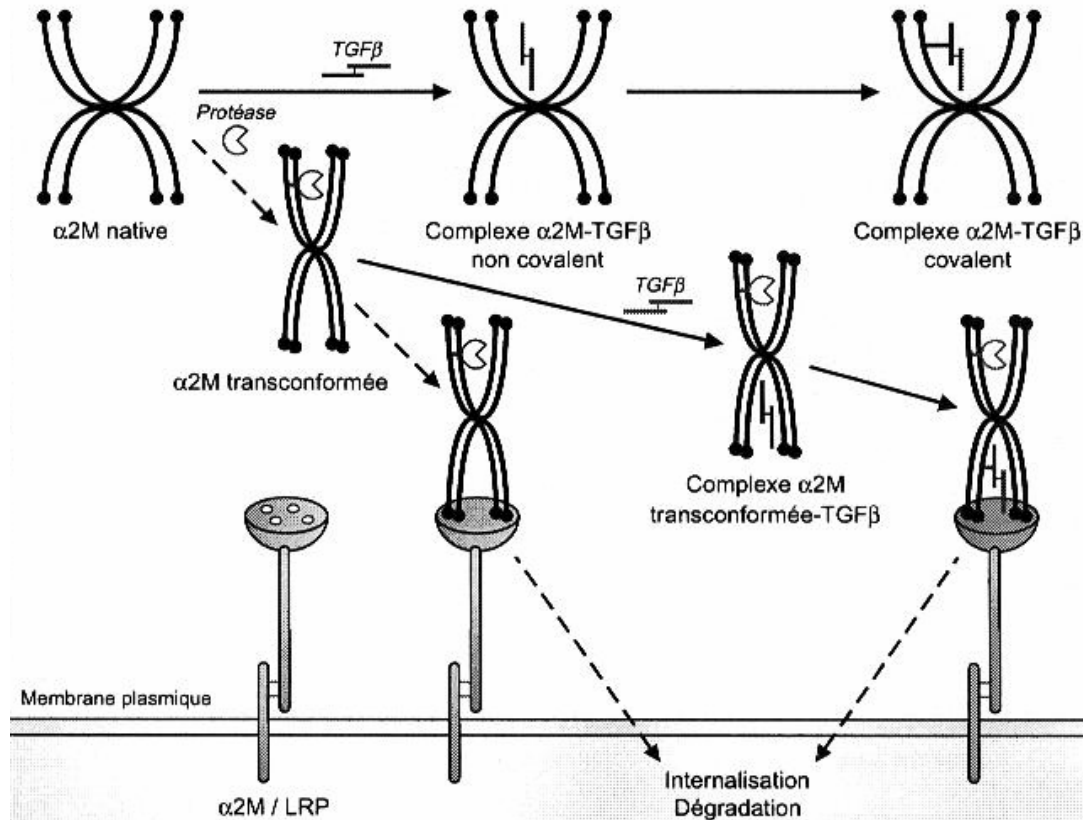


Figure 7 : Les complexes $\alpha 2M/TGF-\beta$ (Feige et al., 1996)

2-3 Activation du TGF- β latent

2-3-1 Mécanismes physiologiques de l'activation et de la régulation

In vitro, le TGF- β latent peut être activé par différents agents dénaturants tels qu'une augmentation de la température, des variations importantes de pH, des agents chaotropiques ou encore des détergents [Lyons et al., 1990 ; Miyazono et al., 1988 ; Taipale et al., 1995]. Physiologiquement, les mécanismes impliqués sont principalement d'ordre protéolytique. Les enzymes mises en jeu sont : le récepteur à Mannose-6-Phosphate de l'IGF-II (M6P/IGFII-R), la plasmine générée par l'"Urokinase Plasminogen Activator" (uPA), les cathepsines ou encore les MMPs-2 et -9 [Lyons et al., 1990 ; Yu et al., 2000]. Ces enzymes peuvent aussi bien cibler les protéines LAP que LTBP [Murphy-Ullrich, 2000].

L'activation du TGF- β latent peut également être basée sur des altérations conformationnelles qui peuvent mettre en jeu l'intégrine $\alpha\beta6$ [Munger et al., 1999]. La protéine LAP se fixe à cette intégrine par l'intermédiaire d'une séquence RGD. L'activation est alors due à des forces exercées par le cytosquelette sur l'ensemble du complexe intégrine/TGF- β latent (figure 8). Toutefois, ce mécanisme semble spécifique à l'isoforme $\beta1$ du TGF- β . De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha\beta6$ est restreinte aux cellules épithéliales. On peut donc considérer ce mécanisme d'activation du TGF- $\beta1$ latent spécifique aux cellules épithéliales.

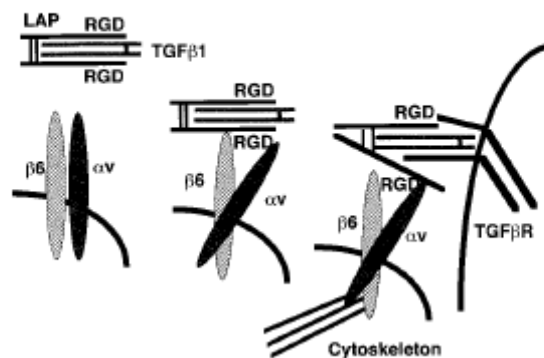


Figure 8 : Mécanisme d'activation du TGF- $\beta1$ latent par l'intégrine $\alpha\beta6$
(selon Munger et al., 1999)

2-3-2 Activation par la Thrombospondine de type 1

Murphy-Ullrich et collaborateurs (1992) ont démontré que la thrombospondine de type 1 (TSP-1) pouvait induire la libération de TGF- β actif à partir d'un milieu conditionné de cellules endothéliales dont le mécanisme succinct est décrit dans la figure 9

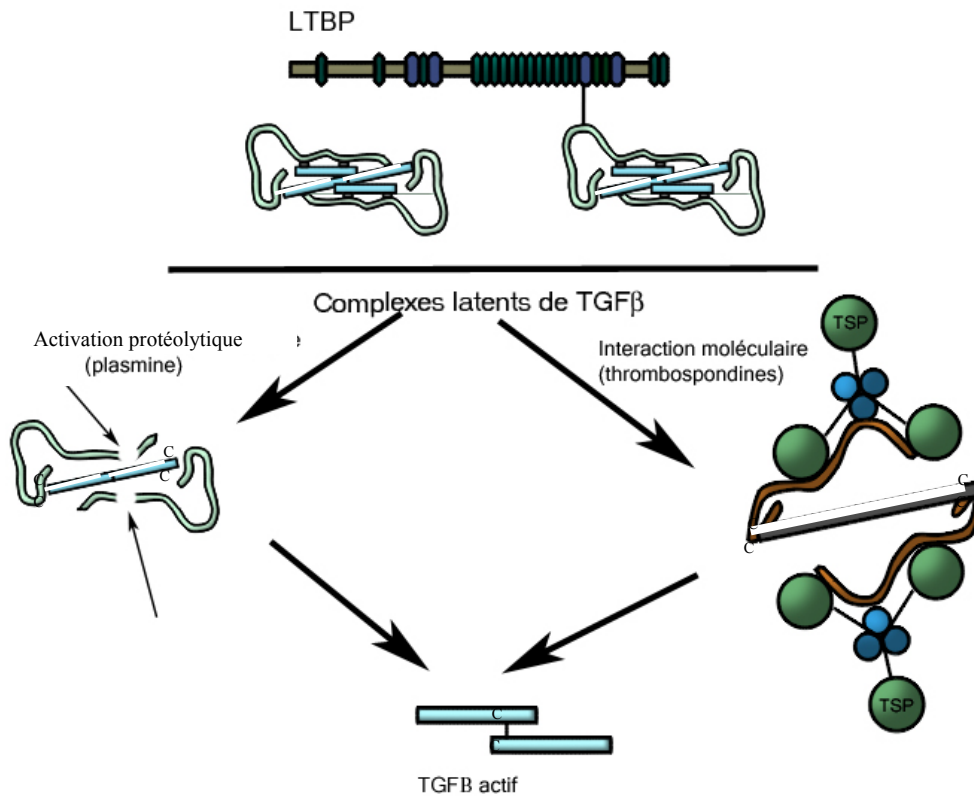


Figure 9 : Mécanismes d'activation du TGF- β latent.

La voie de gauche illustre la coupure protéolytique de LAP par la plasmine, la voie de droite illustre l'interaction de LAP avec la TSP-1 (Feige et al, 1996).

La TSP-1 est une glycoprotéine homotrimérique de 450 kDa sécrétée par de nombreux types cellulaires notamment par les fibroblastes, les kératinocytes et les ostéoblastes. On la retrouve dans la matrice osseuse. Elle a été initialement décrite dans les granules des plaquettes [Baenziger et al., 1971]. Les premières études concernant la fonction de cette protéine étaient donc centrées sur l'agrégation plaquettaire et la formation des caillots de fibrine. En fait, ces études ont permis de mettre à jour de nombreuses fonctions notamment sur l'attachement cellulaire, la motilité, la prolifération, l'agrégation cellulaire, l'activité de protéases extracellulaires et l'inhibition de l'angiogénèse [Adams et al., 2001].

La TSP-1 présente une structure protéique complexe. Elle est composée d'un homotrimerè lié par pont disulfure, présentant de multiples domaines constitués de sous-unités répétées (figure 10).

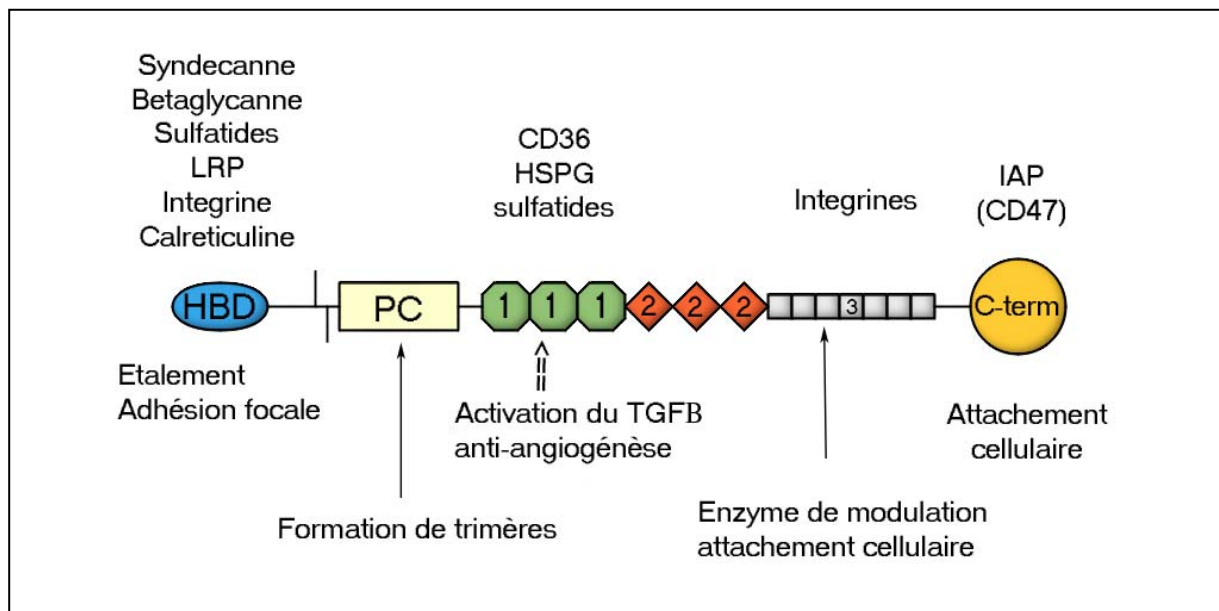


Figure 10 : Représentation schématique de la TSP-1 (selon Murphy-Ullrich, 2000)

HBD: Domaine N-terminal de liaison à l'héparine, PC: Domaine "procollagen-like". La partie supérieure de la figure indique les différentes molécules interagissant avec les différents domaines de la TSP-1. La partie inférieure indique les différentes fonctions de ces domaines.

En l'absence de tout contact cellulaire, la TSP-1 apparaît capable d'activer aussi bien le petit complexe latent que le grand complexe latent de TGF- β [Schultz-Cherry et al., 1994]. Cependant d'autres auteurs ont montré que seul le petit complexe latent pouvait être activé par TSP-1 [Souchelnitskiy et al., 1995]. L'activation dépend du temps d'interaction et de la concentration en TSP-1 mais est indépendante de la température [Murphy-Ullrich et al., 1992].

Au moment de l'activation, la TSP-1 interagit avec la région amino-terminale de LAP, formant un complexe trimoléculaire. A l'intérieur du complexe, un changement conformationnel se produit rendant la partie active du TGF- β 1 accessible à son récepteur [Schultz-Cherry et al., 1995 ; Schultz-Cherry et al., 1993].

La séquence de la TSP-1 responsable de l'activation du TGF- β 1 latent a été localisée au niveau des répétitions de type I. Il s'agit de la séquence K⁴¹²RFK⁴¹⁵ située entre la première et la deuxième répétition de type I [Schultz-Cherry et al., 1994 ; Schultz-Cherry et al., 1995]. Cette séquence KRFK se lie au LAP par des interactions qui impliquent une séquence située dans la partie amino-terminale du LAP (L⁵⁴SKL⁵⁷) [Ribeiro et al., 1999 ; Murphy-Ullrich, 2000]. Le LAP peut rester associé au complexe TSP-1/TGF- β 1 sans inhiber l'activité du TGF- β 1 associé. L'association LAP/TSP-1 suivant l'activation module la persistance de l'activité du TGF- β 1 en empêchant le repliement du complexe et l'inactivation du TGF- β 1 (figure 11). La séquence W⁴²⁰SHW⁴²³ voisine de KRFK participe à la fixation de TGF- β 1 latent sur la TSP-1 mais n'intervient pas dans l'activation elle-même. Cette séquence est considérée comme un domaine d'arrimage par rapport à la séquence d'activation KRFK. Des peptides contenant la séquence WXXW peuvent inhiber de façon compétitive la liaison de TGF- β 1 à la TSP-1, bien que la séquence WXXW ne puisse activer seule le TGF- β 1 latent.

L'activation du TGF- β 1 latent semble spécifique à la TSP-1 puisque un autre membre de la famille des thrombospondines proche de la TSP-1, la TSP-2 contenant une séquence RIR et dépourvue de la séquence KRFK, ne montre aucune capacité à activer le TGF- β 1 latent [Schultz-Cherry et al., 1995].

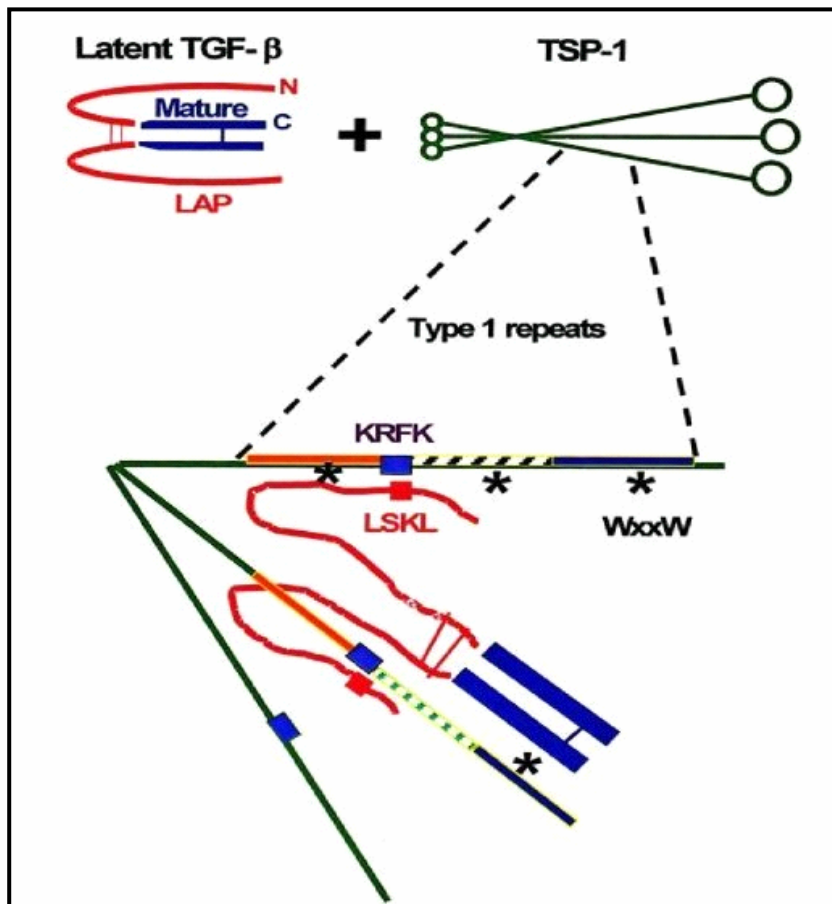


Figure 11 : Schéma de l'activation du TGF-β1 par la TSP-1
d'après Murphy-Ullrich (2000)

2-4 Récepteurs du TGF- β et voie de signalisation

Le mécanisme de signalisation de base est constitué de deux récepteurs de type sérine/thréonine kinase, récepteurs de type I et II (T β R-I et T β R-II) et d'une famille de substrats de ces récepteurs, les protéines Smad qui sont transloquées après activation vers le noyau. Le dimère de TGF- β 1 se fixe sur un complexe récepteur (2T β RI+ 2T β RII) qui active les Smad. Les Smad forment des complexes avec de multiples sous-unités qui vont réguler la transcription de gènes cibles [Massagué, 1998].

Les T β R-I et T β R-II sont des glycoprotéines de 55 et 70 kDa respectivement. Ils présentent un domaine extracellulaire relativement court (environ 150 acides aminés) qui est N-glycosylé et qui contient au moins 10 cystéines qui peuvent déterminer le repliement général de cette région. Ils possèdent également une longue région cytoplasmique, siège de l'activité sérine/thréonine kinase. La sérine 213 de la région cytoplasmique de T β R-II est phosphorylée de façon indépendante du ligand et est requise pour l'activité de signalisation. La sérine 165 de la région juxta-membranaire de T β R-I est phosphorylée par T β R-II de façon dépendante du ligand et cela semble moduler sélectivement l'intensité des différentes réponses au TGF- β 1. Quand il est apporté par le ligand, le T β R-II phosphoryle la région GS du T β R-I ce qui entraîne l'activation de sa kinase. Cette kinase phosphoryle ensuite les protéines Smad (figure 12).

Le bêtaglycane, connu sous le nom de récepteur de type III (T β R-III) est un protéoglycane ancré dans la membrane et dont la partie protéique lie avec une haute affinité les TGF- β 1, 2 et 3 [Massagué et al., 1998]. Les chaînes héparane sulfate et chondroïtine sulfate du bêtaglycane ne semblent pas avoir un rôle dans la liaison ou l'interaction de ces TGF- β avec les récepteurs de signalisation. Le bêtaglycane ne possède pas de domaine de signalisation reconnaissable mais peut faciliter la liaison du TGF- β aux récepteurs.

En présence de TGF- β 1, des sérines situées dans la partie carboxy terminale de Smad-2 et -3 sont directement phosphorylées par T β R-I. Smad-2 et -3 sont des Smad régulés ou R-smad. Cependant pour pouvoir interagir avec le T β R-I et être phosphorylées, Smad-2 et -3 doivent être activées par une protéine de liaison à la membrane cellulaire. Cette protéine est appelée SARA (ancrage des Smad pour l'activation du récepteur). Une fois phosphorylées, Smad-2 et -3 peuvent former des hétéro-oligomères avec le facteur Smad-4 et migrer dans le noyau [Derynck et al., 1998 ; Siegel et Massagué, 2003].

Dans la voie de signalisation vers le noyau, les R-Smad activées s'associent à des protéines, les Co-Smad comme Smad-4 (la seule identifiée chez les mammifères à ce jour) qui ne sont pas des substrats des récepteurs mais dont la présence est requise pour la plupart des réponses induites par les Smad. Les R-Smad et Co-Smad consistent en des domaines amino et carboxy-terminaux conservés qui forment des structures globulaires [Shi et al., 1998]. Le domaine amino-terminal possède une activité de liaison à l'ADN alors que la partie carboxy-terminale possède quant à elle une activité transcriptionnelle. Smad-3 par exemple reconnaît spécifiquement et directement une séquence d'ADN appelée boîte CAGA, présente dans les gènes cibles induites par le TGF- β 1 comme le collagène de type VII, c-Jun ou Jun-B. Hormis les R-Smad et les Co-Smad qui apportent les signaux depuis les récepteurs jusqu'au noyau, il existe un troisième groupe de Smad qui agit de façon antagoniste empêchant ainsi la transduction du signal. C'est le cas de Smad-6 et Smad-7, I-Smad ou Smad inhibiteur, chez les vertébrés (figure 12).

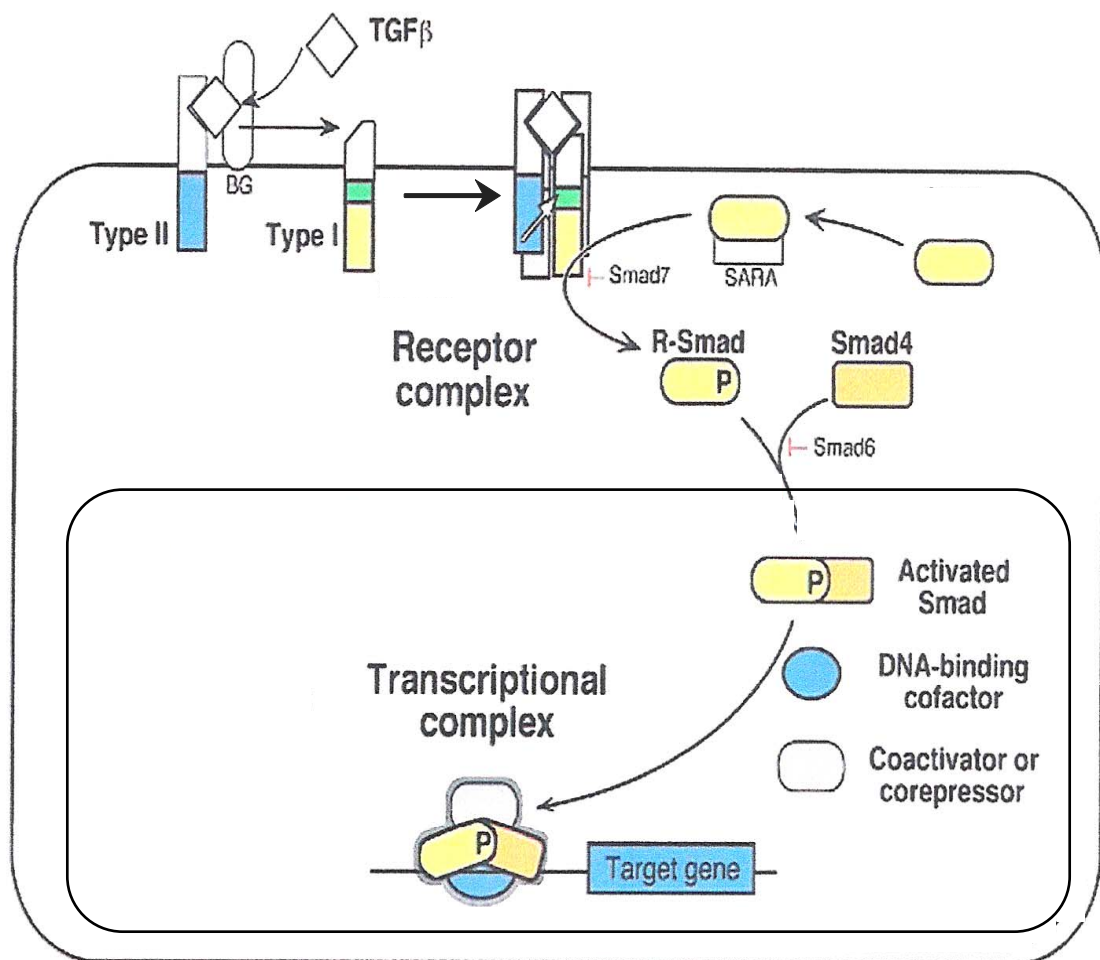


Figure 12: Mécanisme de signalisation du TGF- β 1 (selon Massagué et Wotton, 2000)

2-5 Le TGF- β et les ostéoblastes

Le TGF- β est un facteur de croissance majeur présent en grande quantité dans la matrice extracellulaire osseuse, faisant de l'os le plus grand réservoir de TGF- β de l'organisme.

Plusieurs isoformes de TGF- β sont présentes chez les mammifères selon les types cellulaires, toutefois le TGF- β 1 est l'isoforme majoritaire trouvée dans l'os [Pfeilschifter et al., 1998].

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les TGF- β s pouvaient avoir soit des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur la réplication, le développement cellulaire et la différenciation phénotypique en fonction du type cellulaire. De plus, en ce qui concerne les ostéoblastes, au sein d'une même souche cellulaire des effets opposés ont été remarqués dépendant de la concentration de TGF- β utilisée, de l'origine des cellules et de leur stade de maturité [Centrella et al., 1991].

Ainsi le TGF- β 1 est, avec la 1,25-dihydroxyvitamine D₃, un facteur impliqué dans la stimulation de la prolifération des ostéoblastes. Des études menées sur des ostéoblastes isolés à partir d'os de rat jeunes ou âgés ont montré que la prolifération des ostéoblastes issus de rats jeunes était stimulée par le TGF- β 1 de façon concentration dépendante et que celui-ci n'avait aucun effet sur les ostéoblastes issus de sujets âgés et ce, indépendamment de la dose de TGF- β 1 utilisée [Shiels et al., 2002].

Outre son effet sur la prolifération des ostéoblastes, le TGF- β 1 a un effet stimulateur de la formation osseuse en stimulant de nombreuses protéines matricielles comme le collagène de type I, la fibronectine, la laminine, l'ostéopontine et l'ostéonectine [Bonewald et al., 1994].

Il a été suggéré comme étant un facteur de couplage entre la formation et la résorption osseuse puisqu'il est produit par les ostéoblastes sous forme latente, stocké dans la matrice osseuse et libéré de la matrice par les ostéoclastes qui la résorbe [Erlebacher et al., 1998 ; Gebken et al., 1999].

Le TGF- β 1 provoque des effets divers sur les ostéoblastes selon que ceux-ci se trouvent dans leur phase de prolifération ou de différenciation [Gurlek et Kumar, 2001]. Ainsi, il est capable de stimuler la prolifération des cellules précurseurs des ostéoblastes ainsi que les cellules non transformées de la lignée MC3T3 et de la lignée issue d'ostéosarcome humain SaOS II, par contre sur les lignées UMR-106 (rat), ROS 17/2.8 et la lignée humaine

MG-63 (ostéosarcome), il inhibe la prolifération cellulaire [Pfeilschifter et al., 1987; Mundy et al., 1990; Noda et al., 1988].

Il est également capable d'agir sur des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Ainsi, il a été montré qu'il était capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle du facteur Cbfa1 grâce à l'interaction de ce facteur avec Smad-3. Comme Cbfa1 active sa propre transcription, cette répression aboutit à une diminution de son expression dans un modèle d'ostéoblastes de rongeur. Cette répression de Cbfa1 par le TGF- β exerce également un effet inhibiteur sur les gènes contrôlés par Cbfa1 notamment sur l'ostéocalcine. Le promoteur du gène de l'ostéocalcine possédant des sites de liaison spécifiques du Cbfa1 de type OSE2, il a été montré que le TGF- β inhibait de ce fait la production d'ostéocalcine et était un inhibiteur de la différenciation terminale des ostéoblastes [Alliston et al., 2001].

3- Les métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) constituent une famille d'endopeptidases calcium dépendantes comportant un atome de zinc dans leur site actif, apparentées à la fois structurellement et fonctionnellement indiquant qu'elles sont issues d'un gène ancestral commun, et capables de dégrader quasiment tous les composants de la matrice extracellulaire [Curran et al., 1999 ; Curran et al., 2000; Massova et al., 1998]. Il existe environ 26 MMPs humaines différentes identifiées et/ou clonées [Murray, 2001]

Ces enzymes possèdent des homologies de séquence importantes et une organisation commune en domaines multiples, mais leur spécificité de substrat et leur régulation transcriptionnelle varient.

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

- 1- l'existence d'un profil caractéristique en domaines conservés ;
- 2- une capacité à dégrader un ou plusieurs substrats matriciels à pH voisin de la neutralité ;
- 3- la présence d'un atome de zinc dans leur site actif et le besoin de calcium pour que l'enzyme soit active;
- 4- une sécrétion sous forme latente (ou zymogène) avec activation de ces proenzymes par d'autres protéases ou des agents organo-mercuriques ;
- 5- une régulation de leur activité par des inhibiteurs tissulaires spécifiques nommés TIMPs ("Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase").

Les MMPs sont classiquement réparties en sous-familles distinctes en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat. On distingue donc les collagénases (MMPs-1, -8 et -13), les gélatinases (MMPs-2 et -9), les stromélysines (MMPs-3, -10 et -11), la matrilysine (MMP-7), la métalloélastase macrophagique (MMP-12) et enfin les MMPs de type membranaire (MT-MMPs 1 à 6).

Le tableau 2 représente les différents membres des sous-familles de MMPs les plus communément étudiés.

Tableau 2. Classification des principales MMPs selon leur structure et spécificité de substrat (selon McCawley et Matrisian, 2001)

Enzymes	MMPs	PM	Substrats matriciels
Gélatinases			
Gélatinase A	MMP-2	72 000 / 62 000	Gélatine, collagène IV, V, VII, X et XI, élastine, fibronectine et protéoglycanes
Gélatinase B	MMP-9	92 000 / 86 000	Gélatine, collagène IV, V, élastine, fibronectine et protéoglycanes
Collagénases			
Collagénase intersticielle	MMP-1	55 000 / 45 000	Collagène I, II, III, VII, X, gélatine, protéoglycane
Collagénase du neutrophile	MMP-8	85 000 / 64 000	Collagène I, II, III, protéoglycanes
Collagénase 3	MMP-13	60 000 / 48 000	Collagène I, II et III
Stromélysines			
Stromélysine-1	MMP-3	57 000 / 44 000	Protéoglycanes, fibronectine, laminine, élastine, gélatine, collagènes II, IV, V, IX et X
Stromélysine-2	MMP-10	57 000 / 44 000	Identiques à ceux de la MMP-3
Stromélysine-3	MMP-11	51 000 / 44 000	Gélatine, fibronectine, protéoglycanes
Matrilysine	MMP-7	28 000 / 19 000	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène IV et protéoglycanes
Elastase macrophagique	MMP-12	54 000 / 22 000	Elastine, collagène IV, laminine, fibronectine
Métalloprotéinases membranaires			
MT1-MMP	MMP-14	66 000 / 54 000	Collagène I, II, III, gélatine, fibronectine, protéoglycanes, laminine, vitronectine, élastine
MT2-MMP	MMP-15	72 000 / 60 000	Fibronectine, laminine, ténascine, agrégécane
MT3-MMP	MMP-16	64 000 / 60 000	Collagène III, fibronectine, gélatine, caséine, protéoglycane
MT4-MMP	MMP-17	57 000 / 53 000	Gélatine
MT5-MMP	MMP-24	63 000	Pro-gélatinase A
Enamélysine	MMP-20	54 000 / 43 000	Amélogénine

L'étude de la structure primaire des MMPs a permis de mettre en évidence un certain nombre de domaines conservés (figure 13) : le prédomaine ou peptide signal, le prodomaine, le domaine catalytique et enfin le domaine C-terminal de type hémopexine. Le peptide signal est composé de 17 à 20 acides aminés, permettant de cibler la molécule pour sa sécrétion, ensuite clivé il est absent de l'enzyme latente. Le prodomaine est capable de maintenir le zymogène sous une forme latente de par la cystéine contenue dans sa séquence qui interagit avec l'atome de zinc présent dans le site actif. Le domaine catalytique contient une séquence consensus HEXXHXXGXXH, dont les trois résidus histidine sont nécessaires à la liaison du zinc et à l'activité protéolytique. Enfin le domaine C-terminal de type hémopexine semblerait impliqué dans la spécificité du substrat.

Ce dernier domaine et le domaine catalytique sont liés par une région charnière (figure 13). Les gélatinases possèdent une région supplémentaire composée de trois séquences peptidiques répétitives homologues des modules de type II de la fibronectine, conférant à celles-ci la capacité de se lier entre autre à la gélatine. Les MT-MMPs possèdent au niveau de leur extrémité C-terminale un domaine transmembranaire assurant leur ancrage dans la membrane plasmique des cellules [Murphy et al., 1999]. Par contre la matrilysine, quant à elle, ne possède ni de région charnière ni de domaine C-terminal de type hémopexine.

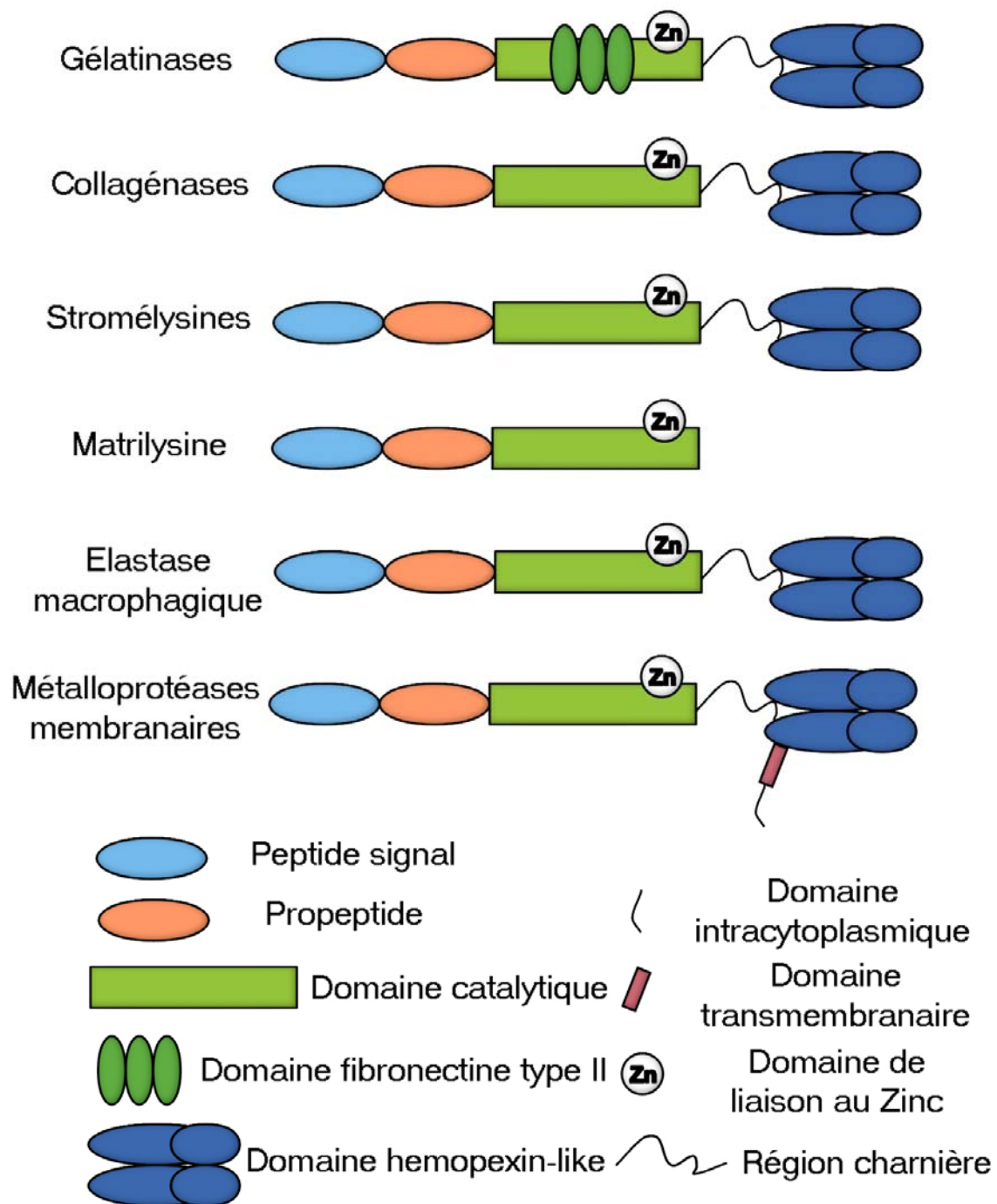


Figure 13 : Organisation structurale des différentes sous-familles de MMPs (d'après Robinet, 2003)

Les MMPs jouent un rôle important dans de nombreux événements physiologiques aussi bien au niveau cellulaire comme dans la migration et l'apoptose [Vu et al., 2000] que tissulaire dans la cicatrisation et le remodelage matriciel [Marucci et al., 2002].

Compte tenu du rôle important des MMPs dans le remodelage tissulaire et dans les processus cicatriciels, l'activité protéolytique de ces enzymes doit être rigoureusement régulée. Ce contrôle intervient à différents niveaux : sécrétion sous forme latente, processus d'activation et contrôle de leur activité par des inhibiteurs spécifiques. De plus, les facteurs de croissance, les cytokines et les composants de la matrice extracellulaire peuvent contrôler l'expression de ces enzymes à un niveau transcriptionnel (figure 14).

Au niveau transcriptionnel, les ARNm des MMPs présentent des demi-vies dans le compartiment intracellulaire de 12 à 150 heures [Overall et al., 1991]. Les facteurs de croissance et les cytokines agissant sur la transcription des gènes de MMPs présentent des effets stimulateurs (IL-1, TNF- α), inhibiteurs (TGF- β) ou variables (EGF, TGF- α , PDGF, bFGF). La stimulation ou la répression des gènes des MMPs par ces différents facteurs aboutit dans la plupart des cas à des changements de 20 à 50 fois des taux d'ARNm et de protéine.

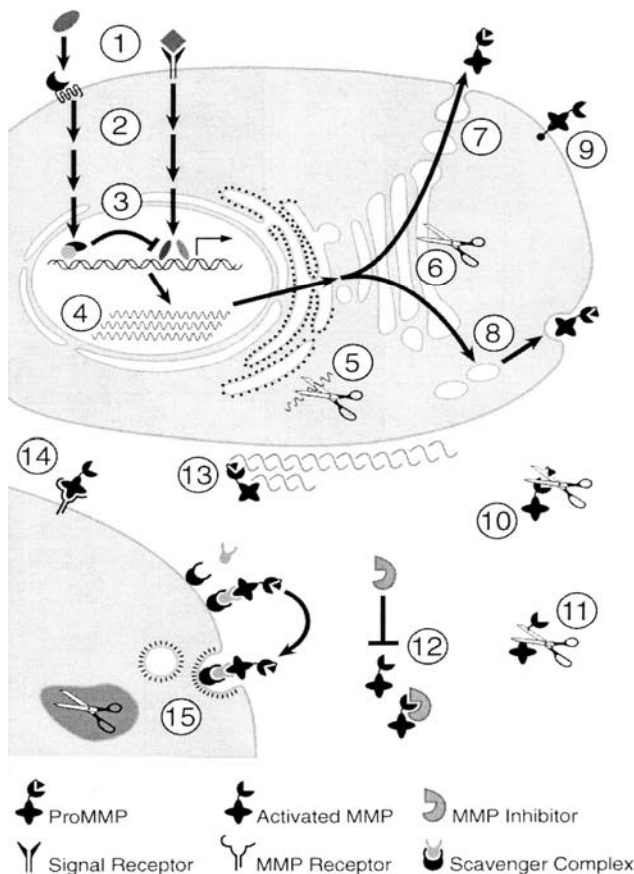


Figure 14. Régulation des MMPs (Vu et al., 2000).

1-signal d'induction ou de suppression, 2-transduction du signal, 3-activation ou répression transcriptionnelle, 4-post-transcription, 5-dégradation, 6-activation intracellulaire des MMPs furine, 7-sécrétion constitutive, 8-régulation de la sécrétion, 9-expression membranaire, 10-activation protéolytique, 11-processus protéolytique et inactivation, 12-inhibition protéique, 13-localisation au niveau de la matrice extra-cellulaire, 14-localisation membranaire, 15-endocytose et dégradation intracellulaire.

Afin d'éviter une dégradation non désirée des protéines matricielles, les MMPs sont synthétisées sous forme de zymogène. La protéolyse permettant l'activation de l'enzyme se produit soit dans un compartiment cellulaire, soit dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, quatre mécanismes d'activation ont été proposés : deux mécanismes d'activation extracellulaire par d'autres MMPs ou par d'autres protéinases n'appartenant pas à cette famille, l'activation de la MT1-MMP et de la MMP-11 par la furine et l'activation des MMPs par une ou des MT-MMPs associées à la membrane (figure 15).

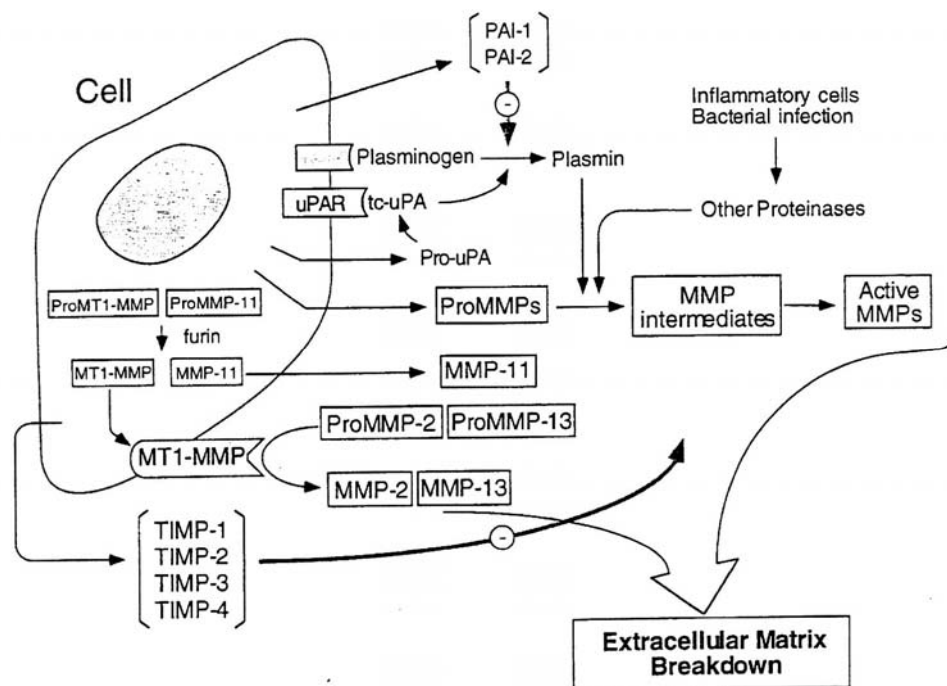


Figure 15: Voies d'activation des MMPs (Nagase, 1997)

Physiologiquement, l'activité protéolytique des MMPs est régulée par leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMPs. Les quatre membres de cette famille (TIMP-1 à -4) présentent des homologies de séquence allant de 41 à 52%. Le TIMP-1 est une protéine de 28 kDa qui forme un complexe non covalent 1 : 1 à haute affinité avec toutes les MMPs actives mais ce, de façon préférentielle avec les MMPs-1, -2 et -3. Il se lie également à la proMMP-9, ce qui bloque l'activation de l'enzyme par les stromélysines. Le TIMP-2 (22 kDa) quant à lui se complexe préférentiellement avec la MMP-2 [Shimokawa et al., 2003]. La régulation transcriptionnelle des TIMPs est indépendante de celle des MMPs. L'expression au niveau ARNm du TIMP-1 est induite par de nombreuses cytokines telles que le TGF- β 1 ou les IGF-I

et -II [Leonardi et al., 2003]. Le TIMP-3 comme le TIMP-1 est induit par l'EGF, le TGF- β et les esters de phorbol. La dexaméthasone inhibe le TIMP-1 induit par l'EGF ou les esters de phorbol mais stimule l'expression du TIMP-3. Ces TIMPs semblent également avoir d'autres fonctions, ils sont capables notamment d'exercer des activités anti-angiogéniques et anti-apoptotiques [Vincent et al., 2003 ; Lambert et al., 2004].

4- Les biomatériaux implantables en site osseux

4-1 Généralités

Les biomatériaux implantables en site osseux sont des matériaux de substitution des tissus osseux destinés à faciliter la réossification d'un défaut ne pouvant cicatriser sans apport extérieur.

Depuis de nombreuses années, des tentatives pour découvrir le substitut idéal du tissu osseux ont été menées dans le but de fabriquer des implants qui puissent remplacer la structure et la fonction du tissu osseux.

Ainsi dès les années 1960-70 une première génération de matériaux implantables a été développée en vue de son utilisation à l'intérieur du corps humain [Hench et Polak, 2002]. Dans un premier temps, certains de ces matériaux présentaient des effets néfastes pour l'organisme ce qui entraînait le rejet de l'implant. De ce fait, des matériaux bioinertes ont été développés. Ces matériaux n'induisaient aucune réaction sur les tissus environnants et ne subissaient aucune dégradation à l'intérieur de l'organisme. Ce sont principalement le titane et l'alumine, largement utilisés en chirurgie orthopédique et dentaire depuis l'apparition du concept d'ostéointégration [Albrektsson et al., 1986 ; Albrektsson et al., 2001].

Par la suite une seconde génération de matériaux bioactifs a été mise au point conférant des propriétés bioactives à ces matériaux bioinertes. Depuis le milieu des années 1980, ils ont connu un réel essor dans le domaine orthopédique ou en implantologie dentaire, il s'agit essentiellement de verres bioactifs et de céramiques de phosphate de calcium telles que l'hydroxyapatite synthétique [Yamamuro et al., 1990]. Des biomatériaux résorbables ont également été fabriqués en utilisant des polymères comme l'acide polylactique ou polyglycolique afin qu'ils soient progressivement remplacés par des tissus de régénération après implantation.

Le but de la recherche actuelle est de favoriser la régénération osseuse grâce à des systèmes induisant un contrôle, un guidage et une réparation rapide du système osseux après implantation, c'est pourquoi une troisième génération de biomatériaux appelés matériaux biomimétiques est en cours de développement. Ainsi par adjonction de systèmes accélérant le phénomène de réparation normale, les implants doivent induire une matrice interfaciale de composition et de structure caractéristiques de l'os. Ces évolutions doivent permettre non seulement une réparation plus rapide mais également une intégration plus stable de l'implant dans l'os réduisant le phénomène de rejet de l'implant.

Par conséquent, la modification des caractéristiques de surface des biomatériaux constitue une voie de recherche importante depuis ces dernières années. Plusieurs stratégies peuvent ainsi être mises en œuvre : elles sont de nature physico-chimique, morphologique ou biochimique [Ito et al., 1991]. L'énergie, la charge et la composition de la surface sont les principales caractéristiques physico-chimiques modifiées afin d'améliorer l'adhésion cellulaire à l'implant [Baier et Meyer, 1988]. Des modifications de la rugosité de surface ont également été utilisées afin de favoriser la réponse tissulaire à l'implant. Les modifications de surface par voie biochimique consistent en l'immobilisation de protéines, d'enzymes, de facteurs de croissance ou de peptides sur le biomatériau favorisant ainsi les interactions cellules osseuses/implant [Rezania et al., 1997 ; Shin et al., 2003].

4-2 Classification des matériaux implantables en site osseux

Les matériaux utilisés en implantologie orthopédique ou dentaire peuvent être classés en plusieurs familles [Loty et al., 1998] :

Matériaux biotolérés

Ils sont incorporés dans l'os mais une couche fibreuse s'intercale entre l'os et le matériau, ce sont principalement les alliages cobalt-chrome, le polyméthyl méthacrylate ou l'acier inoxydable.

Matériaux bioinertes

Ce sont des matériaux qui ne subissent aucune modification physico-chimique pendant de longues durées une fois implantés. Il s'agit principalement du titane, de la zirconie et de l'alumine.

Matériaux bioactifs

Matériaux à surfaces réactives

Les hydroxyapatites synthétiques sont des céramiques de phosphate de calcium pouvant se présenter sous forme dense ou poreuse. Lorsque ces matériaux sont au contact des fluides biologiques, il se produit une dissolution des cristaux d'hydroxyapatite puis une précipitation de microcristaux dont le résultat est la formation d'une couche d'apatite carbonatée proche du minéral osseux.

Les bioverres sont des matériaux vitreux dont la propriété essentielle est d'induire une liaison chimique avec l'os. Depuis 1971, Larry Hench a mis au point des verres silicatés dont le plus étudié est le Bioglass[®]45S5 qui possède les meilleures caractéristiques de liaison à l'os [Hench et al., 1971].

Matériaux résorbables

Les matériaux résorbables les plus couramment utilisés sont les phosphates tricalciques et certaines hydroxyapatites synthétiques [Daculsi, 1998 ; Daculsi et al., 1999]. Il est également possible d'élaborer des revêtements de phosphate de calcium déposés sur un matériau (le plus souvent un alliage de titane), ils seront biocompatibles et vont constituer une barrière entre le milieu extracellulaire et le métal de la prothèse ralentissant ainsi la diffusion d'ions métalliques vers l'organisme. La réalisation des revêtements phosphocalciques fait appel à diverses techniques, elles consistent généralement soit en des modifications de surface au cours desquelles la composition ou les propriétés mécaniques des surfaces existantes sont transformées soit en des dépôts de films minces ou de revêtement dans lesquels un matériau différent est déposé pour créer une nouvelle surface. Les différentes techniques comprennent la torche à plasma, l'électrodéposition, le dépôt physique ou chimique en phase vapeur.

Chaque technique a des avantages et des limitations qui doivent être soigneusement évaluées en fonction des applications spécifiques. Pour la réalisation de revêtements poreux et épais (plusieurs micromètres), la torche à plasma sous vide est la méthode la plus répandue. Cependant, pour réaliser des revêtements phosphocalciques plus minces, la méthode de l'électrodéposition à basse température est une alternative de choix et c'est d'ailleurs la technique développée au sein de notre laboratoire pour élaborer des revêtements phosphocalciques [Benhayoune et al., 2002 ; Hurteaux et al., 2005]

5- But du travail

Notre travail s'inscrit dans le champ très vaste de la recherche sur les biomatériaux et l'objectif à long terme du laboratoire est de proposer des matériaux fonctionnalisés qui une fois implantés en site osseux seront dotés de propriétés biologiques favorisant la régénération osseuse en agissant sur les ostéoblastes environnants. Dans ce sens, nous avons choisi d'étudier un lipopeptide activateur du TGF- β 1 (élaïdyl-KRFK) puisque ce facteur de croissance est présent de façon non négligeable dans la matrice osseuse et qu'il présente des effets stimulateurs sur les ostéoblastes notamment en ce qui concerne la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle. Dans un précédent travail [Hurteaux, 2003] un peptide (KRFK) a été incorporé dans un modèle de microcapsules d'alginate.

Par ailleurs, il a été précédemment montré dans un système de fibroblastes dermiques, que des composés bifonctionnels, comme, le peptide KFK activateur du TGF- β 1 latent couplé à un acide gras, l'acide élaïdique, étaient capables d'une part d'activer le TGF- β 1 latent et d'autre part d'inhiber l'activité de certaines MMPs comme la MMP-1 et la MMP-3 [Cauchard et al., 2004].

Pour notre part, nous avons choisi d'étudier les effets d'un lipopeptide, l'élaïdyl-KRFK, sur l'activation du TGF- β 1 latent dans deux systèmes de cellules osseuses humaines et d'en étudier les répercussions sur la physiologie de ces cellules. Nous avons plus particulièrement analysé l'effet du TGF- β 1 et du lipopeptide au niveau de l'expression des MMPs et des protéines marqueurs de la différenciation. Cependant, les effets du TGF- β 1 variant selon l'origine et le stade de différenciation osseuse, nous avons tout d'abord testé ses effets sur le comportement en culture de cellules osseuses humaines en culture primaire et sur une lignée d'ostéosarcome humain : la lignée MG-63.

Nous avons également évalué la biocompatibilité d'un revêtement phosphocalcique élaboré par la méthode de l'électrodéposition envers les cellules MG-63 dans le but de l'utiliser en tant que support du biomatériau fonctionnalisé. Ainsi, nous avons tout d'abord déterminé les caractéristiques physico-chimiques du revêtement phosphocalcique (morphologie, épaisseur) puis nous avons placé ce revêtement au contact de cellules de type ostéoblastique, les cellules MG-63, et nous avons évalué la cytotoxicité du revêtement, la prolifération cellulaire et l'influence du revêtement sur l'expression des gènes codant pour des protéines de la matrice osseuse.

II- MATERIELS ET METHODES

1- Matériels

1-1 Produits chimiques et réactifs

Acide sulfurique, MERCK

Agarose, INVITROGEN

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

AlexaFluor[®] 488, INTERCHIM

Amorces PCR, PROLIGO

Anticorps primaire anti-Collagène de type I, TEBU-BIO

Anticorps primaire anti-Fibronectine cellulaire, SIGMA

Anticorps primaire anti-Ostéocalcine, CALBIOCHEM

Anticorps primaire anti-Ostéopontine, CALBIOCHEM

Anticorps primaire anti-Sialoprotéine osseuse, CALBIOCHEM

Anticorps secondaire biotinylé, AMERSHAM

BSA 30 % (sérumalbumine bovine), SIGMA

Bleu trypan, SIGMA

Bromure d'éthidium (BET), INVITROGEN

Chloroforme, PROLABO

Collagénase de type II, INVITROGEN

DEPC (diéthylpyrocarbonate), SIGMA

DMEM, INVITROGEN

Glutaraldéhyde, AGAR SCIENTIFIC

HMDS (hexaméthylidisilane), SIGMA

Isopropanol, PROLABO

Kit ELISA MMP-1 RPN 2610, AMERSHAM

Kit ELISA MMP-2 RPN 2617, AMERSHAM

Kit ELISA MMP-3 RPN 2613, AMERSHAM

Kit ELISA Ostéopontine, VWR

Kit ELISA TGF- β 1 RPN 2774, AMERSHAM

Kit ELISA TIMP-1 RPN 2611, AMERSHAM

Kit ELISA TIMP-2 RPN 2618, AMERSHAM
Mileu de montage fluoromount, DAKO
Paraformaldéhyde, PROLABO
Pastilles d'or-palladium, JEOL
PBS, INVITROGEN
PSA (Pénicilline, Streptomycine, Antimycocine) (10000 U/ml ; 10000 µg/ml), INVITROGEN
PS (Pénicilline, Streptomycine), INVITROGEN
Ready load φx174, INVITROGEN
REVERSE TRANSCRIPTION SYSTEM, PROMEGA
SVF, INVITROGEN
Taq Polymerase, INVITROGEN
TBE 10X, INVITROGEN
Test MTS, PROMEGA
TGF-β1 humain recombinant, SIGMA
TGF-β1 latent recombinant, R&D SYSTEMS
Tris base, BIORAD
Triton X-100, BIORAD
Trypsine-EDTA, INVITROGEN
TRIzol[®], INVITROGEN

1-2 Matériels

Biophotomètre, EPPENDORF
Boîtes de culture 25 et 75 cm², NUNC
Centrifugeuse 5417R, EPPENDORF
Cuve à électrophorèse horizon 11.14, LIFE TECHNOLOGIES
Etuves, SANYO
Evaporateur cathodique ion sputter JFC-1100, JEOL
Filtres 0,22 µ, MILLIPORE
Poste de sécurité microbiologique, ESI FLUX France
Hotte à biologie moléculaire, AIRLAB
Lamelles de verre, VWR
Lamelles thermanox[®], VWR
Lecteur de microplaques, LABSYSTEMS

Mastercycler Gradient, EPPENDORF

Microscope électronique à balayage (MEB), JEOL 5400 LV

Microscope confocal MRC 1024, BIORAD

Microscope inversé, ZEISS

UVette[®], EPPENDORF

UV transilluminator, VWR

1-3 Lipopeptide élaïdyl-KRFK (Ea-KRFK)

Le lipopeptide Ea-KRFK a été synthétisé industriellement par NEOSYSTEM groupe SNPE.

Le fournisseur a fourni les caractéristiques de ce lipopeptide : son degré de pureté après HPLC est de 95 %, sa masse moléculaire est de 842,8 g/mol (masse moléculaire théorique : 842,2 g/mol), il se reconstitue dans l'eau distillée à 0,7 mg/ml.

Le lipopeptide est composé d'un acide gras, l'acide élaïdique et du peptide KRFK dont la séquence est présente dans la TSP-1, sa structure est représentée figure 16

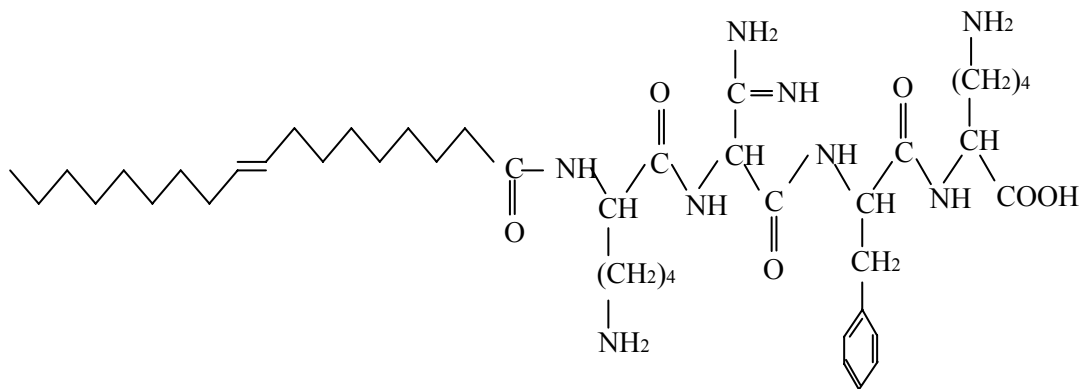


Figure 16 : Structure du lipopeptide Ea-KRFK

1-4 Elaboration d'un revêtement de phosphate de calcium par électrodéposition

Le principe de l'électrodéposition consiste à déposer grâce à une différence de potentiel un revêtement (phosphate de calcium) sur un substrat conducteur (alliage de titane Ti6Al4V).

Le protocole développé au sein de notre unité [Benhayoune et al., 2002] a été inspiré des travaux décrits en 1995 par Shirkhanzadeh [Shirkhanzadeh et Azadegan, 1998].

La réaction se déroule dans une cellule d'électrolyse (figure 17) dont le montage à 3 électrodes permet d'effectuer l'électrolyse en régime potentiostatique ou galvanostatique. La cellule est alimentée par un courant électrique ce qui permet le maintien d'une tension entre la cathode (substrat Ti6Al4V) et l'électrode de référence. La solution d'électrolytes est obtenue en mélangeant une solution de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ à la concentration de 0,042 M pour l'apport en calcium et une solution d'hydrogénophosphate $\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4)$ à la concentration de 0,125 M pour l'apport en phosphore. Le pH de cette solution d'électrolytes est de 4,4.

Le dépôt du revêtement a lieu pendant 20 min à 60°C avec une densité de courant de 5 mA/cm².

Une fois que les substrats en alliage de titane sont revêtus de phosphate de calcium, ils sont recuits à 200°C pendant 1 h afin de stabiliser le revêtement.

Les revêtements sont ensuite stérilisés pour permettre leur mise en culture.

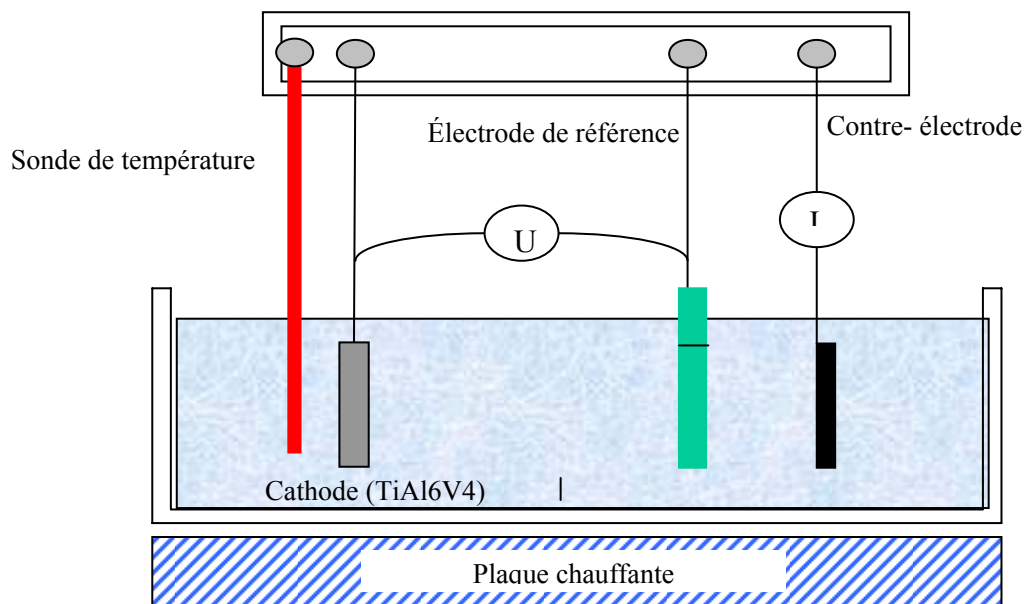


Figure 17 : Représentation schématique de la cellule d'électrolyse utilisée pour l'élaboration du revêtement phosphocalcique.

2- Méthodes

2-1 Culture Cellulaire

2-1-1 Culture primaire d'ostéoblastes humains

Les prélèvements osseux sont obtenus au cours de chirurgies orthopédiques pratiquées chez des patients consentants âgés de 60 à 75 ans (Service de chirurgie orthopédique et traumatologique, CHU de Reims) et transportés au laboratoire dans des flacons stériles contenant du milieu de transport : DMEM + antibiotique antimycotique (PSA) à 1%.

Les fragments osseux, débarrassés du tissu conjonctif, sont découpés en petits fragments de 2 à 3 mm³ puis placés dans une boîte de Pétri.

Ces petits fragments subissent ensuite deux rinçages dans un tampon phosphate (PBS) de 10 min chacun afin d'éliminer les hématies, la moelle osseuse ainsi que les adipocytes.

Puis, les explants sont soumis à une série de digestions enzymatiques : 1 bain de trypsine de 10 min à 37°C sous agitation suivi de 3 bains de collagénase (0,14 %) de 20 min à 34°C sous agitation.

Les fragments osseux sont récupérés et répartis dans des flacons de culture de 25 cm² puis 2 gouttes de milieu DMEM + 20% de Sérum de Veau Foetal (SVF) + PSA à 1% sont déposées sur chacun d'entre eux. Les flacons sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère humide de 5 % de CO₂.

Après 24 h, le surnageant est éliminé afin d'enlever les débris cellulaires et les cellules flottantes et il est remplacé par 5 ml de milieu frais (DMEM + 20 % de SVF + 1% de PSA). Le milieu est renouvelé tous les trois jours après un rinçage au PBS additionné de 1% de PSA. Au bout d'une semaine, la PSA est remplacée par un mélange d'antibiotiques : pénicilline-streptomycine (PS) à 0,5 %.

A confluence, en moyenne au bout de 4 semaines, un repiquage est effectué, les cellules sont détachées sous l'action de la trypsine-EDTA 1X (diluée à partir de trypsine-EDTA 10X dans du PBS). Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est rincé au PBS et la trypsine 1 X, préalablement chauffée à 37°C, est ajoutée (2ml par flacon de 25 cm², 5 ml par flacon de 75 cm²).

Après détachement des cellules, la suspension cellulaire est récupérée et centrifugée pendant 10 min à 2500 tpm.

Le culot est ensuite remis en suspension dans du DMEM + 10 % de SVF + 0,5 % de PS puis réparti dans des flacons de culture de 75 cm². Le volume est ensuite ajusté à 12 ml de volume de milieu total par flacon.

Le milieu est ensuite changé une fois par semaine jusqu'au prochain repiquage.

Les cellules sont utilisées pour les expérimentations entre le 3^{ème} et le 4^{ème} passage.

2-1-2 MG-63

La lignée cellulaire MG-63 dérive d'un ostéosarcome humain obtenu chez un garçon de 14 ans de type caucasien. Les cellules expriment la plupart des marqueurs phénotypiques des ostéoblastes tels que la PAL et l'OC. Sous l'action de la 1,25 (OH)₂Vitamine D₃ ces marqueurs sont stimulés. Par contre elles ne sont pas capables de minéraliser leur matrice en culture, donc ces cellules sont des "ostéoblastes-like" immatures.

La lignée cellulaire MG-63 (Référence ATCC : CRL 1427) est maintenue en culture dans des flacons de 75 cm² en présence de DMEM + 10% SVF + 0,5% PS. Le milieu est remplacé tous les trois jours et, à confluence, les cellules sont détachées par la trypsine, centrifugées et transférées dans de nouveaux flacons de culture de 75 cm² en présence de 10 ml de milieu précédemment décrit.

2-1-3 Culture en plaques de 24 et 6 puits dans le cadre de l'étude de l'effet du TGF-β1 sur les cellules osseuses humaines

Les cellules de type ostéoblastique issues de culture primaire sontensemencées à la densité de 35 000 cellules par puits sur plastique, sur lamelles de verre (immunohistochimie) ou sur lamelles de Thermanox[®] (microscopie électronique à balayage) dans du milieu DMEM + 2% de SVF + 0,5 % de PS. Les cellules MG-63 sont quant à ellesensemencées à la densité de 10 000 cellules par puits dans les mêmes conditions que les cellules de type ostéoblastique issues de culture primaire.

La moitié des puits sera traitée par du TGF-β1 à la concentration de 3 ng/ml.

L'étude sera poursuivie sur 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours pour les cellules de type ostéoblastique issues de culture primaire et sur 1, 4, 7, 14 et 21 jours pour les MG-63.

Afin de pouvoir effectuer la technique de RT-PCR, les différents types cellulaires sont ensemencés en plaque 6 puits à la densité de 500 000 cellules par puits pour les cellules de type ostéoblastique issues de culture primaire et 250 000 cellules par puits en ce qui concerne les cellules MG-63. L'étude en plaque 6 puits est menée exactement dans les mêmes conditions de temps et de traitement que pour l'étude en plaque 24 puits.

2-1-4 Culture en plaques de 24 et 6 puits dans le cadre de l'étude de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK

Les différents types de cellules osseuses humaines sont ensemencés dans des plaques de 24 puits à la densité de 100 000 cellules par puits dans du milieu DMEM + 2 % de SVF + 0,5 % de PS pendant 24h sur plastique, lamelles de verre ou lamelles de Thermanox[®] pour permettre aux cellules d'adhérer.

Après 24 h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du DMEM + 0,5 % de PS sans SVF pour limiter les apports exogènes de TGF- β 1 latent et actif. A ce milieu sont ajoutés les différents agents: TGF- β 1 (3 ng/ml), TGF- β 1 latent (3 ng/ml), élaïdyl-KRFK (5 μ M) pendant 24h.

L'étude a été menée en plaques 6 puits, pour la technique de RT-PCR, dans les mêmes conditions que l'étude en plaque de 24 puits excepté pour la densité cellulaire qui était de 500 000 cellules par puits.

2-1-5 Culture en plaques de 6 et 24 puits dans le cadre de l'étude de la biocompatibilité d'un revêtement de phosphate de calcium

Les plaques d'alliage de titane où le revêtement de phosphate de calcium est électrodéposé sont déposées au fond des puits des plaques de culture (24 et 6 puits). Les plaques de titane utilisées pour la mise en culture en plaque de 24 puits ont une surface de 1 cm². Le rapport de surface entre les plaques 6 puits et 24 puits est effectué et des plaques d'alliage de titane 4,75 fois plus grandes sont préparées.

Les cellules MG-63 sont déposées sur les revêtements à la densité de 10 000 cellules par puits en plaque de 24 puits (dans 0,5 ml de milieu DMEM + 10 % de SVF + 0,5 % de PS) et 47 500 cellules pour les plaques de 6 puits (dans 2 ml du milieu précédemment cité). Les cellules sont reprises dans quelques gouttes de milieu et déposées au centre du revêtement afin qu'elles adhèrent à la surface de celui-ci.

Après 1 heure d'incubation à 37°C sous une atmosphère humidifiée, le reste du milieu est ajouté dans les puits (1 ml pour les plaques 24 puits et 3 ml pour les plaques 6 puits).

Les plaques de culture sont incubées de nouveau à 37°C sous une atmosphère humide pendant 7, 14, 21 et 28 jours. Tous les 7 jours, la moitié du milieu est enlevée et remplacée par du milieu frais.

Les cellules MG-63 sont égalementensemencées, dans les mêmes conditions, dans les plaques de 24 et 6 puits sans revêtement (témoin) et sur des lamelles de thermanox[®] (témoin MEB).

2-2 Comptage cellulaire et test de viabilité

2-2-1 Comptage cellulaire

Une partie de la suspension cellulaire préalablement détachée grâce à l'action de la trypsine 1X à 37°C est déposée sur un hématocytomètre de Malassez, et les cellules sont ensuite comptées et rapportées à un nombre de cellules par puits.

2-2-2 Test d'exclusion au Bleu Trypan

Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à exclure le bleu trypan alors que les cellules mortes ne le peuvent pas. Ce test permet de différencier les cellules viables (incolores) et non viables (colorées) lors de la numération cellulaire.

Une partie de la suspension cellulaire est mélangée volume à volume à une solution de bleu trypan à 0,4 % (p/v) dans du sérum physiologique. Après homogénéisation, une partie de ce mélange est déposée sur un hématocytomètre de Malassez. Deux numérations différentes sont effectuées : l'une pour les cellules vivantes non colorées et une seconde pour les cellules

mortes qui apparaissent bleues. Le pourcentage de viabilité est déterminé en rapportant le nombre de cellules non colorées sur le nombre de cellules totales.

2-2-3 Test de viabilité au MTS (Méthyl Thiazol Sulfate)

Le test colorimétrique de viabilité au MTS est réalisé à l'aide du kit *Cell Titer 96[®] Aqueous Non-Radioactive Proliferation Assay* selon les instructions du fournisseur.

Son principe est basé sur la réduction du MTS dans les cellules en formazan, composé soluble dans le milieu de culture. Cette réduction est accomplie par les déshydrogénases des cellules métaboliquement actives (viables).

L'absorbance du formazan est mesurée à 490 nm dans un lecteur de microplaque 96 puits. La quantité de formazan produite, mesurée par la quantité d'absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules viables dans la culture.

Ce test est utilisé dans notre étude pour évaluer l'effet cytotoxique ou non du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition, comme il est très fastidieux d'élaborer des revêtements destinés à être incorporés dans des plaques 96 puits (taille des substrats d'alliage de titane très petite) nous avons choisi d'incuber les milieux de relargage avec le MTS.

Ainsi les cellules MG-63 sontensemencées à 1000 cellules par puits dans du milieu de culture (DMEM + 10 % de SVF + 0,5 % de PS) et incubées à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ pendant 24 h. Le milieu de culture est ensuite éliminé et remplacé par 100 µl du milieu de relargage des cellules en présence du revêtement provenant des temps 7, 14, 21 et 28 jours. Après 48 h de culture, 20 µl d'un mélange MTS/phénazine méthosulfate : PMS (2 ml / 100 µl) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées pendant 5 h à 37°C sous atmosphère à 5 % de CO₂.

Des cellules MG-63 incubées pendant 48 h avec du milieu de culture servent de témoins positifs à l'expérience de viabilité (100 % viabilité) et des cellules MG-63 incubées pendant 48 h avec du tampon de lyse composé de Tris/Triton servent de témoins négatifs (0 % de viabilité).

Après incubation avec le mélange MTS/PMS, l'absorbance est lue à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

2-3 Etude en microscopie électronique à balayage

Afin de pouvoir étudier la morphologie cellulaire, les cellules osseuses humaines sont cultivées sur lamelles de Thermanox[®]. Après l'étape de culture cellulaire, les surnageants sont éliminés et les lamelles sont rincées 2 fois pendant 5 min avec du PBS préalablement chauffé à 37°C. Puis les cellules se trouvant sur la lamelle de Thermanox[®] sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, les lamelles sont rincées pendant 5 min avec du PBS puis une seconde fois pendant 5 min avec de l'eau distillée.

Les échantillons subissent ensuite une déshydratation par des bains successifs d'alcool à 50°, 70° et 95° (10 min chacun) et enfin 2 bains de 10 min dans de l'alcool 100°. Puis les lamelles sont plongées pendant 10 min dans un bain d'un mélange d'hexaméthylidisilazane (HMDS)/alcool 100° (v/v) et enfin dans un bain d'HMDS pendant une nuit.

Les lamelles sont ensuite métallisées à l'or-palladium à l'aide d'un évaporateur cathodique puis observées au microscope électronique à balayage.

2-4 Etude de l'expression des gènes par RT-PCR

Les conditions expérimentales doivent protéger les ARNs de la dégradation par les ribonucléases (RNases) qui sont libérées par la lyse cellulaire et qui sont présentes en grande quantité dans l'environnement. Les étapes d'extraction et d'analyse des ARNs devront être effectuées en prenant soin d'une part, d'éliminer les RNases de la préparation initiale et d'autre part, de ne pas contaminer le matériel et les échantillons.

Pour ces raisons, toutes les manipulations de biologie moléculaire décrites ci-dessous ont été réalisées en portant des gants et en utilisant de l'eau traitée contre les ribonucléases par le diéthyl pyrocarbonate (DEPC) 0,1 % (v/v) pendant 18 h sous agitation et à température ambiante sous une sorbone (le DEPC est ensuite éliminé par autoclavage). L'eau DEPC est utilisée pour la préparation de toutes les solutions ainsi que pour le nettoyage du matériel.

2-4-1 Extraction des ARNs totaux

Pour extraire l'ARN des cellules osseuses, celles-ci sont cultivées en plaque 6 puits afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARN pour effectuer les expériences de RT-PCR.

Les ARNs totaux sont extraits en utilisant le réactif TRIzol[®], prêt à l'emploi.

Après une période déterminée de culture, le surnageant est éliminé et les cellules sont rincées au PBS.

Ensuite 1ml de TRIzol[®] par puits pour une plaque 6 puits est ajouté sur les cellules qui vont être lysées et le tout est transféré dans un tube Eppendorf. Le TRIzol contient de l'isothiocyanate de guanidium et du phénol qui permettent de dénaturer les acides nucléiques et de dissocier les protéines. Afin de séparer ARN, ADN et protéines, 200 µl de chloroforme sont ajoutés au TRIzol, le tout est agité et centrifugé à 12000 g pendant 15 min. Puis la phase supérieure chloroformée contenant les ARNs est prélevée et transférée dans un autre tube. La précipitation des ARNs totaux est obtenue par l'addition de 500 µl d'isopropanol. Le contenu du tube est ensuite homogénéisé et centrifugé à 12000 g pendant 10 min. L'isopropanol est éliminé et afin de rincer le culot d'ARN, 1 ml d'éthanol à 70 % est ajouté. Les ARNs sont de nouveau centrifugés à 7500 g pendant 5 min. L'éthanol est éliminé et le culot d'ARN est solubilisé dans de l'eau DEPC. Sa dissolution complète est obtenue après chauffage pendant 10 min à 70°C.

Avant d'effectuer l'étape de transcription inverse, il est nécessaire d'estimer la quantité d'ARN. Pour cela les ARNs sont dosés par spectrométrie en déterminant l'absorbance à 260 nm sachant qu'1 unité d'absorbance correspond à 40 µg/ml d'ARN.

2-4-2 RT-PCR semi-quantitative

La RT-PCR semi-quantitative permet de comparer les variations relatives d'expression de gènes en les comparant à celle d'un gène ubiquitaire dont l'expression est constante. Elle comporte deux étapes : une étape de transcription inverse (RT), permettant de synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARNs totaux, et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADNc.

Transcription inverse

Après dosage des ARNs totaux, 1 µg est rétro-transcrit en ADNc. Avant d'ajouter le mélange réactionnel nécessaire à la réaction de RT, les tubes contenant les ARNs sont placés pendant 10 min à 70°C dans un thermocycleur afin de dénaturer les structures secondaires. Après chauffage, on ajoute le mélange réactionnel contenant du MgCl₂ 25 mM, du tampon de reverse transcription, des dNTP, un inhibiteur de RNases (RNasin[®]), de l'enzyme reverse transcriptase AMV et des oligodT afin de ne rétro-transcrire que les ARNs messagers.

Composition du mélange réactionnel pour un tube :

- ✓ MgCl₂ 25 mM : 4 µl
- ✓ Tampon de retro-transcription : 2 µl
- ✓ dNTP : 2 µl
- ✓ RNasin[®] : 0,5 µl
- ✓ AMV : 0,75 µl
- ✓ oligodT : 1 µl

La transcription inverse a lieu dans un thermocycleur pendant 1 h à 42°C. Afin de dénaturer l'enzyme de rétro-transcription, le tube contenant le mélange est chauffé à 99°C pendant 5 min et réfrigéré à 4°C pendant 5 min également.

Réaction de polymérisation en chaîne

Après dilution au 6^{ème} dans de l'eau DEPC, 10 µl d'ADNc obtenus au cours de l'étape de RT sont utilisés pour la PCR.

On ajoute à ces ADNc des amorces spécifiques des gènes recherchés. Puis on ajoute un mélange réactionnel contenant du tampon de PCR, du MgCl₂ 50 mM, de l'eau DEPC, des dNTP et de l'enzyme Taq polymérase.

Composition du mélange réactionnel pour un tube :

- ✓ Tampon PCR : 5 µl
- ✓ MgCl₂ 50 mM : 3 µl
- ✓ Eau DEPC : 26,6 µl
- ✓ dNTP : 0,4 µl
- ✓ Taq polymérase : 0,25 µl

Ces ADNc vont subir une première étape de dénaturation (94°C, 1 min 30 sec) puis n cycles composés d'une première étape de dénaturation (94°C, 30 sec), d'une étape d'hybridation des amorces (température de fusion des amorces: T_m, 1 min) et d'une étape d'élongation (72°C, 1 min) et enfin une étape d'élongation finale (72°C, 10 min).

Les produits de PCR sont séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % (p/v) additionné de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant fluorescent sous lumière UV.

Tableau 3. Description des amorces utilisées :

Amorce		séquence (5'→3')	T _m	Nb de cycles	Taille du produit (pb)
COL I	sens	GGACACAATGGATTGCAAGG	69°C	30	293
	antisens	TAACCACTGCTCCACTCTGG			
OSP	sens	AGCCAGGACTCCATTGACTCGAAC	62°C	32	416
	antisens	GTTTCAGCACTCTGGTCATCCAGC			
PAL	sens	CCCAAAGGCTTCTTCTTG	61°C	30	375
	antisens	CTGGTAGTTGTTGTGAGC			
OC	sens	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	68°C	28	293
	antisens	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC			
GAPDH	sens	GCTGAGTACGTCGTGG	56°C	23	315
	antisens	CCACAGTTTCCCGGAG			
MMP-1	sens	CGACTCTAGAAACACAAGAGCAAGA	58°C	30	786
	antisens	AAGGTTAGCTTACTGTACACGCTTT			
MMP-2	sens	GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA	62°C	28	225
	antisens	AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGTT			
MMP-3	sens	GAACAATGGACAAAGGATACAACA	55°C	33	729
	antisens	TTCTTCAAAAACAGCATCAATCTT			
MMP-13	sens	GTGGTGTGGGAAGTATCATCA	51°C	30	330
	antisens	GCATCTGGAGTAACCGTATTG			
TIMP-1	sens	TCAGGCTATCTGGGACCGCAGGGA	68°C	27	627
	antisens	ACCATGGCCCCCTTTGAGCCCCCTG			
TIMP-2	sens	CGAGAAACTCCTGCTTGGGG	68°C	29	364
	antisens	CTCGGCAGTGTGTGGGGTC			

2-5 Etude immunohistochimique

La technique immunohistochimique utilisée est de type indirect, utilisant un anticorps secondaire lié à un marqueur de type streptavidine-biotine. La streptavidine présente une grande affinité pour la biotine et cette dernière peut se fixer aux molécules d'immunoglobulines. Les deux protéines peuvent se lier à des marqueurs de type fluorochrome ou enzyme.

Pour l'étude immunohistochimique, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques de 24 puits. Après la période de culture, le surnageant est éliminé, les lamelles sont rincées par deux bains de PBS à 37°C pendant 5 min.

Ensuite les cellules présentes sur la lame sont fixées au paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS additionné de triton 10X à 0,1 %. Puis les lamelles sont rincées 2 fois pendant 5 min au PBS. Afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques, une étape de saturation est effectuée par un bain de sérumalbumine bovine (BSA) 3 % dans du PBS pendant une nuit à 4°C.

Après une nuit de saturation, les lamelles sont rincées dans 4 bains de PBS de 5 min chacun. Ensuite l'anticorps primaire est ajouté sur les lamelles pendant 1 h. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS-BSA à 1 % à raison d'une dilution effectuée au 1/100^{ème} en ce qui concerne les anticorps anti-COL I, anti-BSP, anti-OPN et anti-OC et d'une dilution au 1/200^{ème} en ce qui concerne l'anticorps anti-FN.

Après 1 h d'incubation, les lamelles sont rincées 2 fois 5 min avec du PBS. Une seconde étape de saturation est effectuée par du PBS-BSA à 3 % pendant 30 min. Ensuite l'anticorps secondaire est ajouté sur les lamelles pendant 30 min, il est dilué dans du PBS-BSA à 1 % au 1/50^{ème}. Les lamelles sont ensuite rincées 2 fois au PBS pendant 5 min. Puis la streptavidine couplée au fluorochrome Alexa 488, diluée au 1/200^{ème} dans du PBS, est ajoutée pendant 30 min sur les lamelles de verre à l'obscurité. Puis elles sont rincées 2 fois pendant 5 min avec du PBS et 2 fois pendant 5 min avec de l'eau distillée. Ensuite les lamelles sont montées sur une lame avec du milieu de montage et lutées au vernis. Les lames sont ensuite observées au microscope confocal.

2-6 Dosage quantitatif de protéines par ELISA

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

Les kits ELISA utilisés proviennent de chez Amersham en ce qui concerne le dosage de la MMP-1, MMP-2, MMP-3, du TIMP-1, TIMP-2 et du TGF- β 1. Le kit ELISA spécifique de l'ostéopontine quant à lui provient de chez VWR.

Afin de pouvoir comparer la quantité de protéine recherchée dans chaque échantillon et chaque condition de traitement, les valeurs obtenues après comparaison avec la gamme étalon sont reporté à un même nombre de cellules (1.10^5 cellules).

2-7 Etudes statistiques

Les études statistiques ont été réalisées suivant le test de Student. Les valeurs moyennes sont déterminées et exprimées avec l'écart-type.

Les différences entre les valeurs des moyennes sont considérées comme statistiquement significatives quand $P < 0,05$.

* $P < 0,05$. ** $P < 0,005$. *** $P < 0,0005$.

III- RESULTATS

1- Effets du TGF- β 1 sur les cellules osseuses humaines en culture

1-1 Effet du TGF- β 1 sur la prolifération des cellules osseuses humaines

L'influence du TGF- β 1 sur la prolifération cellulaire est variable en fonction du type cellulaire, du stade de maturité des cellules et de la concentration en TGF- β 1 utilisée.

Ainsi, nous avons étudié l'effet du TGF- β 1 au cours du temps sur des cellules osseuses humaines en culture primaire et sur une lignée d'ostéosarcome humain, les cellules MG-63. La prolifération des cellules osseuses a été suivie pendant 28 jours dans le cas des ostéoblastes en culture primaire et 21 jours dans le cas de la lignée MG-63 en présence de sérum (2 %).

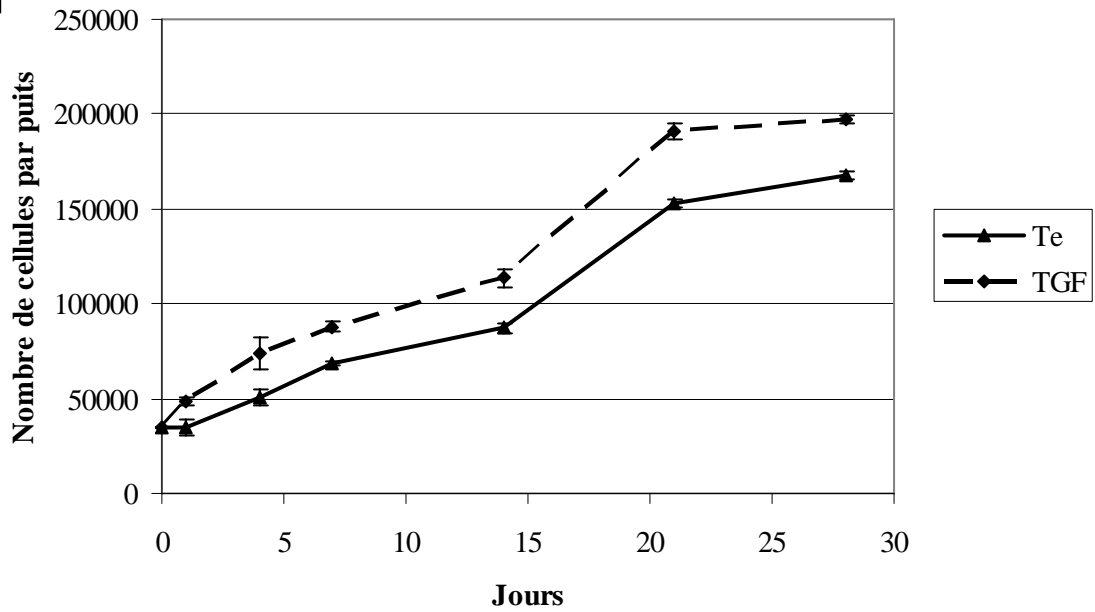
La prolifération cellulaire des ostéoblastes en culture primaire en l'absence de TGF- β 1 se produit en trois étapes : tout d'abord une phase de latence d'environ 24h suivie d'une phase de croissance cellulaire qui ralentit vers le 21^{ème} jour pour arriver à un plateau (figure 18 A). En l'absence de TGF- β 1 dans la culture, le temps de doublement des ostéoblastes est d'environ 7 jours.

En présence de TGF- β 1 à la concentration de 3 ng/ml, les trois phases observées précédemment sans TGF- β 1 sont retrouvées. Le TGF- β 1 a un effet stimulateur sur la prolifération des ostéoblastes en culture primaire, leur temps de doublement est alors d'environ 4 jours. Dès le premier jour le TGF- β 1 active la prolifération, et ce, jusqu'au 7^{ème} jour, puis l'effet stimulateur du TGF- β 1 diminue progressivement. Le plateau est également observé à partir du 21^{ème} jour.

En l'absence de TGF- β 1, la courbe de croissance de la lignée MG-63 suit le même profil que pour les ostéoblastes en culture primaire. Cependant, dans le cas des cellules MG-63 dérivant d'ostéosarcome, la prolifération est nettement plus rapide que pour les ostéoblastes normaux. En effet, le temps de doublement des cellules MG-63 est d'environ 30 heures.

En présence de TGF- β 1, la prolifération cellulaire suit le même profil, toutefois, le TGF- β 1 a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (figure 18 B).

A



B

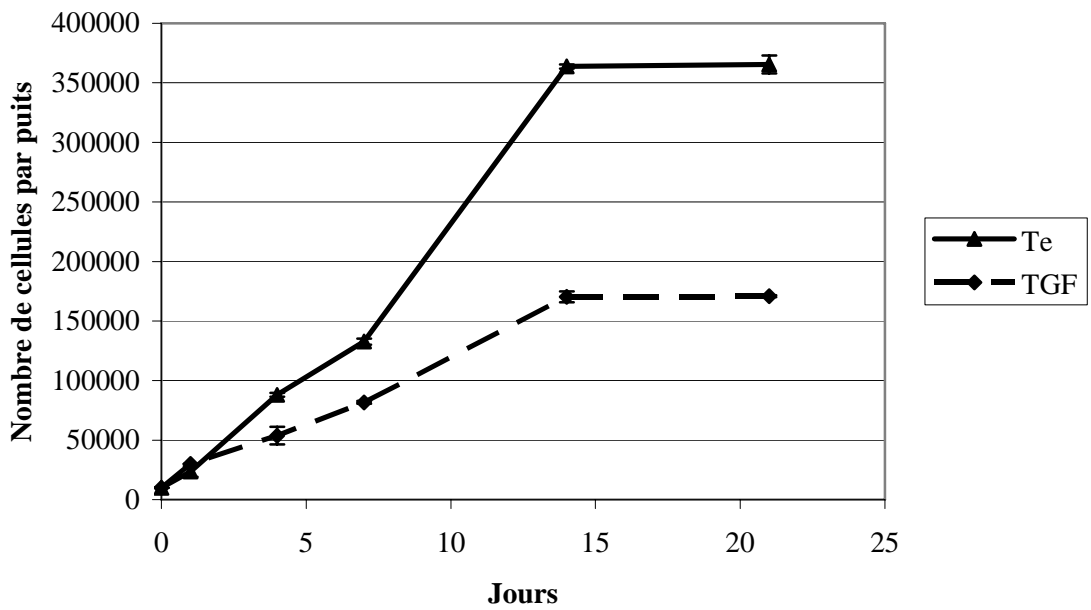


Figure 18 : Influence du TGF- β 1 sur la prolifération d'ostéoblastes humains en culture primaire et des cellules MG-63 au cours du temps. Les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) sontensemencés à 10 000 cellules par puits dans du milieu DMEM avec 2% de SVF en présence ou non de TGF- β 1 (3 ng/ml). Aux temps 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours de culture (A) et 1, 4, 7, 14 et 21 jours de culture (B) les cellules sont trypsinisées et comptées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences réalisées en duplicate \pm écart-type.

1-2 Effet du TGF- β 1 sur la morphologie de cellules osseuses humaines au cours du temps

Afin de pouvoir apprécier les effets du TGF- β 1 actif sur la morphologie des cellules osseuses humaines, nous avons réalisé des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) en présence ou non de TGF- β 1 et en fonction de la cinétique de prolifération précédemment décrite.

Ainsi, au bout de 24 h de culture en présence de TGF- β 1 à la concentration de 3 ng/ml la morphologie des ostéoblastes en culture primaire est similaire à la population cellulaire témoin (figures 19 A et B).

Dès le 4^{ème} jour de culture, la morphologie des cellules cultivées en présence de TGF- β 1 change, les cellules sont plus allongées et plus volumineuses qu'en l'absence de TGF- β 1 (non montré). Les cellules sont aussi plus nombreuses ce qui confirme les résultats de prolifération précédemment obtenus.

Au 7^{ème} jour de culture, les cellules cultivées en l'absence de TGF- β 1 (témoin) ne sont pas à confluence, elles sont étalées et présentent de nombreux contacts intercellulaires (figure 19 C). Par contre, en présence de TGF- β 1, la confluence est atteinte et il y a apparition d'une matrice extracellulaire (MEC) dans l'environnement cellulaire (figure 19 D).

Au bout de 14 jours de culture, les cellules témoins arrivent à confluence (figure 19 E), tandis qu'en présence de TGF- β 1, les cellules continuent à sécréter de la matrice qui est de plus en plus abondante et qui ne permet plus de distinguer la morphologie des cellules (figure 19 F).

En l'absence de TGF- β 1, les cellules ne sécrètent une MEC bien visible qu'au 21^{ème} jour (non montré). Par contre, la morphologie des cellules cultivées en présence de TGF- β 1 n'évolue pas entre le 14^{ème} et le 21^{ème} jour de culture (non montré).

Au bout de 28 jours de culture, les cellules témoins ont synthétisé une MEC qui toutefois n'empêche pas de distinguer la morphologie des cellules (figure 19 G). En présence de TGF- β 1, la MEC s'épaissit encore et forme un véritable réseau fibrillaire (figure 19 H).

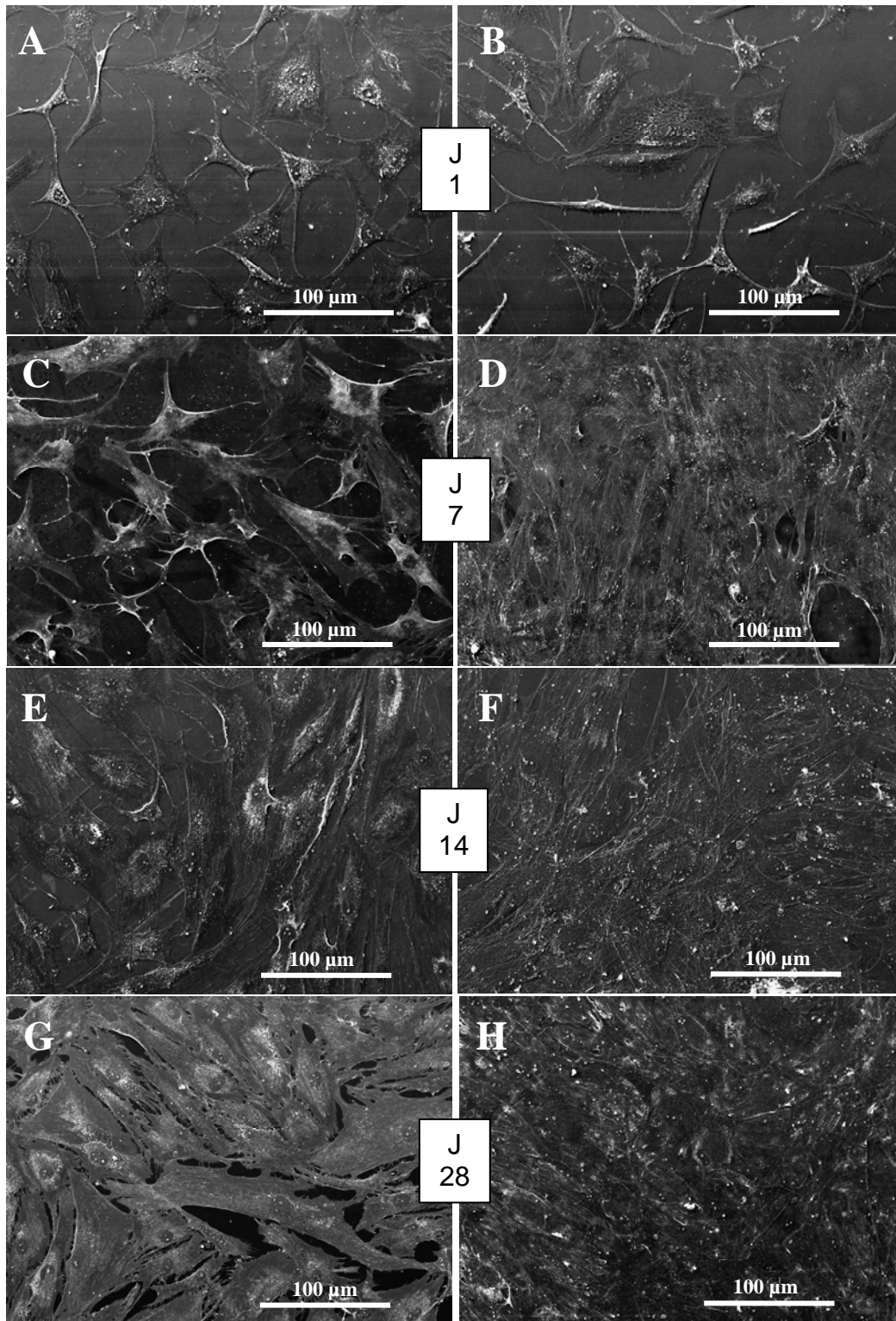


Figure 19 : Observation en MEB d'ostéoblastes humains en culture primaire cultivés en l'absence (A, C, E, G) ou en présence de TGF- β 1 (B, D, F, H) pendant 1, 7, 14 et 28 jours. J : jour. Grandissement : X 200.

Comme pour les ostéoblastes en culture primaire, au bout de 24h de culture les cellules MG-63 ne présentent pas de différence morphologique qu'elles soient traitées ou non par le TGF- β 1 (figure 20 A et B). Toutefois, en présence de TGF- β 1, les cellules MG-63 ont tendance à se regrouper et l'on peut distinguer de ce fait de nombreux contacts intercellulaires (figure 20 B).

Au 7^{ème} jour de culture les cellules MG-63 cultivées en absence de TGF- β 1 sont confluentes et se disposent en multicouche. Contrairement aux ostéoblastes en culture primaire, il n'y a pas de production de MEC (figure 20 C). Par contre, en présence de TGF- β 1 pendant 7 jours, les cellules MG-63 sont moins nombreuses et se regroupent entre elles de façon à former un réseau avec des mailles en forme de nid d'abeille.

Au 14^{ème} jour, les cellules MG-63 témoins se sont disposées en multicouche. Il devient alors impossible de distinguer le contour des cellules. En présence de TGF- β 1, les cellules se resserrent, élargissant les mailles qu'elles avaient commencé à former (figure 20 E et F).

Cependant, au 21^{ème} jour, les cultures témoins ou en présence de TGF- β 1 montrent des signes de souffrance du fait du nombre important de cellules : celles-ci s'aplatissent, rompent leurs liaisons intercellulaires et on note l'apparition de nombreux débris (non montré). En conséquence, il n'a pas été possible de poursuivre l'étude morphologique.

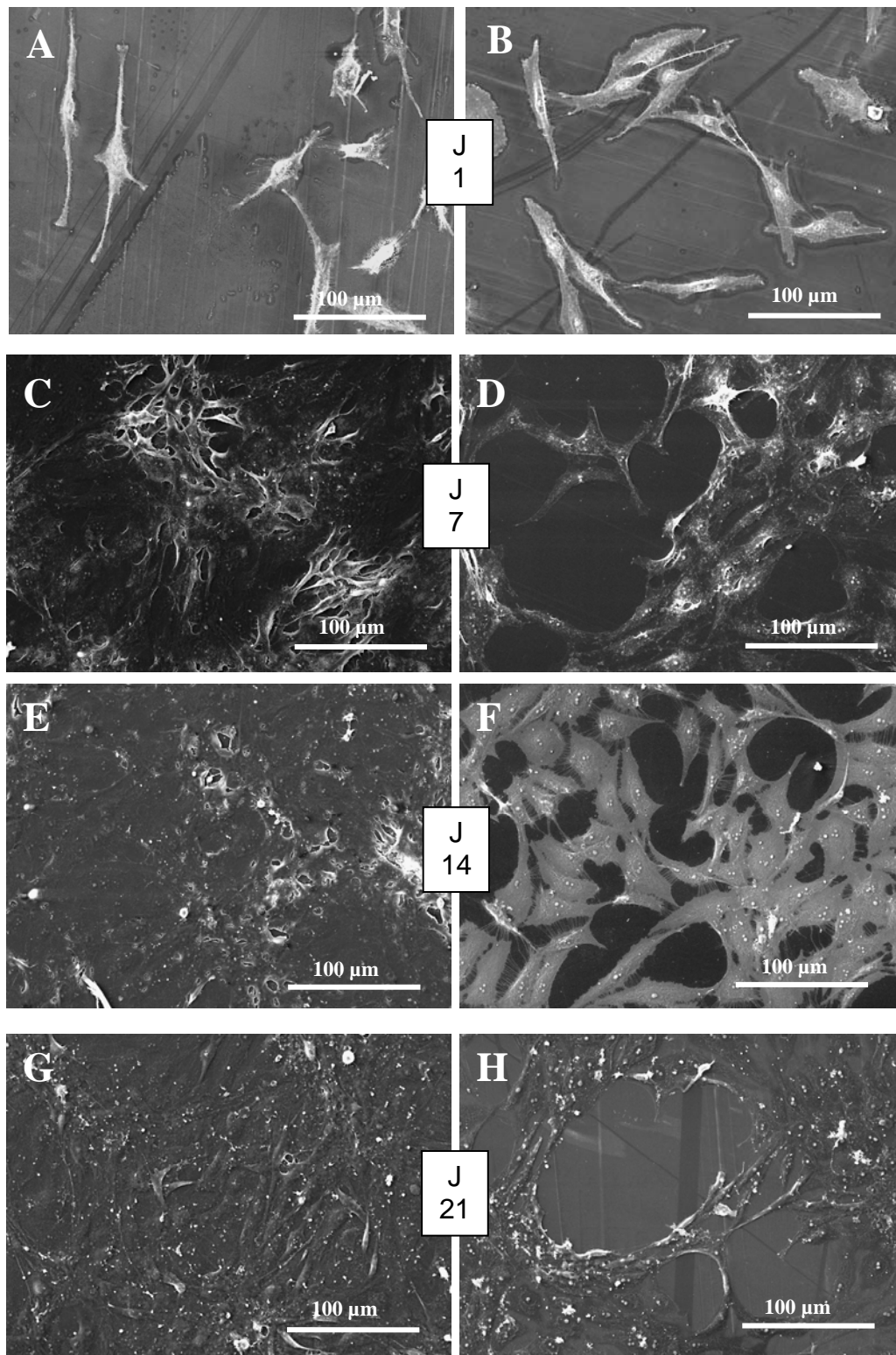


Figure 20 : Observation en MEB de cellules MG-63 cultivées en l'absence (A, C, E, G) ou en présence de TGF-β1 (B, D, F, H) pendant 1, 7, 14 et 28 jours. J : jour. Grandissement : X 200

1-3 Effet du TGF- β 1 sur l'expression de gènes de la matrice extracellulaire osseuse et de MMPs par les cellules osseuses humaines au cours du temps.

1-3-1 Gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire osseuse

L'effet du TGF- β 1 au cours du temps sur les ostéoblastes a déjà été montré. Cependant, ses effets sont variables en fonction de l'état de différenciation des cellules. Ainsi, nous avons voulu déterminer dans notre modèle d'ostéoblastes en culture primaire les effets du TGF- β 1 au cours du temps par la technique de RT-PCR. Nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes des protéines spécifiques de la MEC osseuse. L'étude cinétique a été suivie de 1 à 28 jours.

L'expression du gène du COL I ne varie pas au cours du temps dans des conditions témoins. Lorsque les cellules sont cultivées en présence de TGF- β 1 l'expression du gène du COL I demeure inchangée (figure 21).

L'expression du gène de l'OPN quant à lui varie en fonction du temps. Ainsi, son expression augmente du 1^{er} au 4^{ème} jour de culture puis diminue jusqu'au 14^{ème} jour et augmente de nouveau au 21^{ème} jour pour se maintenir jusqu'au 28^{ème} jour. Lorsque les cellules sont traitées par le TGF- β 1, le profil d'expression du gène OPN reste le même. Toutefois, le niveau d'expression du gène de l'OPN est augmenté en présence de TGF- β 1 pour chaque temps de la cinétique (figure 21).

Dans des conditions normales de culture, l'expression du gène de la PAL augmente du 1^{er} au 4^{ème} jour de culture puis diminue jusqu'à ne plus être détecté au 14^{ème} jour et augmente à nouveau à partir du 21^{ème} jour. Par contre, le TGF- β 1 a un effet biphasique sur les ostéoblastes en culture primaire au cours du temps. En effet, le TGF- β 1 augmente l'expression du gène de la PAL au 1^{er} jour, le diminue au 4^{ème} pour l'augmenter à nouveau au 7^{ème} jour. Par contre, lorsque les cellules avancent dans le stade de différenciation (temps de culture longs), le TGF- β 1 a un effet inhibiteur sur l'expression du gène de la PAL (figure 21).

Le gène de l'OC n'est détecté dans la culture témoin qu'à partir du 14^{ème} jour. L'expression de ce gène atteint son maximum au 21^{ème} jour pour diminuer au 28^{ème} jour. Le TGF-β1 a un effet inhibiteur sur l'expression du gène OC (figure 21).

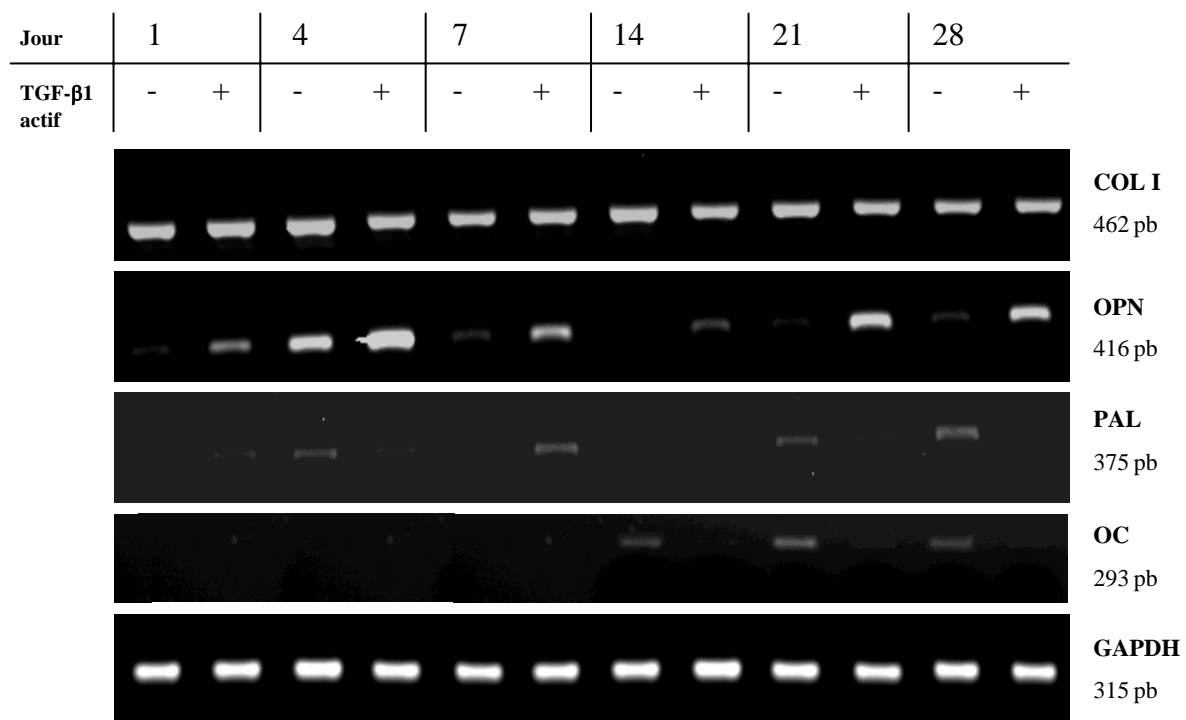


Figure 21 : Etude de l'expression de gènes codant des protéines de la MEC osseuse en fonction du temps dans les ostéoblastes en culture primaire. Les cellules ont été mises en culture en présence ou non de TGF-β1 (3ng/ml) durant une période de 1 à 28 jours. Aux temps 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours les ARNs ont été extraits et l'expression des gènes a été analysée par RT-PCR. COL I = collagène de type I ; OPN = ostéopontine ; PAL = phosphatase alcaline ; OC = ostéocalcine ; GAPDH = glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase = gène de référence ; pb= paire de bases.

1-3-2 Gènes codant les métalloprotéinases matricielles (MMPs-1, -2, -3 et -13) et leurs inhibiteurs (TIMPs-1 et -2)

Les MMPs et les TIMPs sont impliqués dans le remodelage osseux dans la mesure où la dégradation de la MEC osseuse est contrôlée par la balance entre les taux de MMPs et de TIMPs.

L'étude a été menée dans les mêmes conditions que pour l'étude des gènes codant des protéines de la MEC osseuse.

Dans des conditions de culture témoins, l'expression du gène de la MMP-1 diminue du 1^{er} au 4^{ème} jour de culture. Son niveau d'expression remonte au 7^{ème} jour pour diminuer de nouveau au 14^{ème} jour puis remonte jusqu'au 28^{ème} jour (figure 22). En revanche la présence de TGF- β 1 dans le milieu de culture augmente tout d'abord le niveau d'expression du gène de la MMP-1 le 1^{er} jour puis le diminue ensuite au 4^{ème} jour de culture. Au 7^{ème} jour de culture, le niveau d'expression du gène de la MMP-1 augmente par rapport au 4^{ème} jour mais on ne distingue pas de différence entre le niveau d'expression du gène lorsque le TGF- β 1 est présent ou non dans la culture. Ensuite, l'expression du gène de la MMP-1 diminue du 14^{ème} au 28^{ème} jour. Toutefois au 14^{ème} jour le niveau d'expression du gène de la MMP-1 en présence de TGF- β 1 est plus élevé que dans le témoin (figure 22).

Les cultures témoins montrent un niveau d'expression du gène de la MMP-2 qui augmente jusqu'au 7^{ème} jour puis reste constant jusqu'au 14^{ème} jour et augmente à nouveau au 21^{ème} jour et diminue ensuite au 28^{ème} jour (figure 22). En présence de TGF- β 1, le niveau d'expression du gène de la MMP-2 est similaire au 1^{er} jour aux cultures témoins. Ensuite le niveau d'expression de ce gène augmente du 4^{ème} au 7^{ème} jour et diminue au 14^{ème} jour et augmente à nouveau du 21^{ème} au 28^{ème} jour sans toutefois dépasser le niveau d'expression obtenu dans les conditions basales de culture (figure 22).

Dans les conditions de culture témoins, le niveau d'expression du gène de la MMP-3 diminue progressivement du 1^{er} au 7^{ème} jour et augmente à nouveau du 14^{ème} au 28^{ème} jour. En présence de TGF- β 1, le niveau d'expression du gène est augmenté par rapport au témoin, le 1^{er} jour. Ensuite, le niveau d'expression du gène en présence de TGF- β 1 diminue jusqu'au

7^{ème} jour pour remonter et dépasser le niveau exprimé dans les conditions de culture témoins au 14^{ème} jour et diminuer à nouveau au 21^{ème} jour et rester constant jusqu'au 28^{ème} jour (figure 22).

L'expression du gène de la MMP-13 augmente du 1^{er} au 7^{ème} jour et reste constante ensuite jusqu'au 28^{ème} jour dans les cultures témoins. En présence de TGF- β 1, le niveau d'expression du gène est constant du 1^{er} au 4^{ème} jour puis celui-ci diminue au 7^{ème} jour pour augmenter à nouveau au 14^{ème} jour et diminuer encore dès le 21^{ème} jour (figure 22).

L'expression du gène codant un inhibiteurs tissulaires des MMPs, le TIMP-2, n'est pas affectée au cours du temps en l'absence ou en présence de TGF- β 1. L'expression du gène du TIMP-1 diminue progressivement du 1^{er} au 14^{ème} jour pour remonter aux 21^{ème} et 28^{ème} jour que ce soit en présence ou en absence de TGF- β 1 (figure 22).

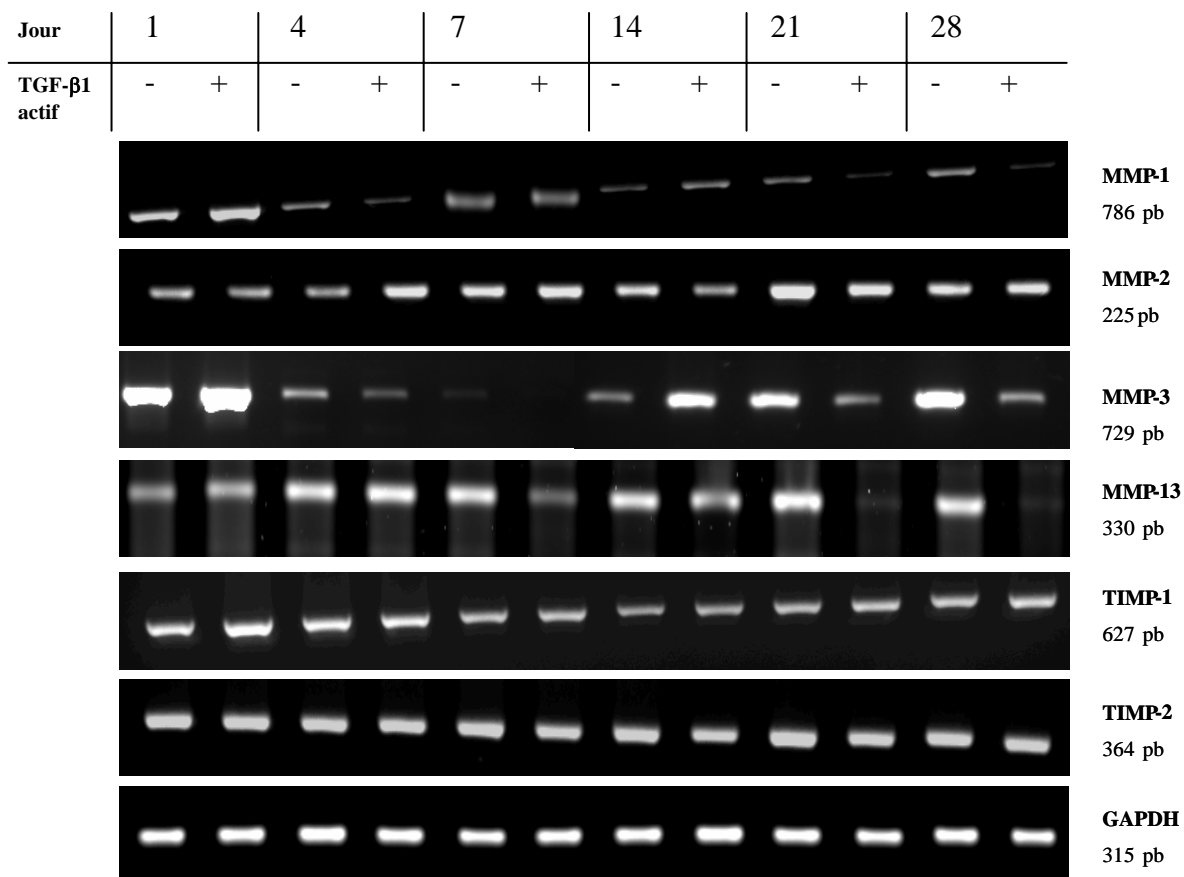


Figure 22 : Etude de l'expression de gènes codant les MMPs-1, -2, -3 et -13 et leurs inhibiteurs en fonction du temps et de la présence du TGF- β 1 dans des cultures primaires d'ostéoblastes. Les cellules ont été mises en culture en présence ou non de TGF- β 1 (3ng/ml) pendant 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours. A ces temps, les ARN ont été extraits et l'expression des gènes analysée par RT-PCR. GAPDH = glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase = gène de référence ; pb = paires de bases

1-4 Effet du TGF- β 1 sur la synthèse protéique de cellules osseuses humaines en fonction de la cinétique de prolifération par immunohistochimie

Afin d'identifier les molécules synthétisées par les ostéoblastes en culture primaire sensibles au traitement par le TGF- β 1, un marquage immunohistochimique des protéines associées à la couche cellulaire a été réalisé aux différents points de la cinétique de prolifération précédemment décrite. Seuls les temps caractéristiques du marquage de la protéine recherchée sont illustrés.

1-4-1 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse de fibronectine par les ostéoblastes en culture primaire

Après 24 h de culture en présence de TGF- β 1, l'immunodétection de la fibronectine dans les ostéoblastes en culture primaire apparaît ponctiforme dans le cytoplasme (figure 23). L'intensité du marquage semble être similaire au témoin.

Lorsque les ostéoblastes sont cultivés sur des temps plus longs, sans TGF- β 1, le marquage devient fibrillaire au niveau d'une très fine matrice extracellulaire dès le 7^{ème} jour et n'évolue pas par la suite (figure 23).

Par contre, en présence de TGF- β 1, le marquage de la fibronectine devient également fibrillaire et se situe dans le milieu extracellulaire au niveau de la matrice qui apparaît plus développée en présence de TGF- β 1 (figure 23). Ainsi dès 7 jours de culture en présence de TGF- β 1, non seulement la densité cellulaire est augmentée, ce qui est en parfaite corrélation avec les résultats obtenus lors de l'étude de prolifération cellulaire, mais l'intensité du marquage fibrillaire est nettement supérieure à celle observée dans la population témoin (figure 23). A 7 jours de culture en présence de TGF- β 1 les cellules sont encore visibles sous les fibres de fibronectine. L'apparition des fibres de fibronectine au niveau de la MEC est en accord avec les observations effectuées en MEB où la matrice apparaît au 7^{ème} jour.

Au fur et à mesure que les cellules sont cultivées en présence de TGF- β 1, la matrice s'épaissit jusqu'à ce qu'on ne puisse plus distinguer les cellules (dès le 14^{ème} jour de culture). Toutefois le marquage reste fibrillaire et n'évolue plus jusqu'au terme de la période de culture au 28^{ème} jour (figure 23).

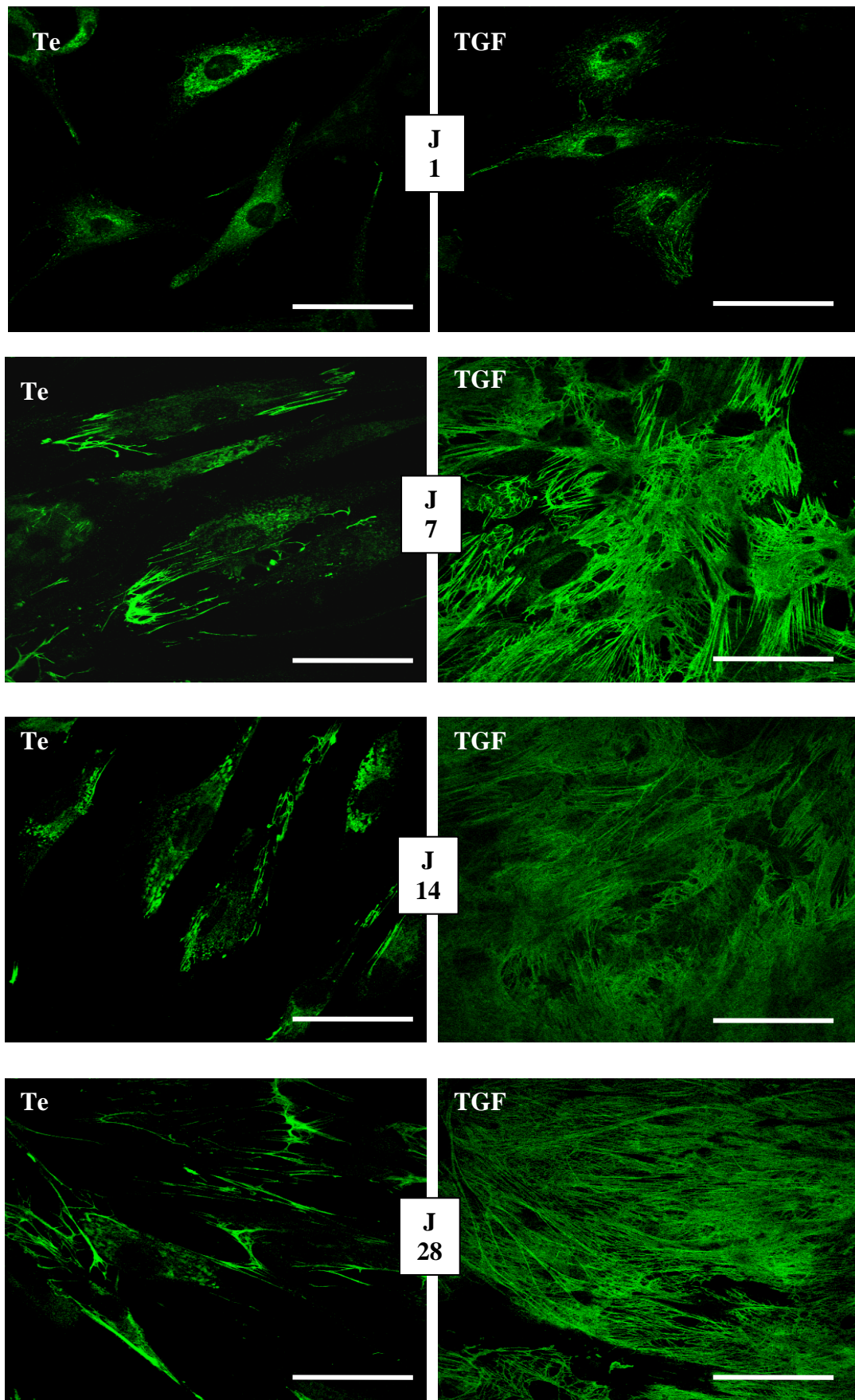


Figure 23 : Etude immunohistochimique de la synthèse de fibronectine en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes issus de culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture. J : jour ; Te : culture en l'absence de TGF- β 1 ; TGF : culture en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). La barre blanche représente 50 μ m.

1-4-2 Effet du TGF- β 1 en fonction du temps sur la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes en culture primaire

Après 24 h de culture dans des conditions témoin, l'immunomarquage du COL I apparaît à l'intérieur des cellules à la périphérie du noyau. En présence de TGF- β 1, la localisation du marquage paraît identique aux cellules témoins ; toutefois, son intensité semble plus marquée (figure 24).

Au fur et à mesure de l'avancement de la cinétique, dans des conditions de culture témoin, le marquage du COL I est situé à l'intérieur de la cellule mais celui-ci s'étend à tout le compartiment cellulaire. Au terme de la culture, le marquage du COL I est devenu ponctiforme et migre vers les prolongements cellulaires (figure 24).

Contrairement aux conditions de culture témoin, en présence de TGF- β 1, le marquage du COL I apparaît de plus en plus intense en fonction du temps et à partir du 21^{ème} jour, le marquage se situe à l'extérieur des cellules au niveau matriciel (figure 24).

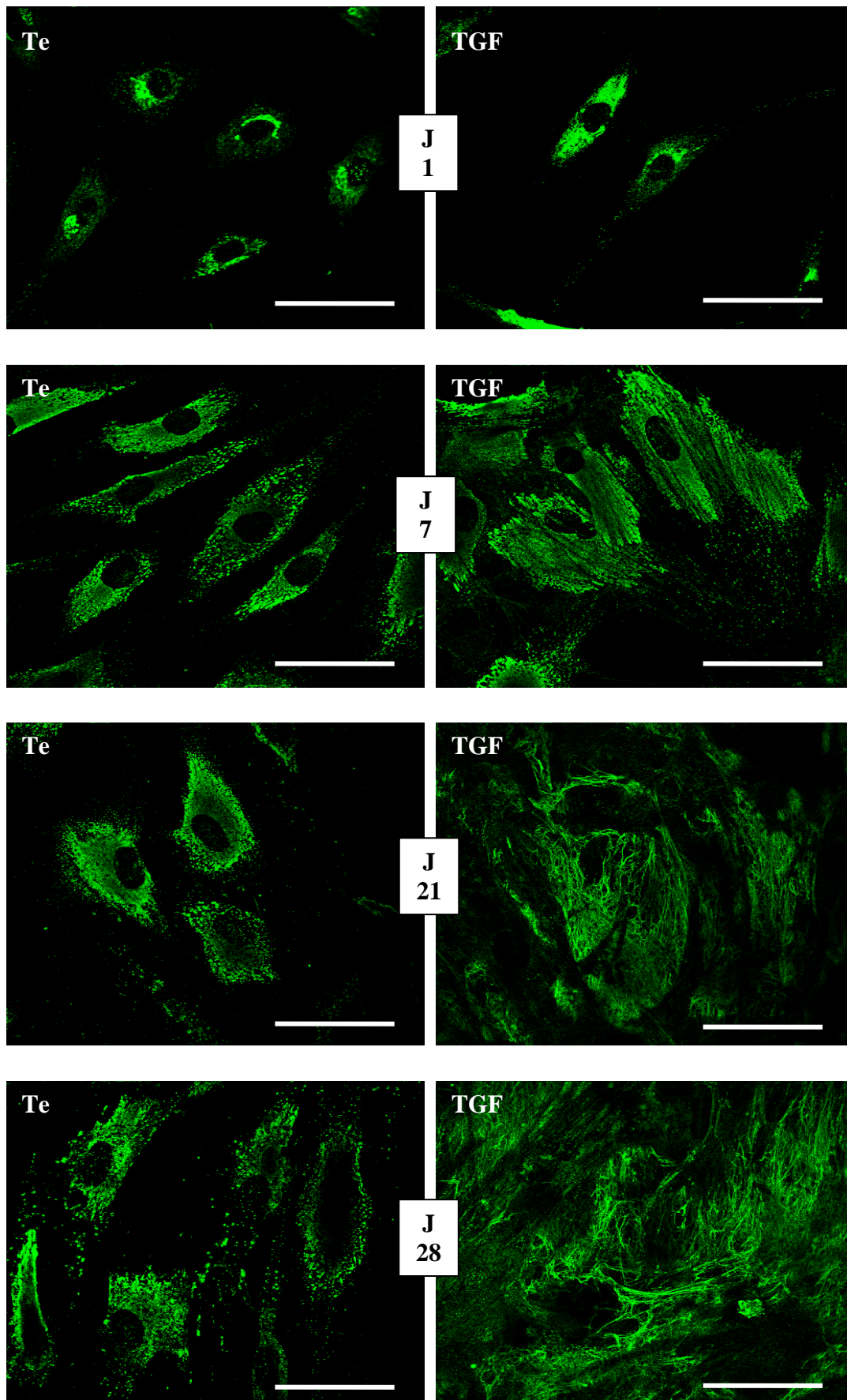


Figure 24 : Etude immunohistochimique de la synthèse de COL I, en présence ou non de TGF- β 1, par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 21 et 28 jours de culture. J : jour ; Te : culture sans TGF- β 1 ; TGF : culture avec TGF- β 1 (3ng/ml). La barre blanche représente 50 μ m.

1-4-3 Effet du TGF- β 1 en fonction du temps sur la synthèse de sialoprotéine osseuse par les ostéoblastes en culture primaire

Dans des conditions de culture témoins, l'immunomarquage de la BSP apparaît à l'intérieur des cellules sous forme fibrillaire à chaque temps de la cinétique. Toutefois le marquage devient de plus en plus fibrillaire et de plus en plus intense en fonction du temps (figure 25).

En présence de TGF- β 1 dans la culture, le marquage de la BSP évolue en fonction du temps tant au niveau de sa localisation qu'au niveau de son intensité. Ainsi au 1^{er} jour de la cinétique, la localisation du marquage de la BSP est semblable au témoin mais son intensité semble plus marquée. Ensuite au 7^{ème} jour de culture, le marquage n'apparaît plus sous forme fibrillaire mais il remplit tout l'espace intracellulaire (figure 25). Puis au 21^{ème} jour, le marquage fibrillaire devient plus marqué que dans les conditions de culture témoins (figure 25). Enfin au 28^{ème} jour, on remarque un changement d'orientation des cellules qui semblent s'orienter de façon parallèle entre elles. Le marquage de la BSP remplit à nouveau l'espace intracellulaire et n'est plus fibrillaire (figure 25).

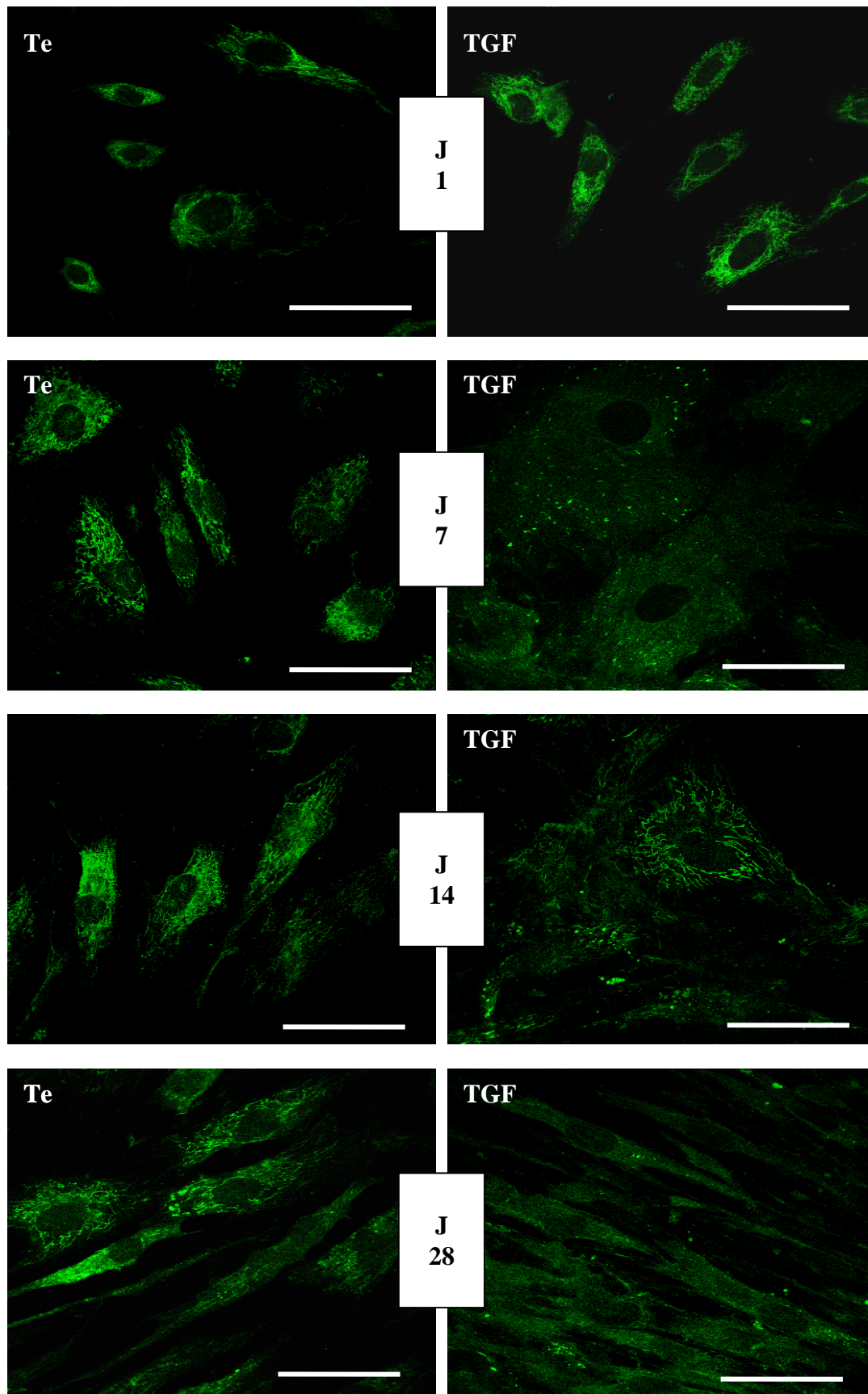


Figure 25 : Etude immunohistochimique de la synthèse de BSP en présence ou non de TGF- β 1 par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture. J : jour ; Te : culture sans TGF- β 1; TGF : culture avec TGF- β 1 (3ng/ml). La barre blanche représente 50 μ m.

1-4-4 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse d'ostéopontine par les ostéoblastes en culture primaire

Le marquage de l'OPN dans les conditions de culture témoins évolue en fonction du temps. En effet, au 1^{er} jour de la culture, il remplit l'espace intracellulaire et devient ponctiforme au niveau des prolongements cellulaires. Puis, plus la cinétique de prolifération des cellules avance, plus le marquage devient fibrillaire à l'intérieur des cellules (du 7^{ème} au 14^{ème} jour). Au terme de la cinétique, le marquage se retrouve au niveau des prolongements cytoplasmiques (figure 26).

En présence de TGF- β 1 dans la culture, tout comme dans les conditions de culture témoins, le marquage de l'OPN évolue en fonction du temps. Cependant, ce marquage ne présente pas le même aspect que dans le témoin. En effet, au 1^{er} jour, le marquage de l'OPN est localisé dans le cytoplasme péri-nucléaire comme dans le témoin ; le témoin toutefois son intensité semble moins prononcée. Puis au 7^{ème} jour de culture en présence de TGF- β 1, le marquage de l'OPN est plus intense et se retrouve dans le compartiment intracellulaire et particulièrement au niveau des prolongements cytoplasmiques. Enfin au terme de la période de culture, le marquage apparaît plus ponctiforme et se situe au niveau matriciel (figure 26).

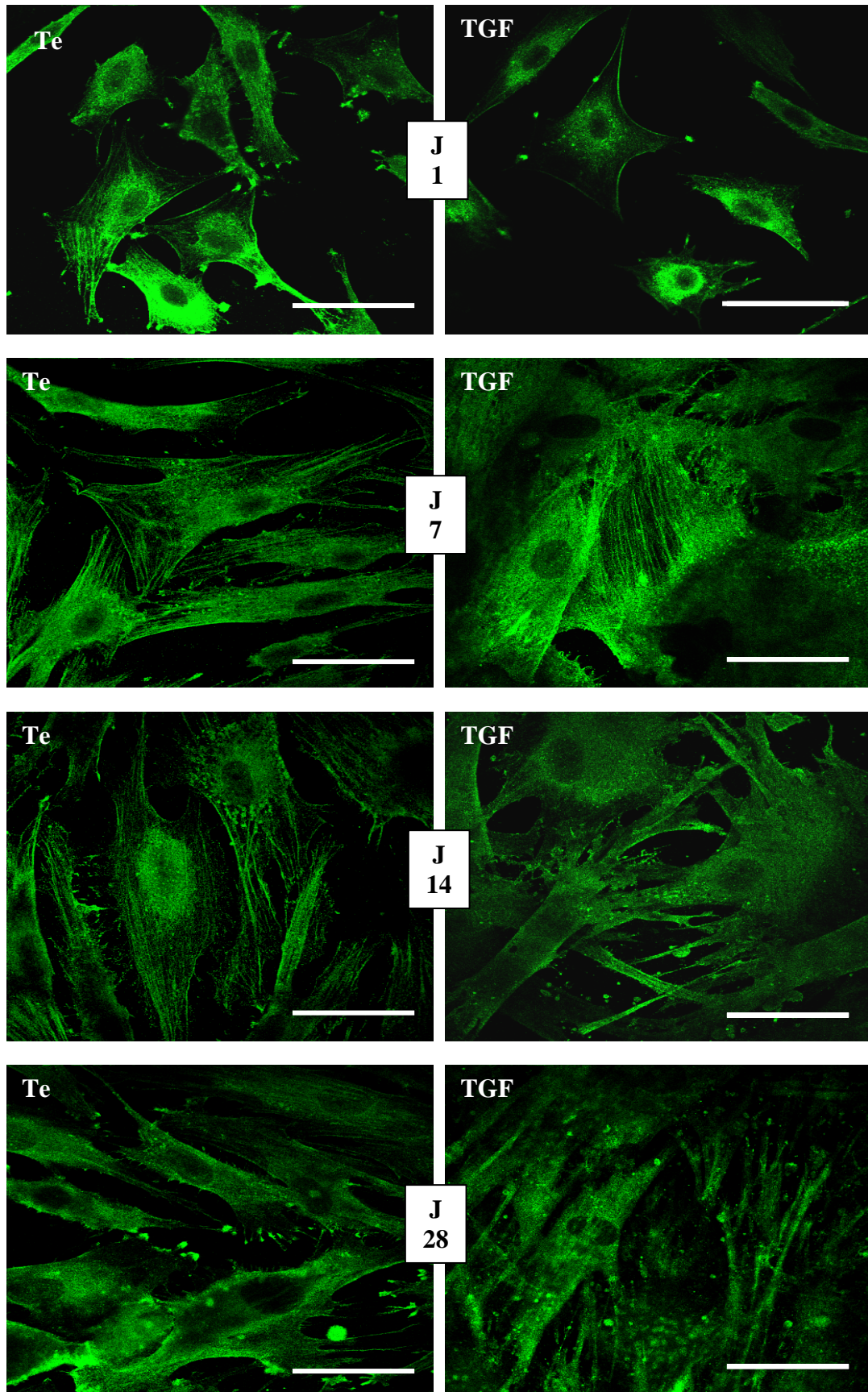


Figure 26 : Etude immunohistochimique de la synthèse d'ostéopontine, en présence ou non de TGF- β 1, par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture. J : jour ; Te : culture sans TGF- β 1 ; TGF : culture avec TGF- β 1 (3ng/ml). La barre blanche représente 50 μ m.

1-4-5 Effet du TGF- β 1 au cours du temps sur la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes en culture primaire

Au début de la cinétique de prolifération, dans la population témoin, le marquage de l'OC est localisé dans le cytoplasme des cellules autour du noyau et au niveau des prolongements cytoplasmiques (figure 27). Puis au fur et à mesure de l'avancement dans la cinétique, le marquage devient fibrillaire mais il reste localisé à l'intérieur du corps cellulaire. Au terme de la cinétique (28^{ème} jour), l'aspect du marquage change, celui-ci apparaît sous forme de "paquets" au niveau des prolongements cytoplasmiques. On ne note pas la présence de matrice extracellulaire dans ces conditions.

En présence de TGF- β 1, le marquage de l'OC apparaît au 7^{ème} jour sous forme fibrillaire au niveau des nombreux prolongements cytoplasmiques et diffus dans le cytoplasme. Puis au 14^{ème} jour de culture en présence de TGF- β 1, le marquage apparaît toujours sous forme fibrillaire mais cette fois il se situe au niveau de la matrice extracellulaire et ne semble pas évoluer jusqu'à la fin de l'étude cinétique (figure 27).

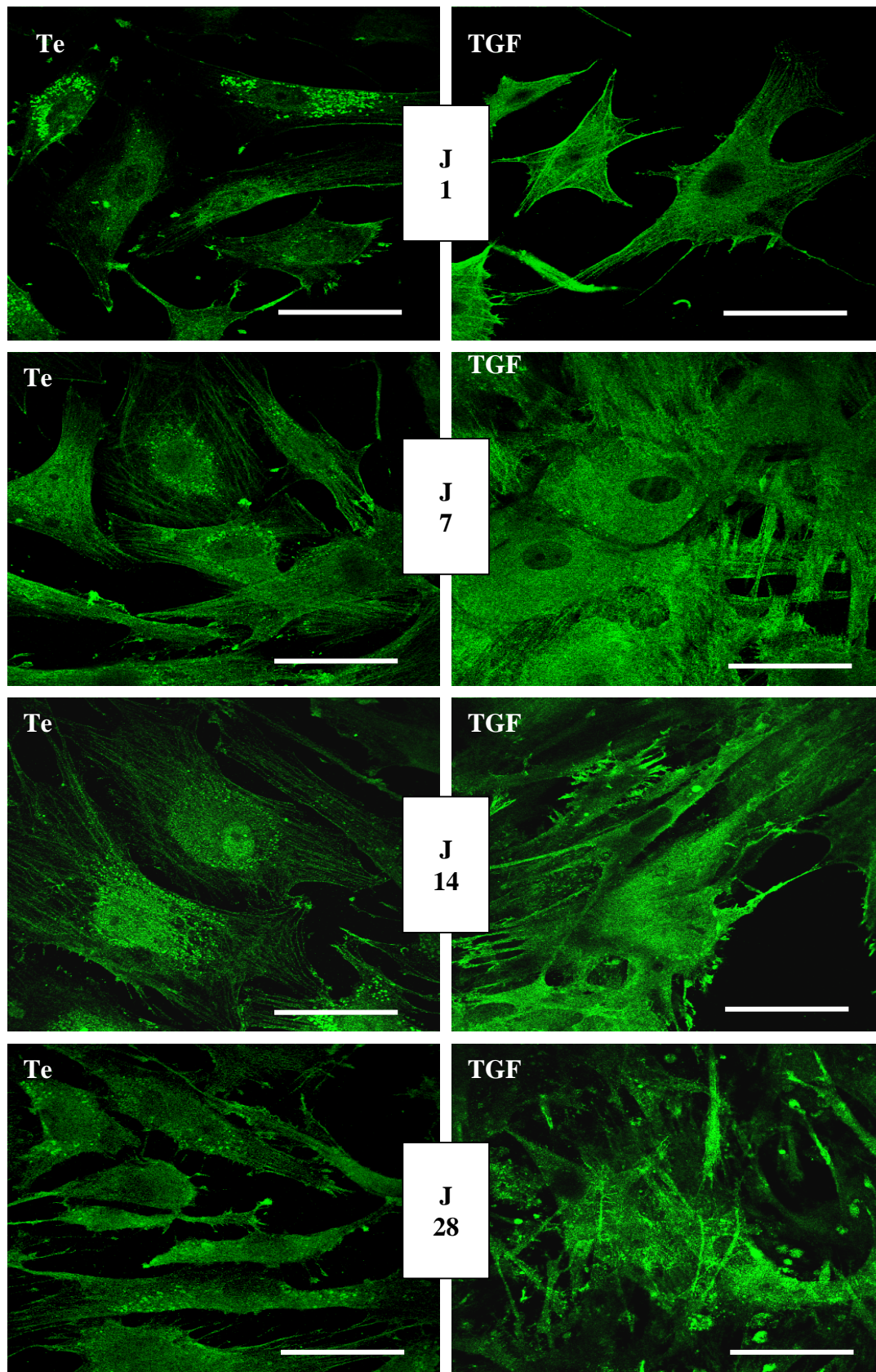


Figure 27 : Etude immunohistochimique de la synthèse d'ostéocalcine, en présence ou non de TGF- β 1, par les ostéoblastes en culture primaire à 1, 7, 14 et 28 jours de culture. J : jour ; Te : culture sans TGF- β 1 ; TGF : culture avec TGF- β 1 (3ng/ml). La barre blanche représente 50 μ m.

1-5 Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion des MMPs-1 et -3 et des inhibiteurs tissulaires TIMPs-1 et -2 par les cellules osseuses humaines

Lors de la cinétique de prolifération des cellules osseuses humaines préalablement décrite, les surnageants de culture ont été récoltés afin de déterminer quantitativement le taux de certaines protéines sécrétées par les cellules. Ainsi nous avons étudié la sécrétion des MMPs-1 et -3 et des TIMPs-1 et -2 par les cellules osseuses humaines à l'aide de la technique ELISA.

1-5-1 Etude de la sécrétion de la MMP-1 par les cellules osseuses humaines

Dans des conditions de culture sans TGF- β 1 (témoin), pendant la phase de prolifération des ostéoblastes en culture primaire (du 1^{er} au 7^{ème} jour) la quantité de MMP-1 sécrétée reste constante. Puis lorsque les cellules atteignent la confluence (14^{ème} jour), la quantité de MMP-1 sécrétée augmente légèrement puis diminue à nouveau jusqu'à la fin de la cinétique du 21^{ème} au 28^{ème} jour de culture (figure 28 A).

En présence de TGF- β 1, la quantité de MMP-1 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire augmente du 1^{er} au 4^{ème} jour puis diminue ensuite dès que les cellules ont atteint la confluence et que celles-ci produisent et sécrètent de la matrice. Il faut noter que la quantité de MMP-1 sécrétée en présence de TGF- β 1 est supérieure aux 1^{er}, 4^{ème} et 7^{ème} jour à celle sécrétée par les ostéoblastes sans TGF- β 1 puis la quantité de MMP-1 sécrétée devient inférieure à celle sécrétée sans TGF- β 1 aux 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jours (figure 28 A).

Comparativement aux ostéoblastes en culture primaire, les cellules MG-63 sécrètent des quantités moins importantes de MMP-1. Dans des conditions de culture témoins, la quantité de MMP-1 sécrétée n'est détectable qu'à partir du 4^{ème} jour. Puis la quantité de MMP-1 sécrétée augmente jusqu'au 14^{ème} jour puis diminue ensuite au 21^{ème} jour (figure 28 B). En présence de TGF- β 1, la quantité de MMP-1 sécrétée par les cellules MG-63 augmente fortement en fonction du temps (figure 28 B).

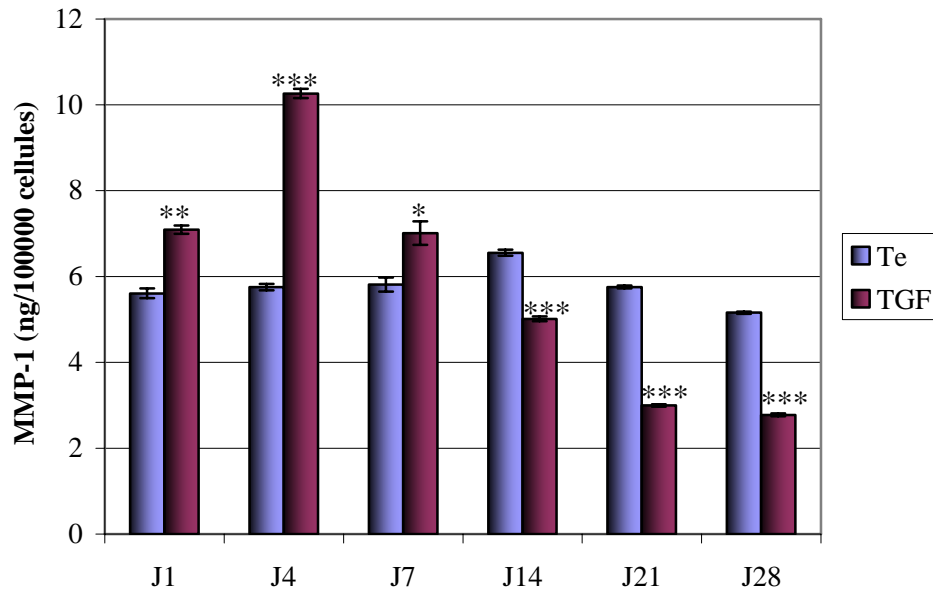
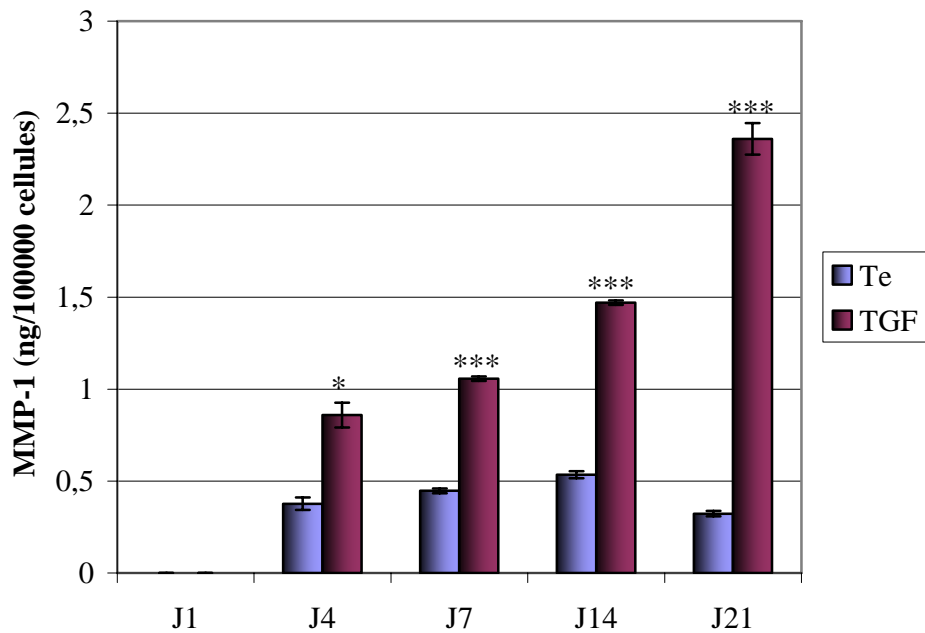
A**B**

Figure 28 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de MMP-1 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération. Les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B) sont analysés par la technique ELISA. Les dosages sont effectués aux différents points de la cinétique de prolifération pour chaque type de cellules osseuses humaines. Te : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF ; TGF : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en duplicate.

1-5-2 Etude de la sécrétion de la MMP-3 par les cellules osseuses humaines

Dans des conditions de culture témoins, la sécrétion de MMP-3 par les ostéoblastes en culture primaire diminue en fonction du temps (figure 29 A).

En présence de TGF- β 1, la sécrétion de MMP-3 diminue également en fonction du temps. Il faut cependant noter que la quantité de MMP-3 sécrétée n'est supérieure en présence de TGF- β 1 qu'au premier jour par rapport aux conditions de culture sans TGF- β 1 (figure 29 A).

Tout comme pour la MMP-1, les cellules MG-63 sécrètent une quantité moins importante de MMP-3 que les ostéoblastes en culture primaire.

En l'absence de TGF- β 1, le profil de sécrétion de la MMP-3 par les cellules MG-63 est identique à celui des ostéoblastes en culture primaire : il diminue en fonction du temps (figure 29 B).

Par contre en présence de TGF- β 1, la quantité de MMP-3 sécrétée diminue du 1^{er} au 14^{ème} jour puis augmente ensuite au 21^{ème} jour (figure 29 B), toutefois la quantité de MMP-3 sécrétée du 4^{ème} au 21^{ème} jour est supérieure à la quantité de MMP-3 sécrétée sans TGF- β 1 dans la culture du 4^{ème} au 21^{ème} jour.

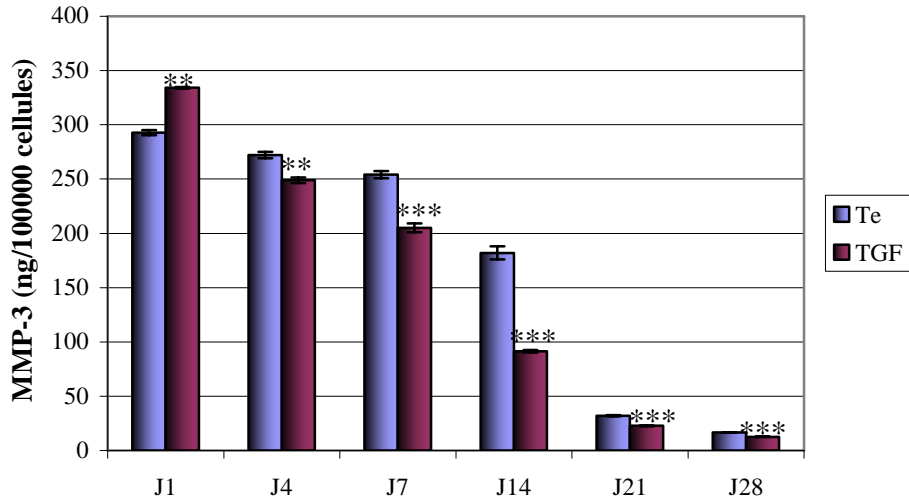
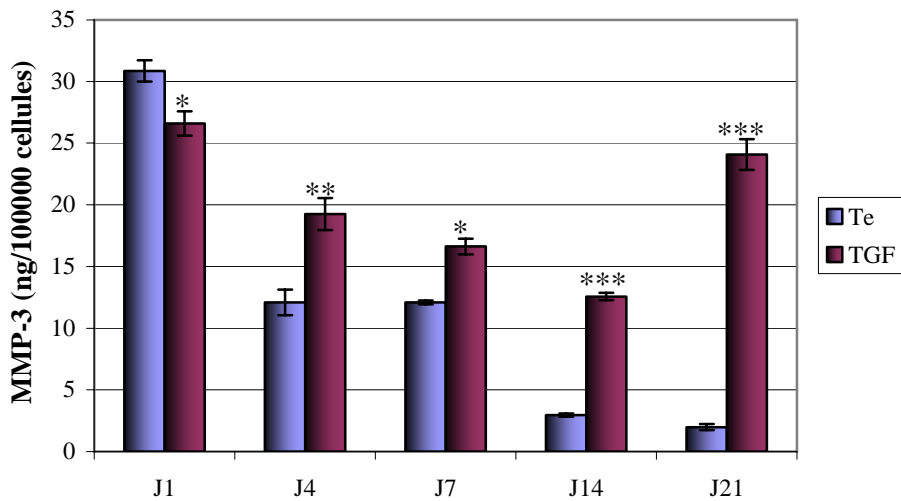
A**B**

Figure 29 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de MMP-3 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération. Les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B) sont analysés par la technique ELISA. Les dosages sont effectués aux différents points de la cinétique de prolifération pour chaque type de cellules osseuses humaines. Te : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF ; TGF : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en duplicate.

1-5-3 Etude de la sécrétion du TIMP-1 par les cellules osseuses humaines

La quantité de TIMP-1 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire, sans TGF- β 1, augmente jusqu'à ce que les cellules aient atteint la confluence. Puis la quantité de TIMP-1 diminue au 21^{ème} jour pour rester constante jusqu'à la fin de l'étude cinétique (figure 30 A). En présence de TGF- β 1, la quantité de TIMP-1 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire oscille en fonction du temps sans être significativement différente du témoin sauf aux jours 4 et 28 où elle augmente significativement (figure 30 A).

Les cellules MG-63 ont un profil de sécrétion du TIMP-1 différent de celui des ostéoblastes en culture primaire.

Que ce soit en absence ou en présence de TGF- β 1, la sécrétion de TIMP-1 par les cellules MG-63 augmente en fonction du temps (figure 30 B). Toutefois, la quantité de TIMP-1 sécrétée par les cellules MG-63 est légèrement supérieure en présence de TGF- β 1 (figure 30 B).

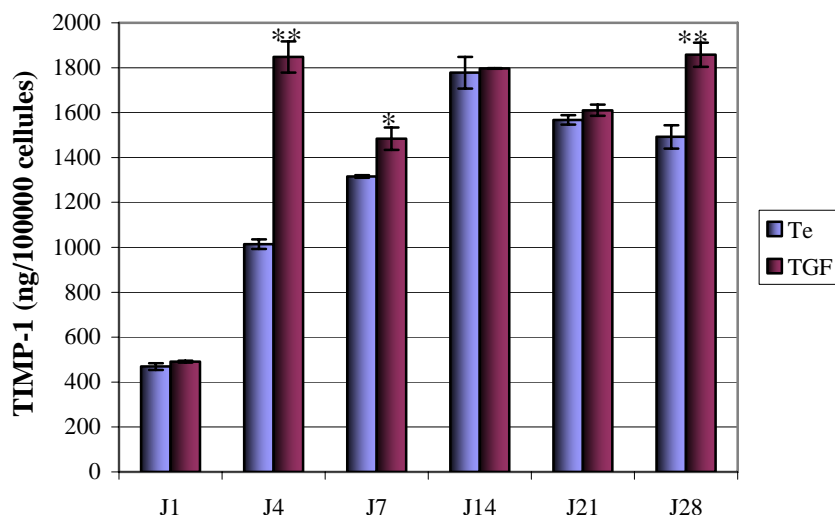
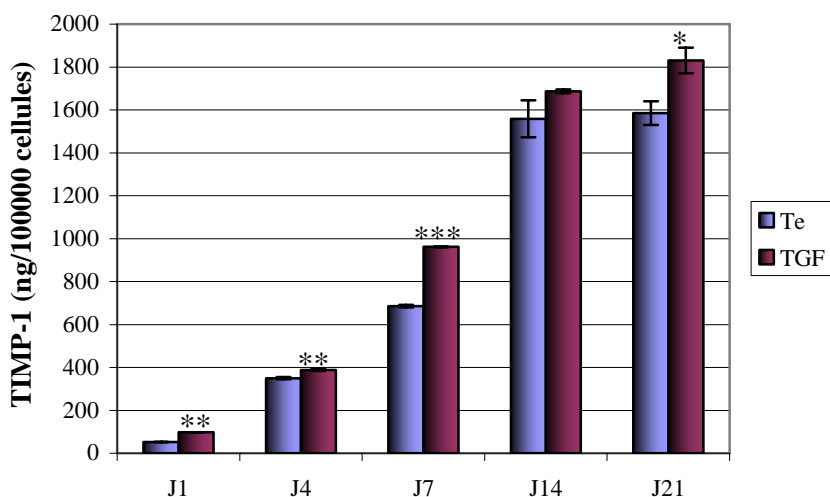
A**B**

Figure 30 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion de TIMP-1 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération. Les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B) sont analysés par la technique ELISA. Les dosages sont effectués aux différents points de la cinétique de prolifération pour chaque type de cellules osseuses humaines. Te : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF ; TGF : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en duplicate.

1-5-4 Etude de la sécrétion du TIMP-2 par les cellules osseuses humaines

La sécrétion de TIMP-2 par les ostéoblastes en culture primaire, sans TGF- β 1, diminue rapidement au cours du temps (figure 31 A).

En présence de TGF- β 1, la sécrétion de TIMP-2 par les cellules diminue également en fonction du temps. Cependant, la quantité de TIMP-2 sécrétée par les ostéoblastes est supérieure en présence de TGF- β 1 sauf au 28^{ème} jour de culture à celle sécrétée sans TGF- β 1 dans la culture (figure 31 A).

Dans les cellules MG-63, en absence ou en présence de TGF- β 1, la sécrétion de TIMP-2 ne varie pas significativement (figure 31 B).

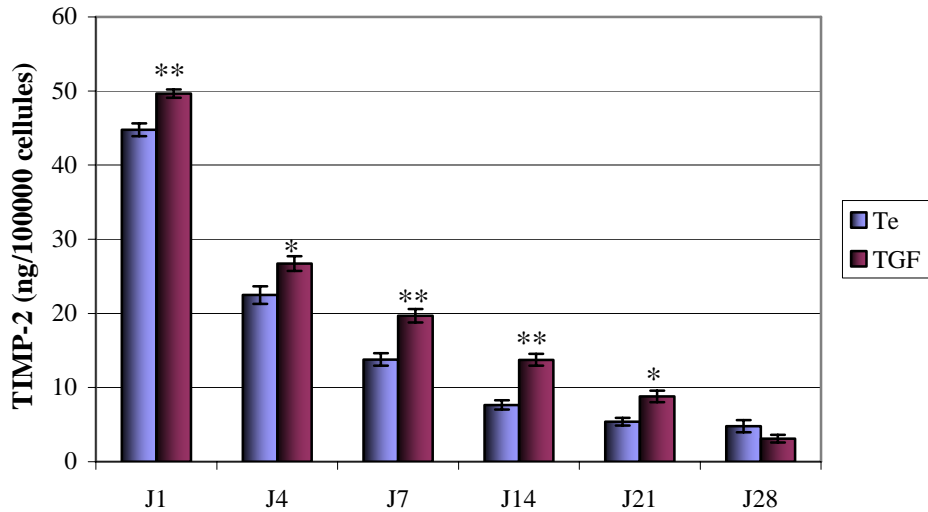
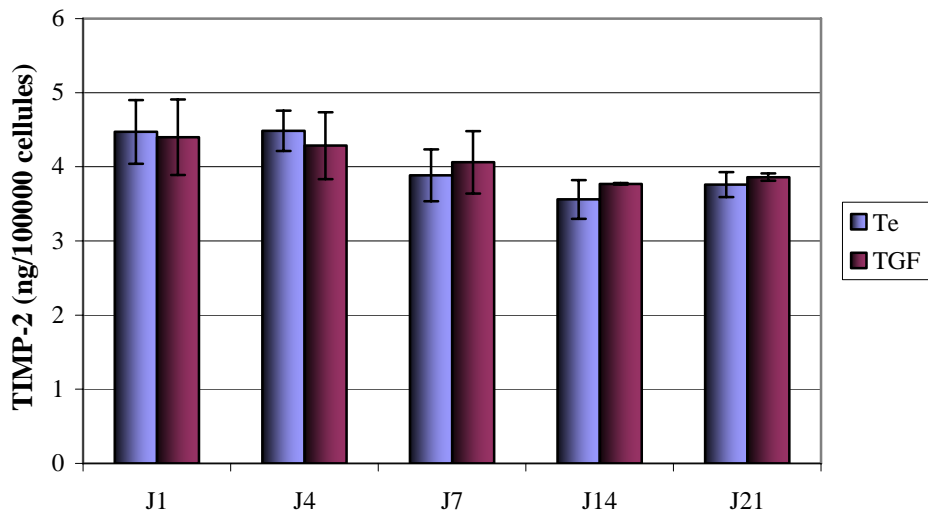
A**B**

Figure 31 : Influence du TGF- β 1 sur la s cretion de TIMP-2 par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération. Les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B) sont analysés par la technique ELISA. Les dosages sont effectués aux différents points de la cinétique de prolifération pour chaque type de cellules osseuses humaines. Te : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF ; TGF : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en duplicate.

1-6 Effet du TGF- β 1 sur la sécrétion d'ostéopontine au cours de la cinétique de prolifération cellulaire de cellules osseuses humaines.

La détermination des quantités d'ostéopontine au cours de cette étude a été réalisée comme dans le cas du paragraphe 1-5 sur les surnageants de culture par la technique ELISA.

Dans des conditions de culture témoins, la quantité d'ostéopontine sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire reste constante au début de l'étude cinétique (du 1^{er} au 4^{ème} jour) puis augmente en fonction du temps (figure 32 A).

En présence de TGF- β 1, la sécrétion d'ostéopontine augmente en fonction du temps. Il faut noter que la quantité d'ostéopontine sécrétée est toujours significativement supérieure en présence de TGF- β 1 (figure 32 A).

Par contre la sécrétion d'ostéopontine par les cellules MG-63, sans TGF- β 1 dans la culture, diminue en fonction du temps (figure 32 B).

Le TGF- β 1, quant à lui, a un effet biphasique sur la sécrétion d'ostéopontine par les cellules MG-63. En effet, il diminue la sécrétion d'ostéopontine du 1^{er} au 7^{ème} jour puis la stimule du 14^{ème} au 21^{ème} jour (figure 32 B). Cependant la quantité d'ostéopontine sécrétée en présence de TGF- β 1 est supérieure à celle sécrétée dans les conditions de culture témoins, sauf au 1^{er} jour.

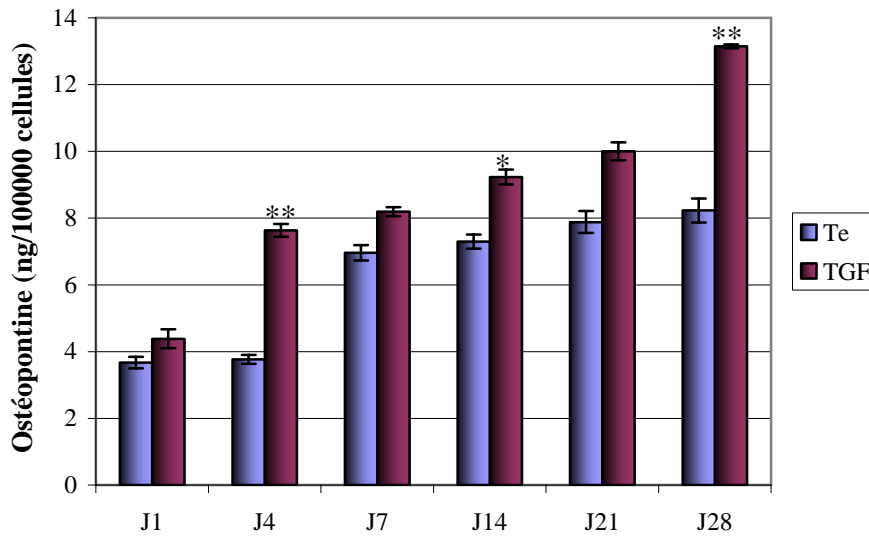
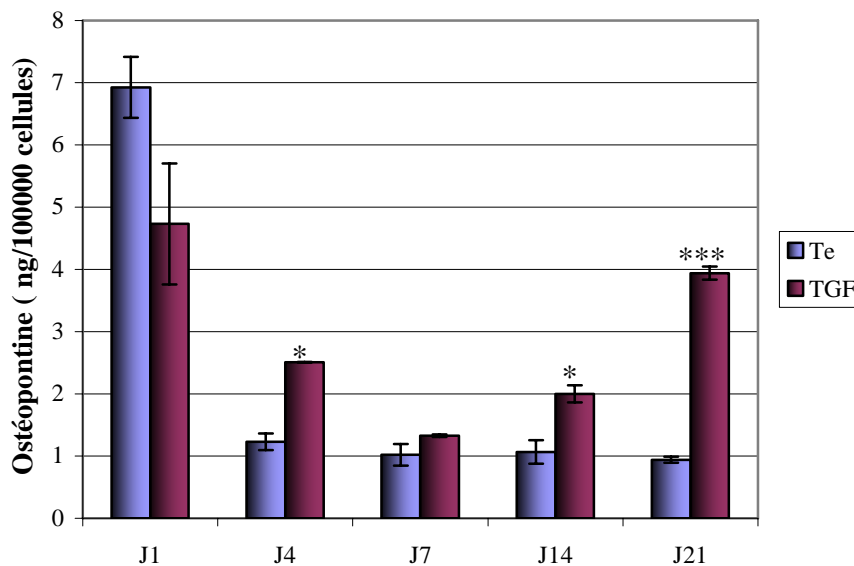
A**B**

Figure 32 : Influence du TGF- β 1 sur la sécrétion d'ostéopontine par les cellules osseuses humaines au cours de leur cinétique de prolifération. Les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B) sont analysés par la technique ELISA. Les dosages sont effectués aux différents points de la cinétique de prolifération pour chaque type de cellules osseuses humaines. Te : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF ; TGF : cellules cultivées dans du DMEM + 2% de SVF en présence de TGF- β 1 (3ng/ml). Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en duplicate.

2- Activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Elaïdyl-KRFK dans un modèle d'ostéoblastes humains en culture

2-1 Influence de la partie lipidique du lipopeptide (acide élaïdique) sur les ostéoblastes humains

Le lipopeptide étudié est un composé bifonctionnel. Comme son nom l'indique il est composé à la fois d'une partie lipidique : l'acide élaïdique et d'une partie peptidique : la séquence KRFK présente dans la TSP-1.

L'étude du peptide KRFK sur le métabolisme des ostéoblastes humains a été précédemment réalisée dans notre laboratoire (Hurteaux, 2003). Ainsi il a été montré que le peptide KRKF n'induisait pas la prolifération des cellules aux concentrations utilisées et que la morphologie cellulaire n'était pas affectée par la présence du peptide dans la culture.

Les effets de certains acides gras sur les cellules peuvent être délétères. Les acides gras à longues chaînes notamment sont cytotoxiques pour les cellules cancéreuses. Toutefois, ces effets ne semblent pas affecter les cellules non transformées, saines. La partie lipidique du lipopeptide n'ayant jamais été étudiée dans les ostéoblastes humains, nous nous sommes intéressés à étudier les effets de l'acide élaïdique sur la prolifération et la morphologie cellulaire d'ostéoblastes humains après 24 heures de culture en présence de différentes concentrations en acide élaïdique et sans sérum.

2-1-1 Influence de l'acide élaïdique sur la prolifération d'ostéoblastes humains en culture

Afin de déterminer si l'acide élaïdique présente d'éventuels effets délétères sur les ostéoblastes humains, ceux-ci sont cultivés sans sérum en présence de concentrations croissantes d'acide élaïdique pendant 24 heures puis les cellules sont détachées et comptées.

Comme le montre la figure 33, la prolifération des ostéoblastes en culture primaire et des cellules MG-63 n'est pas significativement affectée par la présence d'acide élaïdique dont les concentrations varient de 0,5 μ M à 25 μ M.

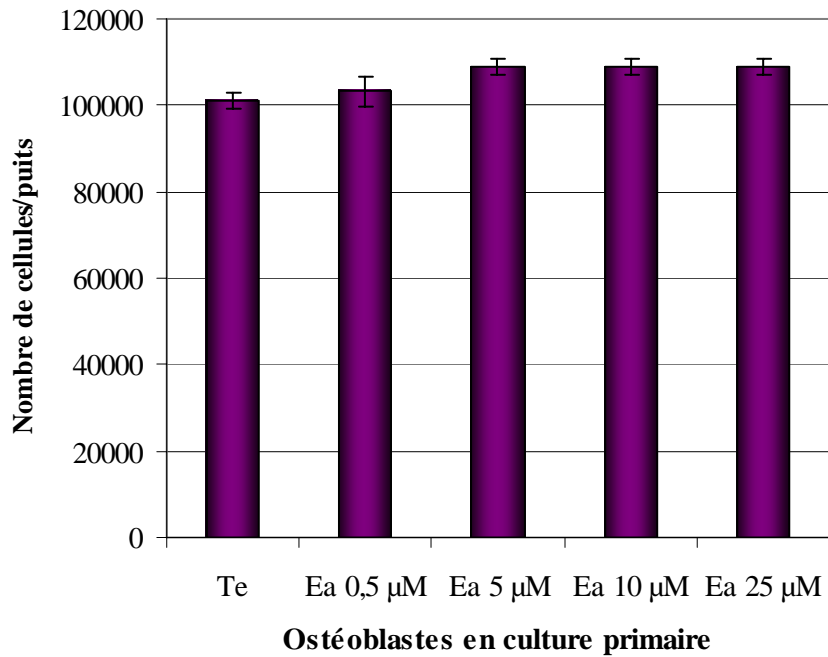
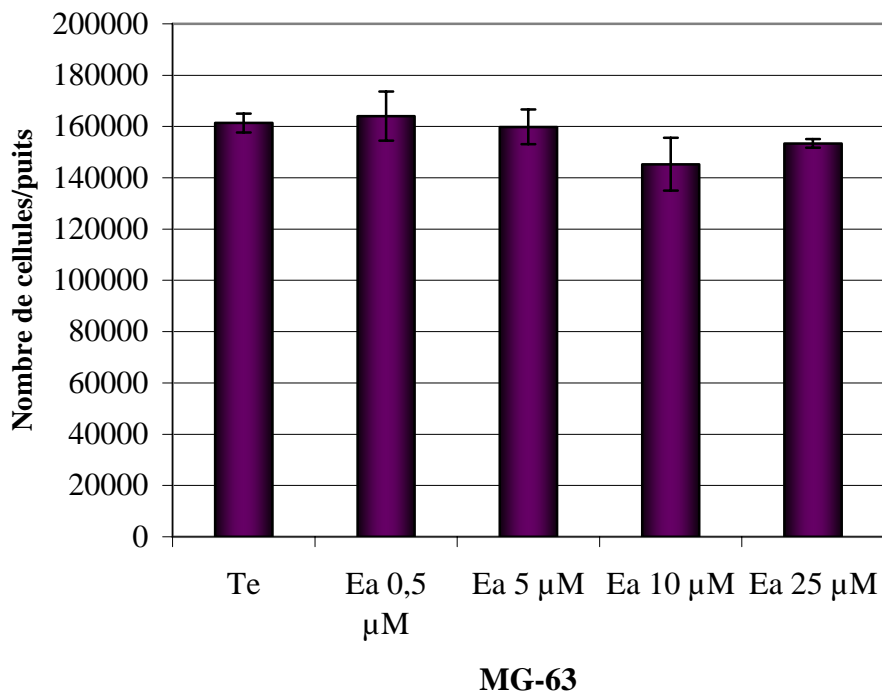
A**B**

Figure 33: Influence de l'acide élaïdique sur la prolifération des ostéoblastes humains. Les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) sontensemencées à 100000 cellules par puits et mises en contact de concentrations croissantes d'acide élaïdique (Ea) pendant 24 h sans sérum. Après 24 h de culture, les cellules sont détachées et comptées. Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences réalisées en triplicat.

2-1-2 Influence de l'acide élaïdique sur la morphologie d'ostéoblastes humains en culture

Comme pour l'étude de la prolifération cellulaire, les ostéoblastes en culture primaire et les cellules MG-63 sont mis en présence de concentrations d'acide élaïdique croissantes pendant 24 heures. Après cette période de culture, la morphologie cellulaire est étudiée en microscopie électronique à balayage.

Ainsi, quelle que soit la concentration d'acide élaïdique utilisée, les ostéoblastes en culture primaire apparaissent étalés et présentent de nombreux prolongements cellulaires. Les cellules ne présentent aucun signe de souffrance (figure 34). On observe le même comportement vis-à-vis de l'acide élaïdique dans les cellules MG-63 (figure 35).

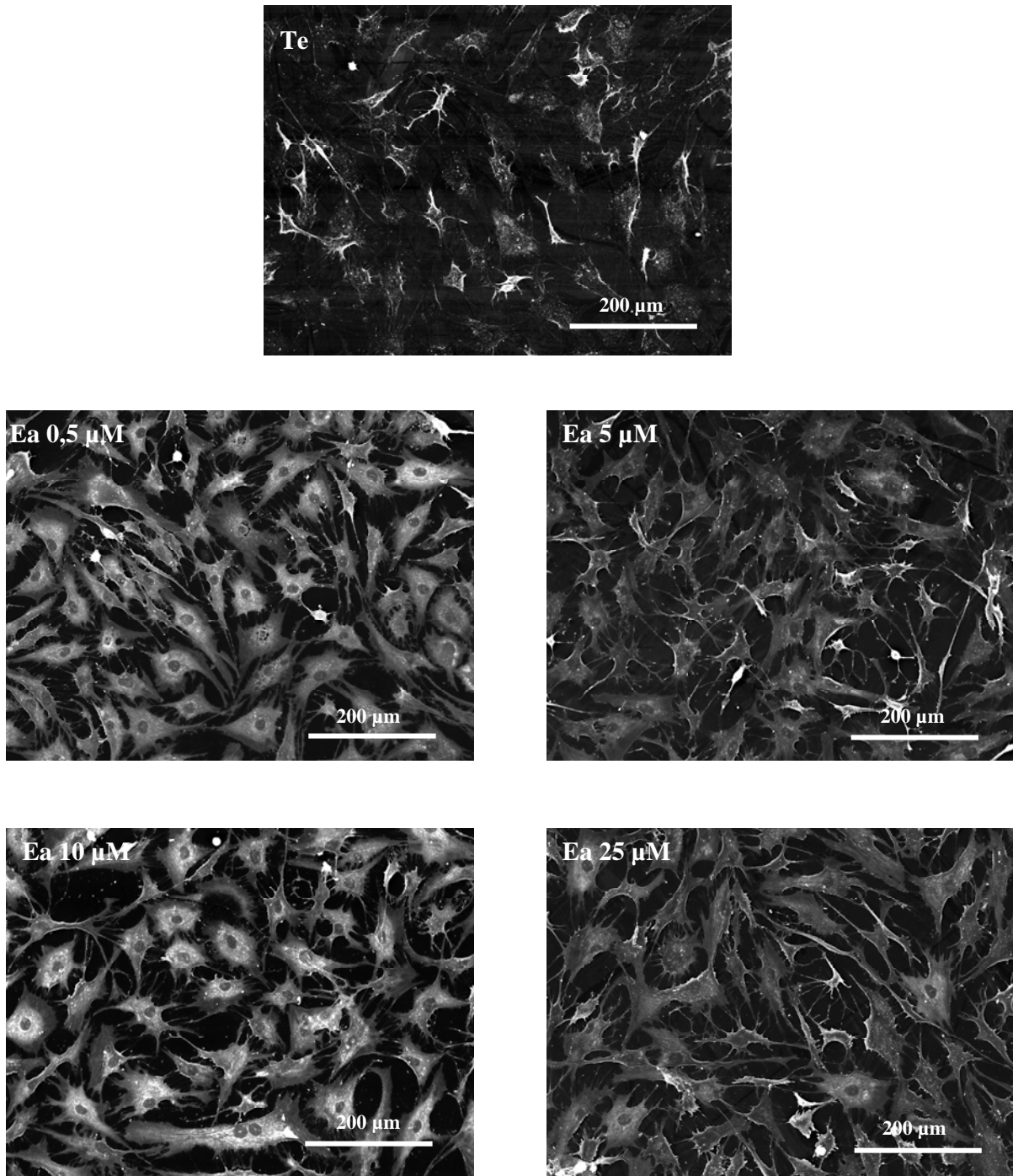


Figure 34 : Influence de l'acide oléique sur la morphologie cellulaire des ostéoblastes en culture primaire. Les cellules sont traitées pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes d'acide oléique (Ea). Après fixation, les cellules sont observées en microscopie électronique à balayage. Grandissement : X 200

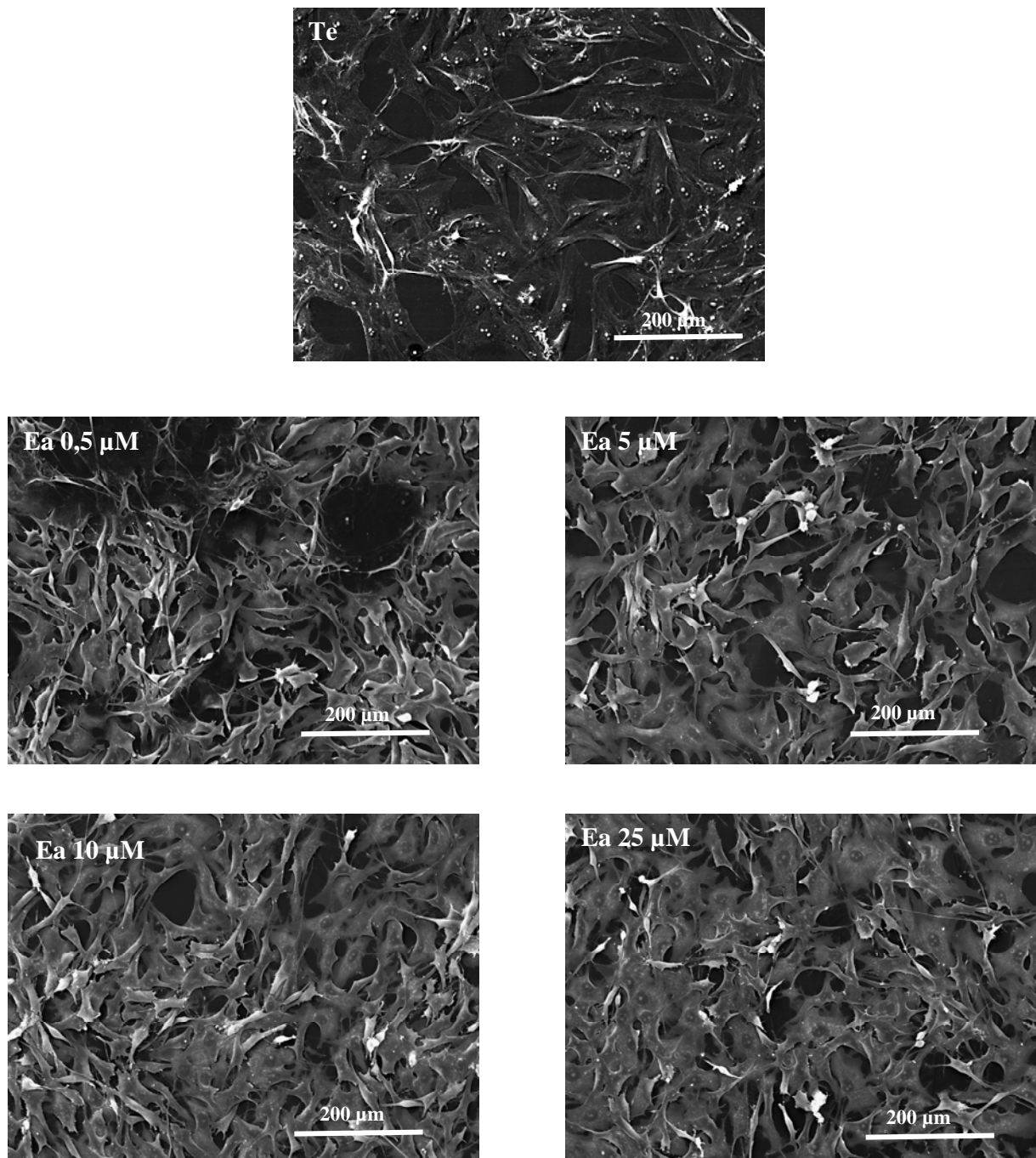


Figure 35 : Influence de l'acide oléique sur la morphologie des cellules MG-63. Les cellules sont traitées pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes d'acide oléique (Ea). Après fixation, les cellules sont observées en microscopie électronique à balayage. Grandissement : X 200

2-2 Activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK dans les ostéoblastes humains

2-2-1 Effet de l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la prolifération des ostéoblastes humains

Afin de montrer la capacité du lipopeptide Ea-KRFK à activer le TGF- β 1 latent, les ostéoblastes humains sontensemencés à subconfluence et mis en présence, dans un milieu de culture dépourvu de sérum, de TGF- β 1 latent (3ng/ml) additionné ou non du lipopeptide Ea-KRFK (5 μ M) pendant 24 h. Au terme de cette période de culture, les cellules sont trypsinisées et comptées.

La figure 36 montre la capacité du TGF- β 1 (3ng/ml), contrôle positif de l'expérience, à activer la prolifération des ostéoblastes humains. En effet il stimule, de 52 % la prolifération des ostéoblastes en culture primaire (figure 36 A), son effet est moins marqué en ce qui concerne les cellules MG-63 puisque la prolifération cellulaire n'est augmentée que de 13 % (figure 36 B). Utilisés comme contrôles négatifs, le TGF- β 1 latent, le lipopeptide Ea-KRFK et l'Ea seuls n'ont pas d'effet sur la prolifération des ostéoblastes humains.

Par contre, lorsque l'on associe le lipopeptide Ea-KRFK et le TGF- β 1 latent, la prolifération cellulaire est stimulée et ce, de manière comparable à celle obtenue en présence de TGF- β 1 (figure 36 A et B).

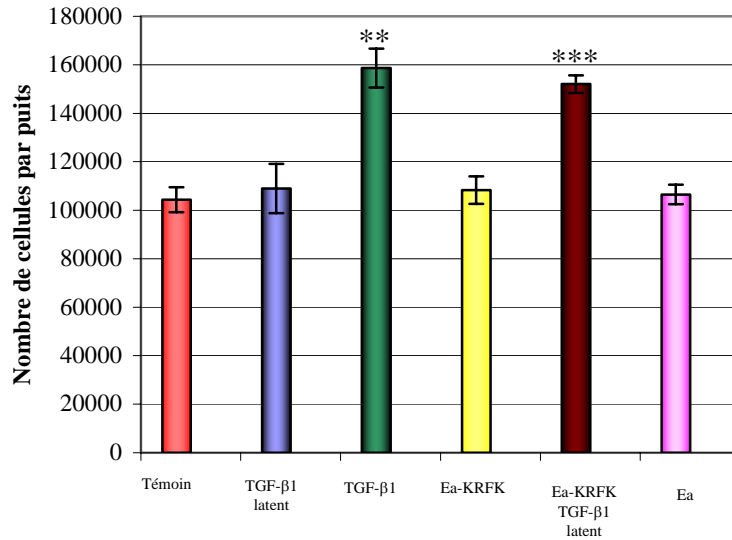
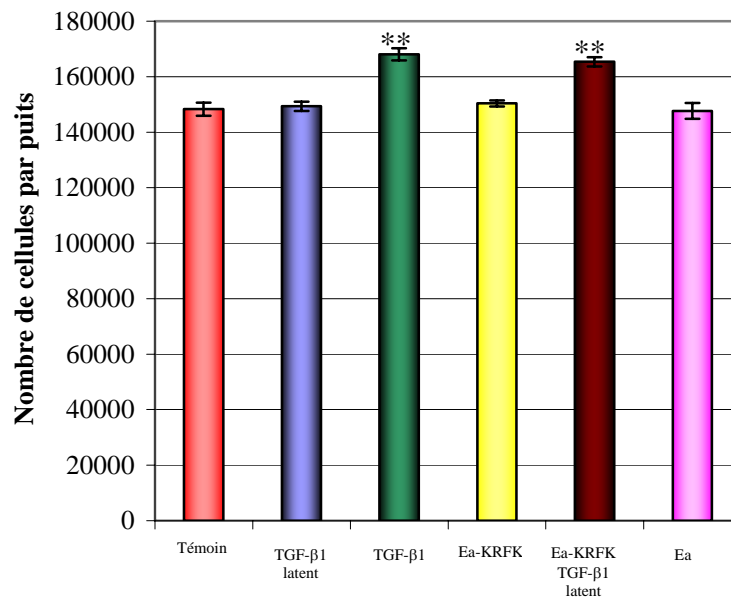
A**B**

Figure 36 : Effet de l'association Ea-KRFK/TGF-β1 latent sur la prolifération des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 (B). Après 24 heures de culture dans un milieu sans sérum en présence soit de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou Ea-KRF (5μM), de TGF-β1 (3 ng/ml) ou de Ea (5 μM), les cellules sont trypsinisées et comptées. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de 3 expériences réalisées en triplicate.

Puisque le TGF- β 1 latent et l'Ea-KRFK n'ont pas d'effets significatifs sur la prolifération cellulaire, nous supposons que l'augmentation de prolifération observée en présence de TGF- β 1 latent et d'Ea-KRFK est due à l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK puisqu'elle reproduit les effets sur la prolifération obtenus en présence de TGF- β 1.

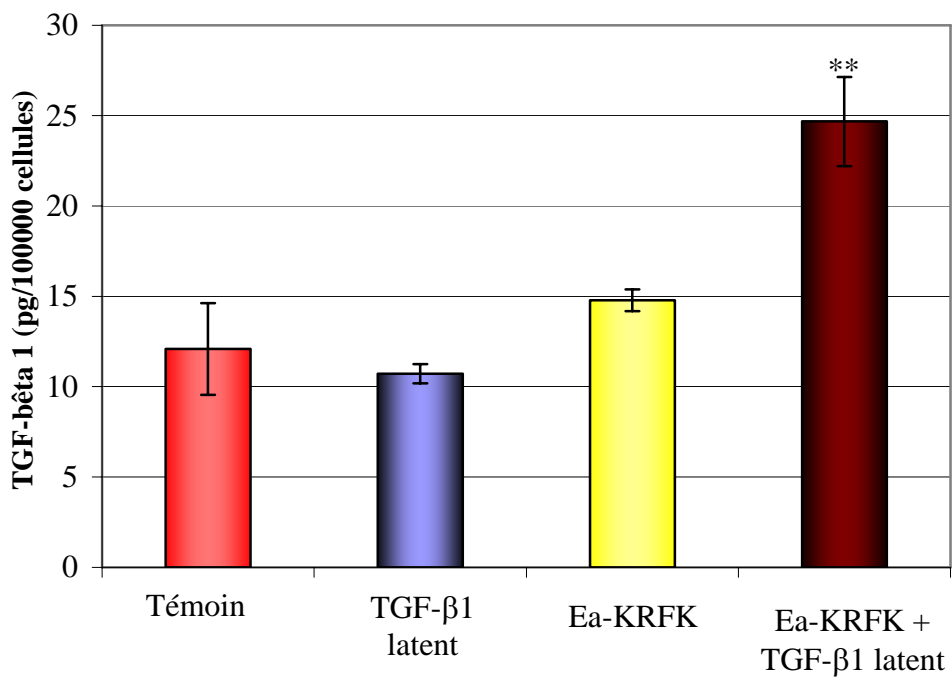
Afin de vérifier cette hypothèse, les surnageants de culture de l'expérience de prolifération cellulaire sont dosés par ELISA pour déterminer la quantité de TGF- β 1 sécrétée par les ostéoblastes humains en culture.

La figure 37 A montre que lorsque les ostéoblastes en culture primaire sont traités par du TGF- β 1 latent et du lipopeptide seul, la sécrétion de TGF- β 1 latent n'est pas significativement différente de celle obtenue dans les cellules témoins (figure 37 A). Par contre, lorsque l'on associe le TGF- β 1 latent et le lipopeptide dans le milieu de culture, la quantité de TGF- β 1 est multipliée par 2, cette augmentation est imputée à la capacité du lipopeptide à activer le TGF- β 1 latent.

Dans les cellules MG-63, la quantité de TGF- β 1 sécrétée est également augmentée (3,3 fois) lorsque les cellules sont traitées conjointement par le TGF- β 1 latent et le lipopeptide Ea-KRFK (figure 37 B). En présence de TGF- β 1 latent seul et de lipopeptide seul dans la culture, la quantité de TGF- β 1 sécrétée n'est pas significativement différente de celle obtenue dans les conditions de culture témoins.

Ainsi, l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK conduit à l'augmentation de la prolifération cellulaire dans les ostéoblastes humains en culture.

A



B

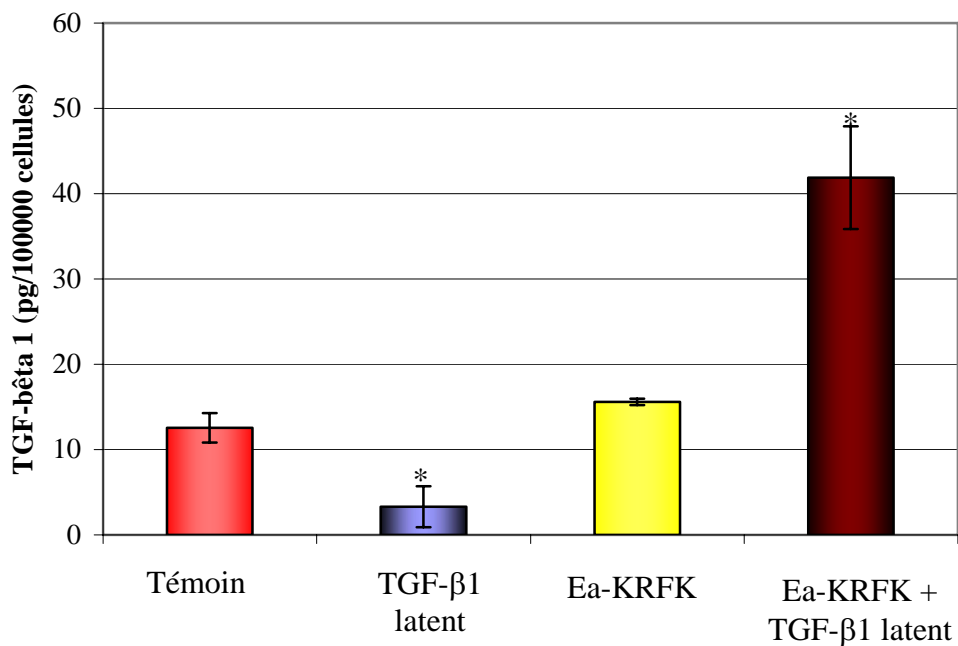


Figure 37: Effet de l'association TGF-β1 latent et Ea-KRFK sur la sécrétion de TGF-β1 par les ostéoblastes humains. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou d'Ea-KRFK (5μM), les surnageants de culture des ostéoblastes en culture primaire (A) et des cellules MG-63 sont dosés par ELISA. La quantité de TGF-β1 sécrétée est reportée à 1.10^5 cellules. Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences réalisées en triplicate.

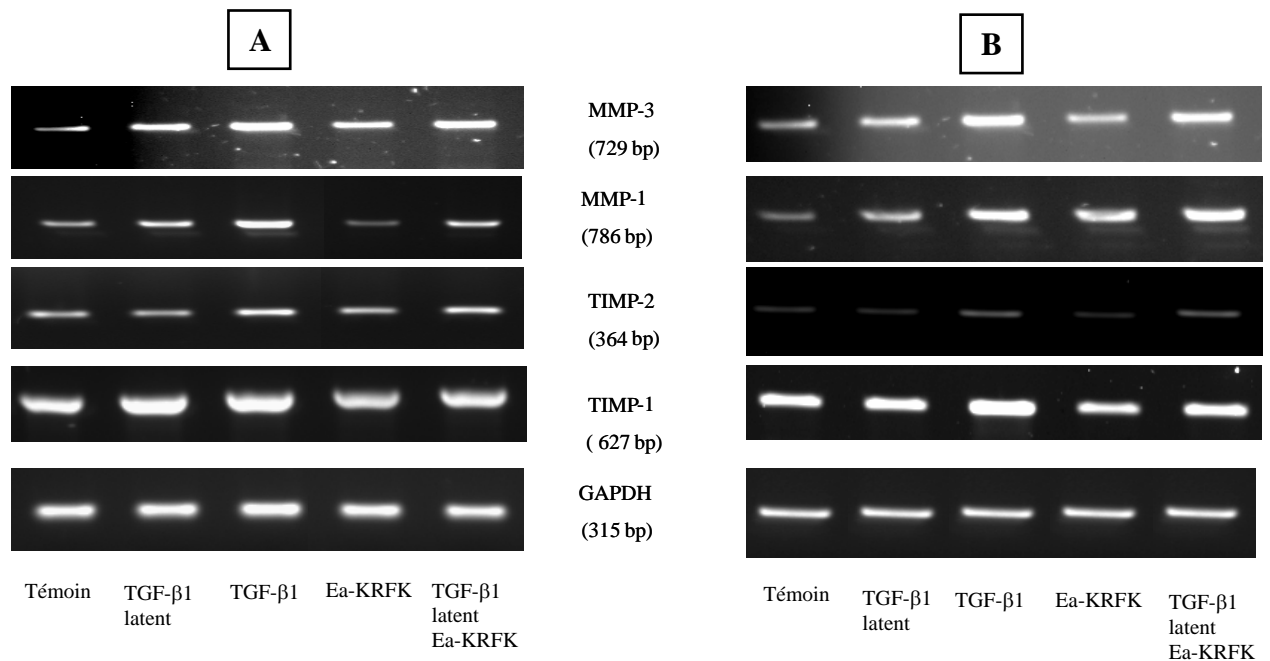
2-2-2 Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des MMPs-1, -3 et des TIMPs-1 et -2 dans les cellules osseuses humaines

Afin de démontrer si l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK est capable de réguler l'expression de gènes influant sur le remodelage osseux, les ARNs des cellules osseuses humaines ont été extraits après 24 h de culture en présence de TGF- β 1 latent \pm Ea-KRFK puis l'expression des gènes a été analysée par RT-PCR.

La figure 38 montre que l'association du TGF- β 1 latent et de l'Ea-KRFK augmente l'expression des gènes de la MMP-1 et de la MMP-3, dans les deux types de cellules osseuses humaines testées, de manière comparable à l'augmentation de l'expression de ces gènes en présence de TGF- β 1. De même l'expression du gène du TIMP-2 est augmentée lorsque les cellules sont traitées par l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK ou le TGF- β 1. Par contre, l'expression du gène du TIMP-1 est augmentée seulement dans les cellules MG-63 (figure 38 B).

Le lipopeptide Ea-KRFK et le TGF- β 1 utilisés seuls n'ont pas d'effet sur l'expression de ces gènes (figure 38 A et B).

Donc, l'augmentation de l'expression des gènes des MMP-1, MMP-3, TIMP-1 et TIMP-2 est due à l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK.



Ostéoblastes en culture primaire

MG-63

Figure 38 : Influence de l'association TGF-β1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des gènes des MMPs-1 et -3 et des TIMPs-1 et -2 dans les cellules osseuses humaines. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou d'Ea-KRFK (5 μM) ou de TGF-β1 (3 ng/ml), les ARNs des ostéoblastes en culture primaire (A) et des MG-63 (B) sont extraits et l'expression des gènes est analysée par RT-PCR.

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (gène de référence) ; pb : paire de bases.

L'association TGF- β 1 latent/lipopeptide Ea-KRFK étant capable de moduler l'expression des gènes des MMPs-1 et -3 et des TIMPs-1 et -2 nous avons donc testé par la technique ELISA, sur les surnageants de culture, l'effet de cette association sur la sécrétion de ces protéines dans les cellules osseuses humaines.

Dans les ostéoblastes en culture primaire, le traitement par le TGF- β 1 latent, le lipopeptide Ea-KRFK ou l'Ea n'induit pas de modifications significatives du niveau de sécrétion de la protéine MMP-1 par rapport aux conditions de culture témoins (figure 39 A). Par contre, lorsque ceux-ci sont traités par le TGF- β 1, la quantité de MMP-1 sécrétée est augmentée de 4 fois par rapport à la quantité de MMP-1 sécrétée par les cellules témoins. La quantité de MMP-1 sécrétée lorsque les cellules sont traitées conjointement par le TGF- β 1 latent et le lipopeptide est également augmentée mais seulement de 2,4 fois par rapport à la quantité de MMP-1 sécrétée par les cellules témoins (figure 39 A).

Comme le montre la figure 39 B, le niveau de sécrétion de la MMP-1 est comparable dans les cellules MG-63 à celui observé dans les ostéoblastes en culture primaire et les cellules MG-63 réagissent de la même manière que les ostéoblastes en culture primaire vis-à-vis des différents traitements. Toutefois, en présence d'Ea, la sécrétion de MMP-1 par les cellules MG-63 est diminuée significativement.

Les résultats obtenus au niveau protéique sont en accord avec ceux obtenus au niveau du gène, en ce qui concerne la MMP-1 et montrent que l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK est capable de moduler l'expression de la MMP-1.

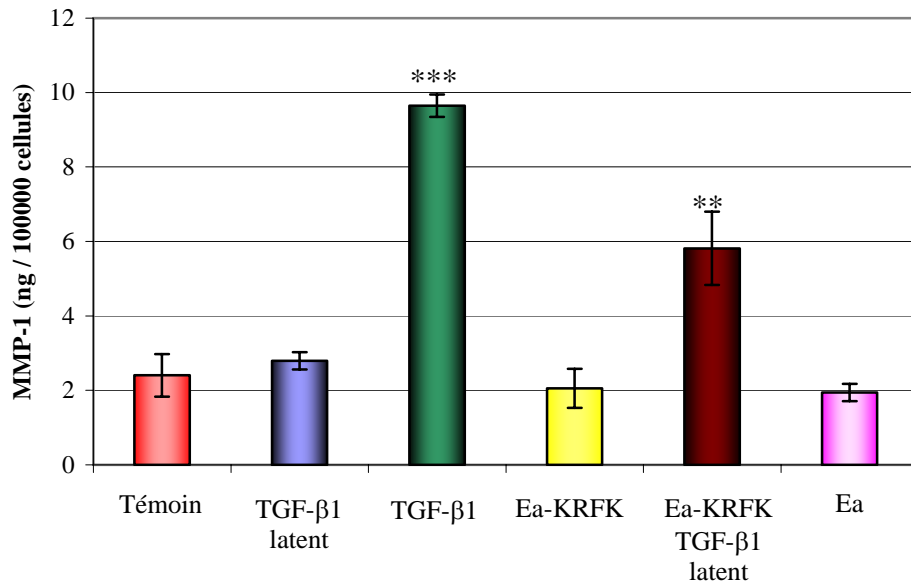
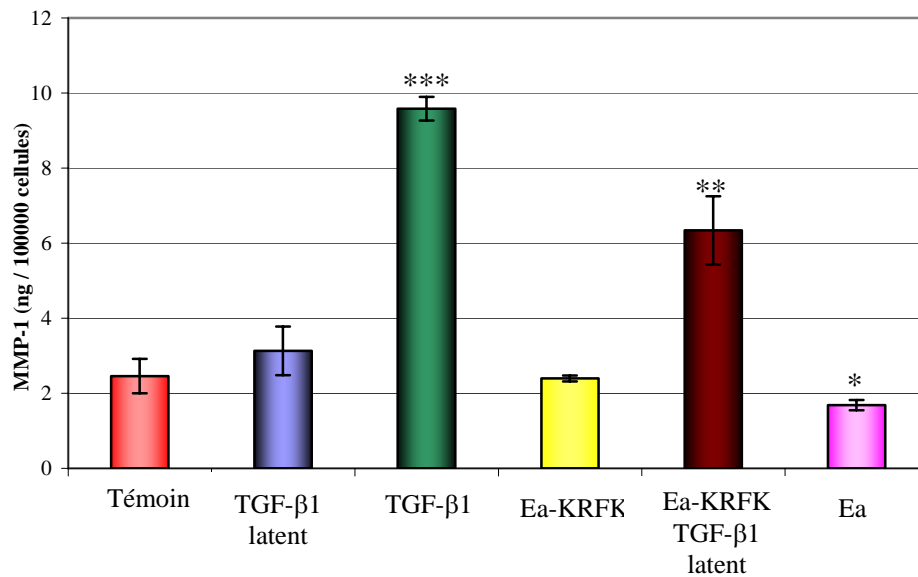
A**B**

Figure 39 : Influence de l'activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion de la MMP-1 par les ostéoblastes humains. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou Ea-KRFK (5 μM), de TGF-β1 (3 ng/ml) ou d'Ea (5 μM), la quantité de MMP-1 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) est dosée dans les surnageants de culture par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de 3 expériences réalisées en triplicate.

La quantité de MMP-3 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire est légèrement augmentée en présence de TGF- β 1 latent et d'Ea-KRFK par rapport aux conditions témoins (figure 40 A). Par contre, lorsque l'Ea est utilisé seul, la sécrétion de MMP-3 par les ostéoblastes humains est diminuée.

En présence de TGF- β 1, la sécrétion de MMP-3 par les ostéoblastes en culture primaire est très nettement augmentée.

Le co-traitement des ostéoblastes en culture primaire par le TGF- β 1 latent et l'Ea-KRFK stimule également la sécrétion de MMP-3 ; cependant, celle-ci n'atteint pas le niveau de sécrétion obtenu en présence de TGF- β 1 (figure 40 A). Ainsi l'augmentation de sécrétion de la MMP-3 observée lors du co-traitement est due à l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK.

Les cellules MG-63 sécrètent une quantité moindre de MMP-3 par rapport aux ostéoblastes en culture primaire.

L'Ea induit, comme dans le cas des ostéoblastes en culture primaire, une diminution de la sécrétion de MMP-3. Par contre, utilisés seul dans la culture, le TGF- β 1 latent et l'Ea-KRFK induisent également une diminution de la sécrétion de MMP-3 par rapport aux conditions témoins (figure 40 B).

Le TGF- β 1, quant à lui, stimule la production de MMP-3 par les cellules MG-63.

En présence de TGF- β 1 et d'Ea-KRFK, la sécrétion de MMP-3 est également augmentée mais elle n'atteint pas le niveau obtenu lors du traitement des cellules par le TGF- β 1 (figure 40 B).

Dans les cas des cellules MG-63, l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK module la sécrétion de MMP-3 comme pour les ostéoblastes en culture primaire.

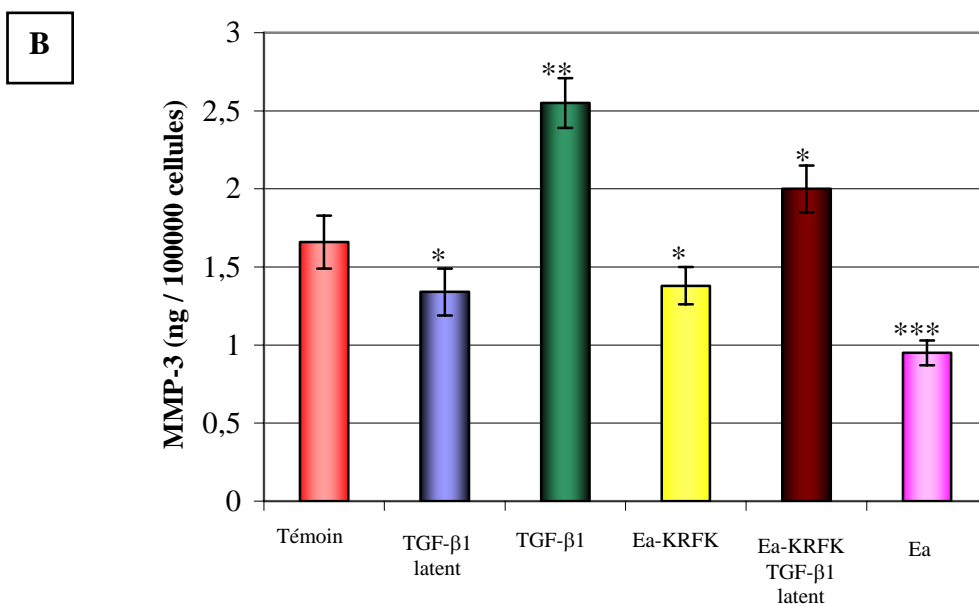
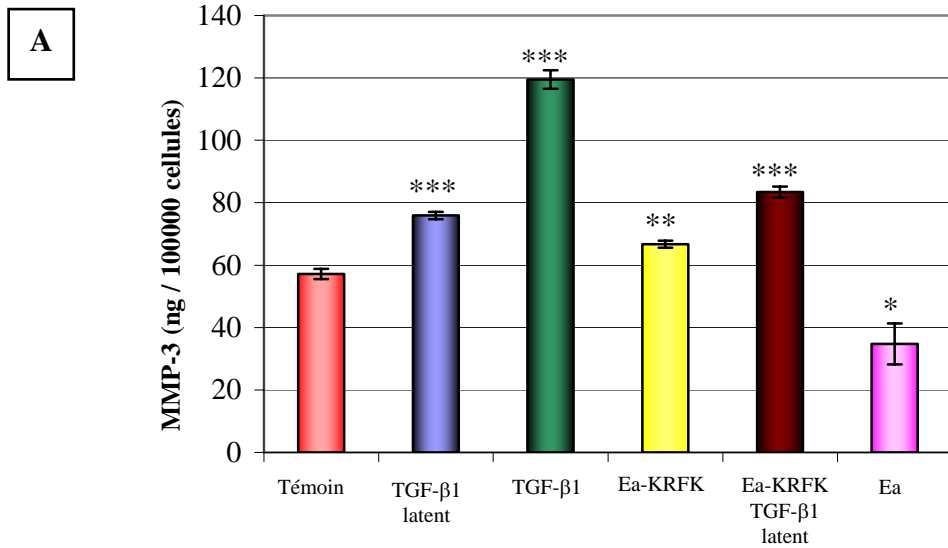


Figure 40 : Influence de l'activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion de la MMP-3 par les ostéoblastes humains. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou Ea-KRFK (5 μM), de TGF-β1 (3 ng/ml) ou d'Ea (5 μM), la quantité de MMP-3 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) est dosée dans les surnageants de culture par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de 3 expériences réalisées en triplicate.

Après 24 h de culture en présence de TGF- β 1, de TGF- β 1 latent ou de TGF- β 1 latent/Ea-KRFK, la sécrétion de TIMP-1 par les ostéoblastes en culture primaire n'est pas affectée par rapport à celle obtenue dans les conditions de culture témoins (figure 41 A). La sécrétion de TIMP-1 est par contre diminuée dans les ostéoblastes en culture primaire en présence d'Ea-KRFK et d'Ea.

La sécrétion de TIMP-1 est très nettement augmentée dans les cellules MG-63 en présence de TGF- β 1. En présence de TGF- β 1 latent, la sécrétion de TIMP-1 est diminuée, par contre l'Ea-KRFK augmente cette sécrétion (figure 41 B). Dans le cas du co-traitement TGF- β 1 latent/Ea-KRFK, la sécrétion de TIMP-1 est augmentée et est due à l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK. L'Ea seul, quant à lui, augmente légèrement la sécrétion du TIMP-1 par les cellules MG-63.

Il semblerait que l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK soit capable de moduler la sécrétion de TIMP-1 seulement dans les cellules MG-63, ce qui confirme les résultats obtenus par RT-PCR.

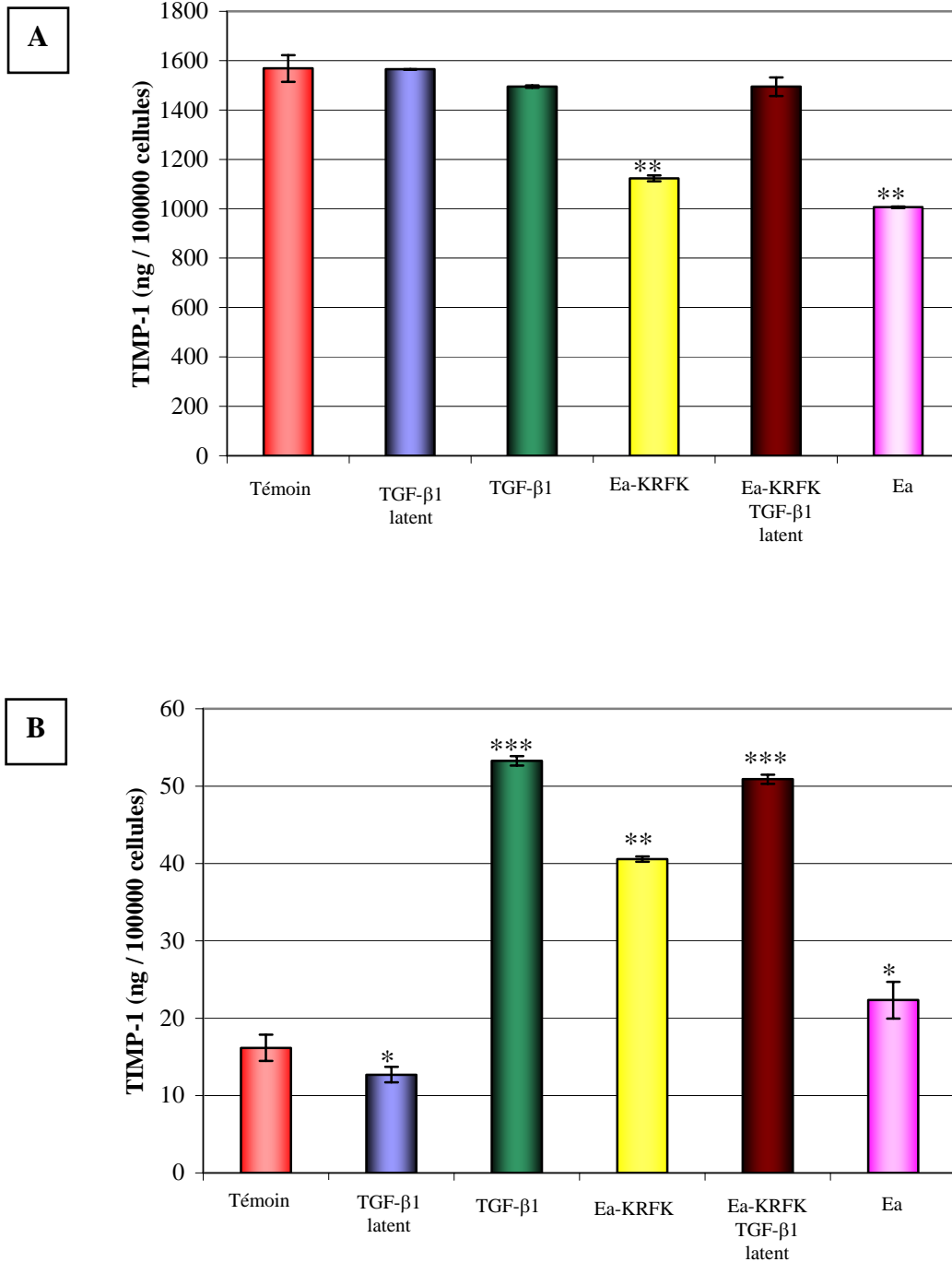


Figure 41 : Influence de l'activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion du TIMP-1 par les ostéoblastes humains. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou Ea-KRFK (5 μM), de TGF-β1 (3 ng/ml) ou d'Ea (5 μM), la quantité de TIMP-1 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) est dosée dans les surnageants de culture par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de 3 expériences réalisées en triplicate.

Après 24 h de traitement par le lipopeptide seul ou par l'acide gras seul, la sécrétion de TIMP-2 par les ostéoblastes en culture primaire n'est pas significativement différente de celle observée dans les cellules témoins.

Par contre, le TGF- β 1 latent augmente légèrement la sécrétion de TIMP-2 par les cellules mais de façon moindre que le TGF- β 1 (figure 42 A). Lorsque l'on associe le TGF- β 1 latent et l'Ea-KRFK dans la culture, on observe une augmentation de la sécrétion du TIMP-2 plus importante que celle du TGF- β 1 latent seul (figure 42 A). Ainsi, l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide influe sur la sécrétion de TIMP-2 dans les ostéoblastes en culture primaire.

Dans les cellules MG-63, la sécrétion de TIMP-2 n'est affectée par aucun des traitements (figure 42 B).

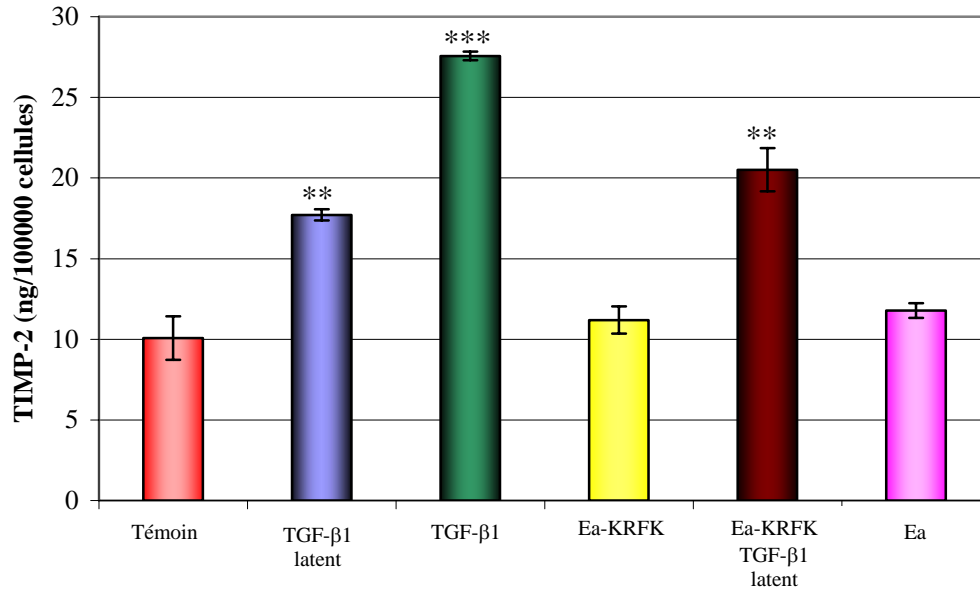
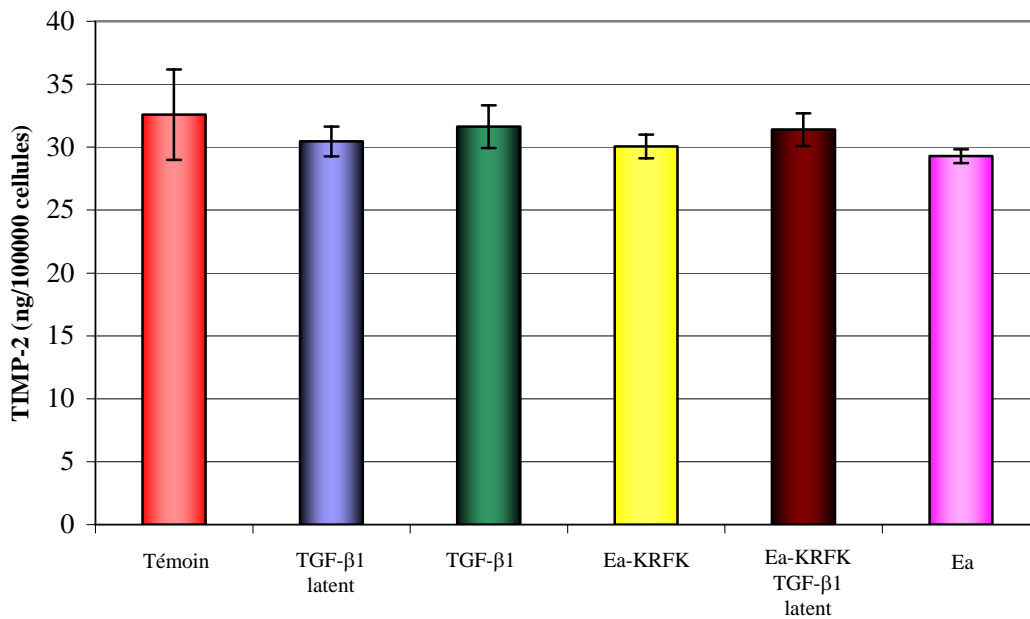
A**B**

Figure 42 : Influence de l'activation du TGF-β1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK sur la sécrétion du TIMP-2 par les ostéoblastes humains. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou Ea-KRFK (5 μM), de TGF-β1 (3 ng/ml) ou d'Ea (5 μM), la quantité de TIMP-2 sécrétée par les ostéoblastes en culture primaire (A) et les cellules MG-63 (B) est dosée dans les surnageants de culture par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de 3 expériences réalisées en triplicate.

2-2-3 Influence de l'association TGF- β 1 latent/Ea-KRFK sur l'expression de gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire osseuse dans les cellules osseuses humaines

Dans notre étude, nous avons démontré que l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide était capable de moduler des protéines comme les MMPs et les TIMPs qui sont impliqués dans le remodelage osseux. Nous nous sommes donc intéressés par RT-PCR à l'influence de cette activation sur l'expression de gènes codant des protéines de la matrice osseuse afin de prouver la capacité du lipopeptide à influencer la formation osseuse.

L'expression du gène du COL I n'est pas modifiée par rapport aux conditions de culture témoins par aucun des traitements dans les deux types cellulaires utilisés au cours de l'expérience (figure 43).

L'expression du gène de la PAL est augmentée en présence de TGF- β 1 dans les ostéoblastes en culture primaire. Utilisés seuls, le TGF- β 1 latent et le lipopeptide n'ont pas d'influence sur ce gène. Par contre, lorsqu'on les associe, ils provoquent une augmentation de l'expression du gène de la PAL comparable à celle obtenue en présence de TGF- β 1 (figure 43 A). Donc, l'augmentation du niveau d'expression du gène de la PAL observée dans les ostéoblastes en culture primaire en associant TGF- β 1 latent et Ea-KRFK est due à l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide.

Dans les cellules MG-63, aucune différence d'expression de ce gène n'est observée selon les différents traitements (figure 43 B).

Dans les deux types cellulaires utilisés, le TGF- β 1 augmente le niveau d'expression du gène codant pour l'OPN. En présence de TGF- β 1 latent et de lipopeptide Ea-KRFK, l'augmentation du niveau d'expression de ce gène est comparable à celle obtenue avec le TGF- β 1 et est due à l'activation du TGF- β 1 latent (figure 43).

Après seulement 24 h de traitement, il n'a pas été possible de détecter le gène codant pour l'ostéocalcine (marqueur terminal de la différenciation ostéoblastique) dans les 2 types cellulaires.

Ainsi, le lipopeptide est capable, via l'activation du TGF- β 1, d'influer sur certains gènes de la MEC osseuse et est donc capable de moduler le remodelage osseux.

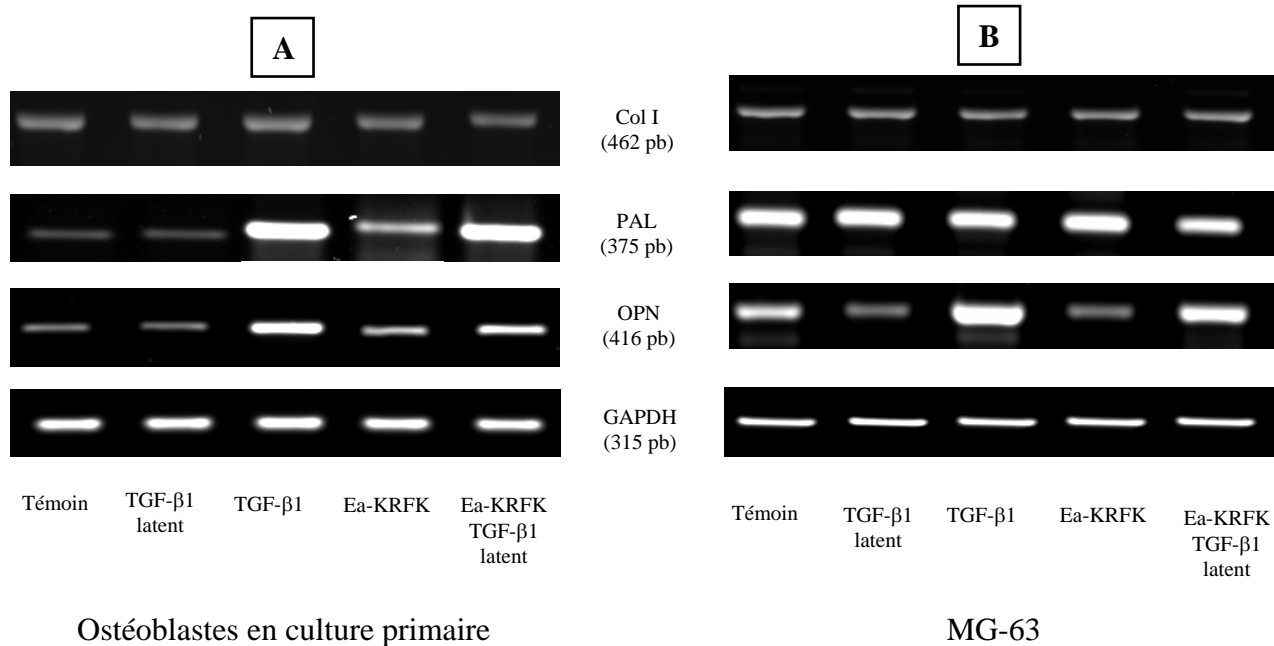


Figure 43 : Influence de l'association TGF-β1 latent/Ea-KRFK sur l'expression des gènes codant le COL I, la PAL et l'OPN dans les cellules osseuses humaines. Après 24 h de culture en présence de TGF-β1 latent (3 ng/ml) et/ou d'Ea-KRFK (5 μM) ou de TGF-β1 (3 ng/ml), les ARNs des ostéoblastes en culture primaire (A) et des MG-63 (B) sont extraits et l'expression des gènes est analysée par RT-PCR. COL I : collagène de type I ; PAL : phosphatase alcaline ; OPN : ostéopontine ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (gène de référence) ; pb : paire de bases.

3- Evaluation de la biocompatibilité d'un revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition

3-1 Caractérisation du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition

La technique d'électrodéposition permet d'élaborer des revêtements phosphocalciques déposés sur un alliage de titane (Ti6Al4V) à basse température, simplement à partir de solutions aqueuses contenant du calcium et du phosphore.

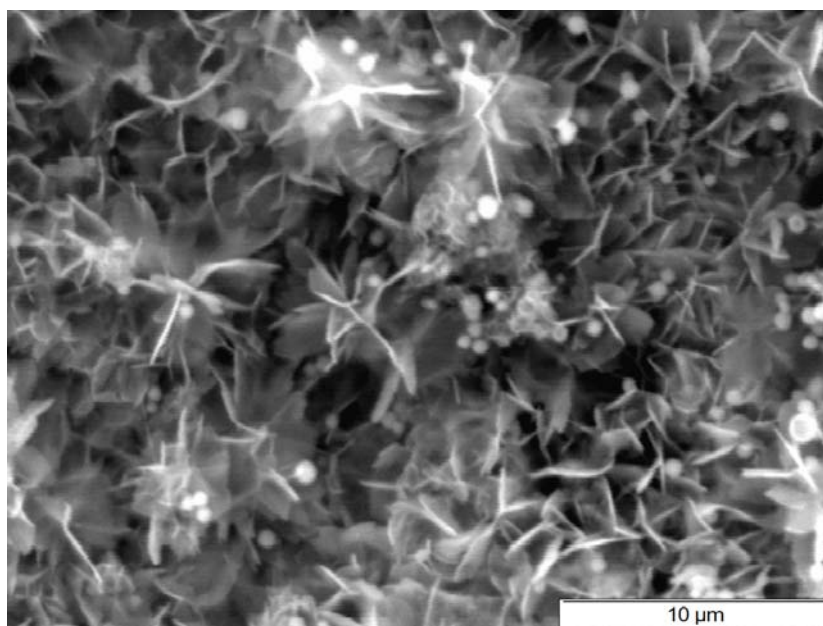
L'épaisseur, la porosité et la nature du revêtement peuvent être déterminées et contrôlées par la variation et la maîtrise des paramètres de l'électrodéposition comme la température, la densité de courant et la différence de potentiel.

L'électrodéposition du revêtement phosphocalcique sur le substrat Ti6Al4V a été menée à 60°C pendant 20 min avec une densité de courant de 5 mA/cm².

Après observation en MEB, dans ces conditions d'électrodéposition, le revêtement phosphocalcique présente deux morphologies différentes (figure 44 A et B). En effet, le revêtement phosphocalcique n'est pas homogène, il comporte des régions où sa morphologie est soit en forme d'aiguilles (figure 44 A) ou soit en forme de sphères (figure 44 B).

Les rapports Ca/P et l'épaisseur du revêtement pour chaque région ont été déterminés par MEB associée à la spectroscopie de dispersion d'énergie des photons X (MEB-EDXS). La mesure des intensités des pics de CaK α et PK α permet de déterminer les concentrations en calcium et phosphore et d'établir le rapport Ca/P. Dans les régions où la morphologie du revêtement phosphocalcique est en forme d'aiguilles, le rapport Ca/P calculé est de $1,48 \pm 0,09$ et l'épaisseur est de 1,9 μm . Pour les régions où la morphologie du revêtement est en forme de sphères, le rapport Ca/P calculé est de $1,51 \pm 0,1$ et l'épaisseur de 8,2 μm . Ces rapports de Ca/P correspondent à des hydroxyapatites déficientes en calcium pour les zones en aiguilles et sa phase amorphe pour les zones composées de sphères. Cette analyse a été confirmée par diffraction des rayons X (DRX) où le spectre de la figure 45 montre des pics de diffraction caractéristiques d'une hydroxyapatite déficiente en calcium.

A



B

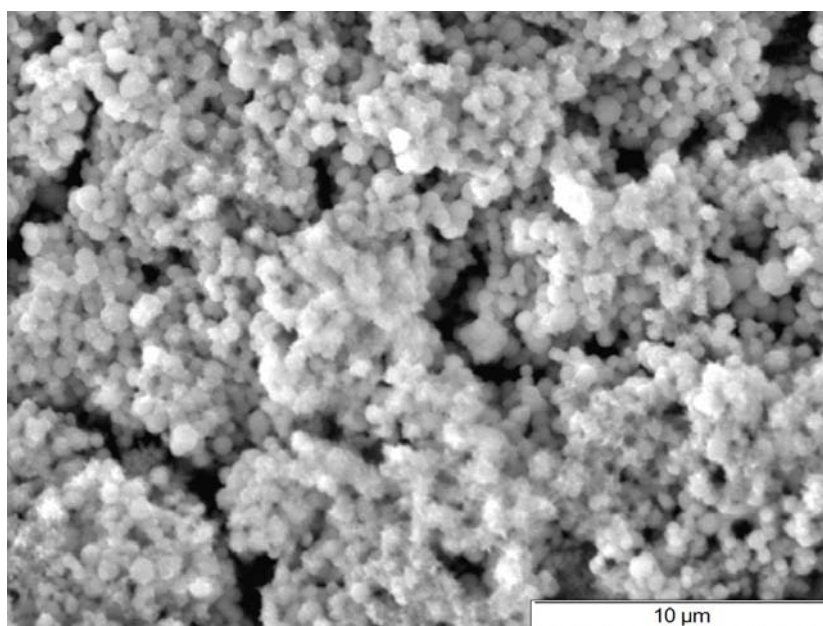


Figure 44 : Caractérisation morphologique du revêtement de phosphate de calcium électrodéposé avec une densité de courant 5 mA/cm². Il présente 2 types de morphologies : en aiguilles (A) et en sphères (B). Grandissement : X 3500

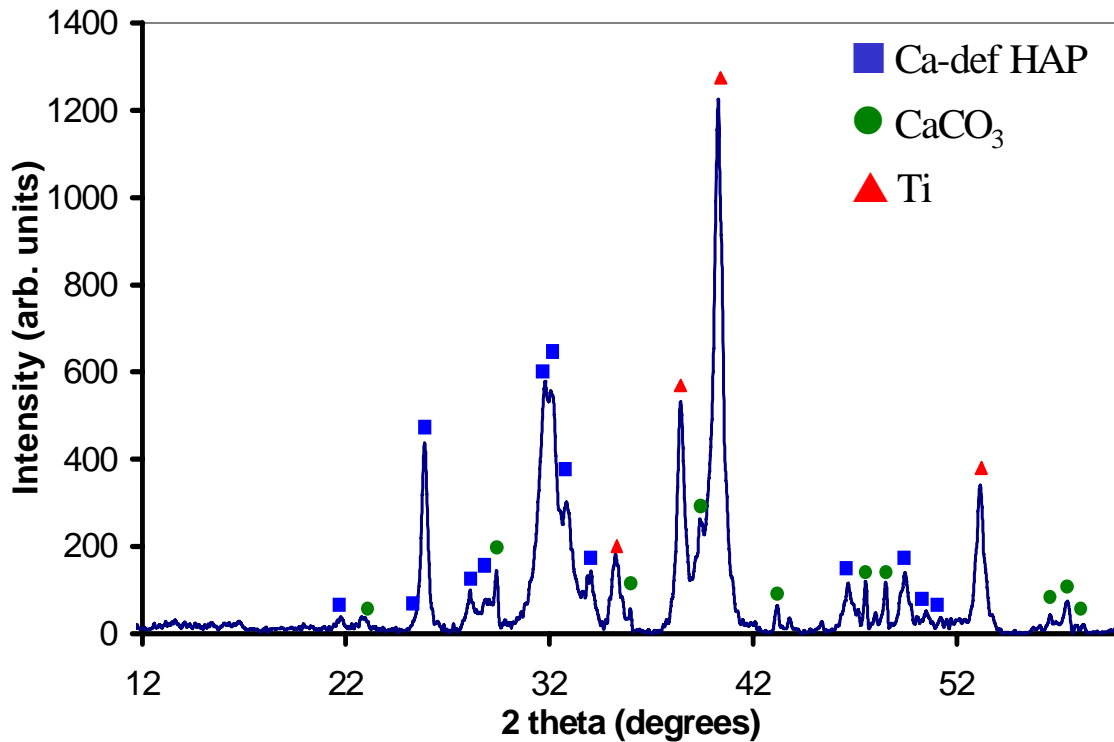


Figure 45 : Spectre de diffraction des rayons X du revêtement de phosphate de calcium. En ordonnées sont représentées les intensités des rayons X (unités internationales), en abscisses les angles θ . Les pics de diffraction sont représentatifs de l'alliage de titane utilisé comme substrat (Ti6Al4V), et du revêtement en forme d'aiguilles (Ca-def HAP) et en forme de sphères (CaCO₃).

3-2 Influence du revêtement phosphocalcique sur la viabilité et la prolifération des cellules MG-63

Afin d'évaluer la biocompatibilité du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition, celui-ci a été mis en culture avec les cellules MG-63 pendant une période de 28 jours. A différents points de l'étude cinétique, la viabilité et le nombre de cellules présentes sur le revêtement ont été déterminés.

La figure 46 ne montre pas de différences significatives entre la viabilité des cellules cultivées sur plastique (témoin) et celle des cellules cultivées sur le revêtement électrodéposé à chaque point de l'étude cinétique (7, 14, 21 et 28 jours). Ainsi, le revêtement électrodéposé ne semble pas avoir d'effet cytotoxique sur les cellules MG-63.

La figure 47 montre la cinétique de prolifération des cellules MG-63 cultivées sur le revêtement de phosphate de calcium (CaP) comparé à la prolifération des cellules MG-63 cultivées sur plastique (témoin). La prolifération des cellules MG-63 cultivées sur plastique augmente jusqu'au 21^{ème} jour de culture puis on observe une importante diminution du nombre de cellules au 28^{ème} jour. Lorsque les cellules MG-63 sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique, le nombre de cellules augmente également jusqu'au 21^{ème} jour de culture mais les cellules sont moins nombreuses que lorsque les cellules sont cultivées sur plastique. Au 28^{ème} jour, au contact du revêtement phosphocalcique, le nombre de cellules MG-63 diminue également comme dans le cas des cellules cultivées sur plastique mais de façon moindre.

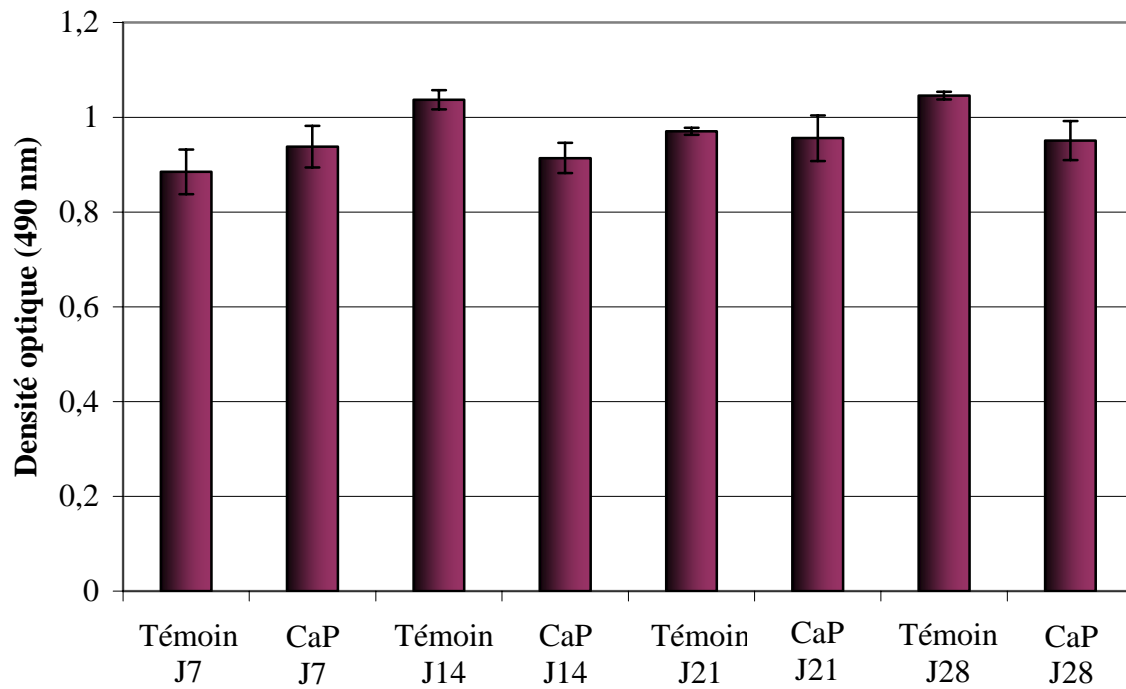


Figure 46 : Mesure de la viabilité des cellules MG-63 au contact du revêtement phosphocalcique pendant une période de 28 jours. Aux temps 7, 14, 21 et 28 jours, la viabilité a été évaluée par le test MTS. Les histogrammes représentent la moyenne de six mesures de DO à 490 nm. Un test de student a été effectué et ne montre pas de différences significatives ($p > 0,05$)

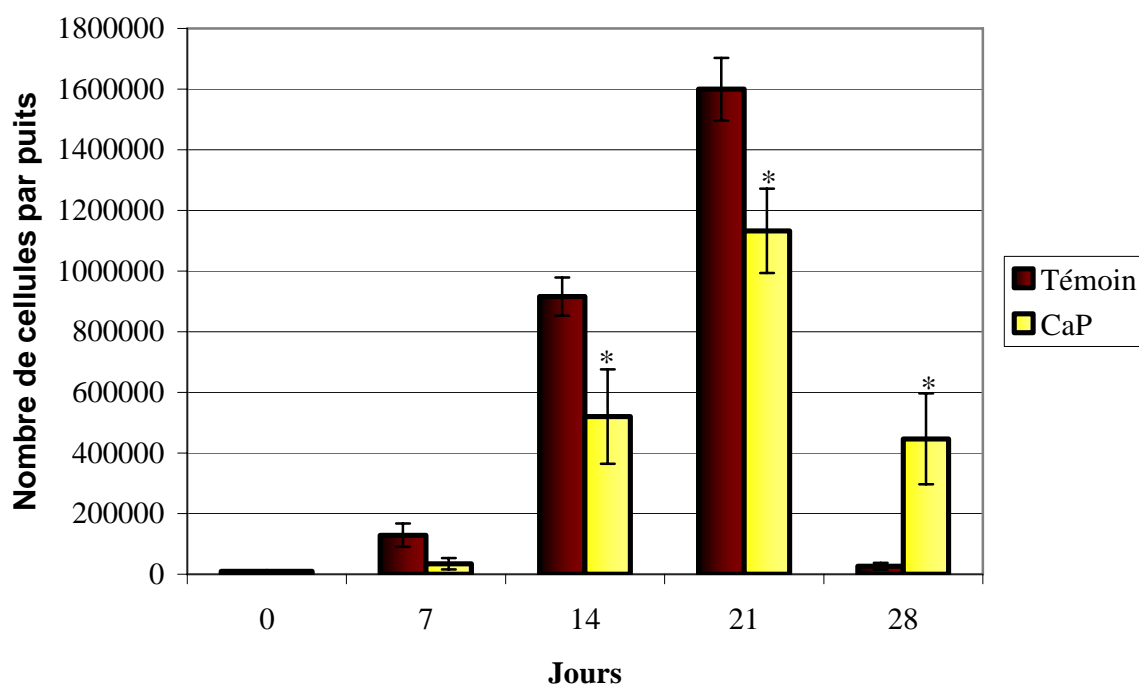


Figure 47 : Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur la prolifération des cellules MG-63. Les cellules MG-63 sontensemencées à la densité de 10000 cellules par puits en présence de revêtement (CaP) ou non (témoin). Aux temps 7, 14, 21 et 28 jours, les cellules sont trypsinisées et comptées. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences réalisées en triplicate \pm écart-type.

3-3 Etude morphologique des cellules MG-63 au contact du revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition

A chaque point de l'étude cinétique, afin de déterminer la réelle innocuité du revêtement envers les cellules osseuses, une étude morphologique de celles-ci a été menée par microscopie électronique.

Les figures 48 et 49 représentent la morphologie cellulaire des cellules MG-63 cultivées sur lamelles de thermanox[®] (témoin) aux temps 7, 14, 21 et 28 jours. Ainsi les cellules MG-63 après 7 jours de culture sur lamelles de thermanox[®] sont totalement étalées et aplaties sur toute leur surface, on distingue de nombreux contacts entre les cellules représentés par de fines extensions filopodiales (figure 48 A). Du 14^{ème} au 21^{ème} jour de culture, les cellules se disposent en multicouche, la surface cellulaire des cellules n'est plus distinguable (figure 48 B et 49 A). Au 28^{ème} jour, de nombreuses cellules rondes sont présentes sur la lamelle de thermanox[®], ce qui est un signe de souffrance cellulaire (figure 49 B).

Les figures 49 et 50, quant à elles, représentent la morphologie des cellules MG-63 cultivées sur le revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition. Ainsi dès 7 jours de culture sur ce revêtement, les cellules MG-63 ont une apparence beaucoup plus allongée que lorsque celles-ci sont cultivées sur des lamelles de thermanox[®]. Les cellules sont également moins nombreuses sur le revêtement à 7 jours que sur la lamelle de thermanox[®] (figure 50 A).

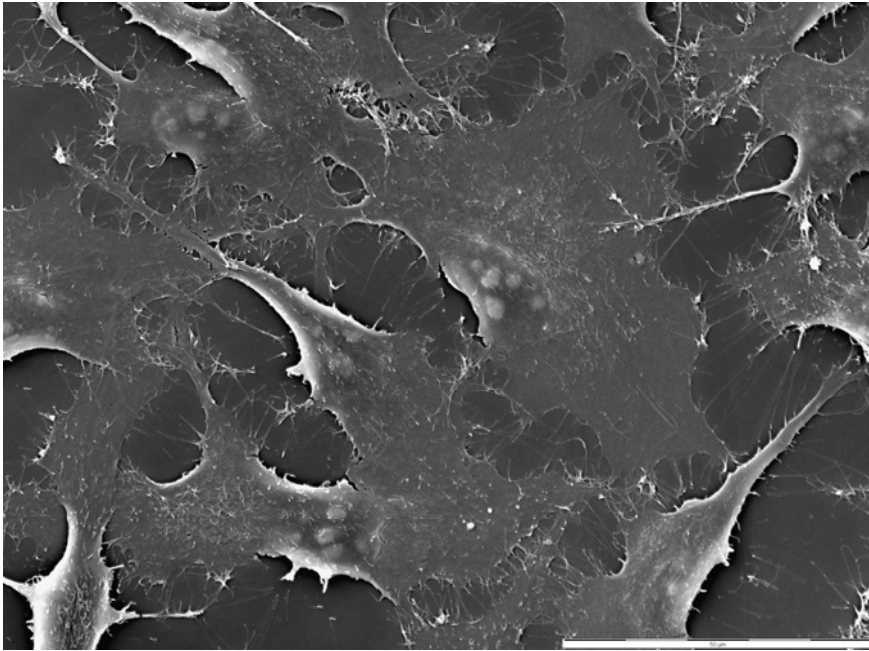
Au 14^{ème} jour de culture sur le revêtement phosphocalcique, les cellules MG-63 sont moins nombreuses que sur les lamelles de thermanox[®] mais se disposent tout de même en multicouches, le revêtement est encore visible sous les cellules. Les cellules MG-63 sont reliées entre elles et au revêtement par de fines extensions cellulaires (figure 50 B).

Au 21^{ème} jour, le nombre de cellules augmente mais celles-ci demeurent moins nombreuses sur le revêtement que sur la lamelle de thermanox[®]. Le revêtement est encore visible sous les cellules. Les cellules MG-63 présentent de nombreuses extensions cellulaires et sécrètent de la matrice extracellulaire visible à leur surface (figure 51 A).

Au 28^{ème} jour de culture, certaines cellules sont arrondies mais en proportion moindre par rapport aux cellules cultivées sur le thermanox[®] pendant 28 jours (figure 51 B).

Ainsi cette étude morphologique corrobore les études de prolifération et de viabilité cellulaire. En effet l'étude morphologique montre que les cellules sont capables de pousser normalement sur le revêtement phosphocalcique sans trace de toxicité de celui-ci envers les cellules MG-63. De plus les cellules sont moins nombreuses sur ce revêtement que dans des conditions de culture normales (sans revêtement, sur plastique destiné à la culture cellulaire) confirmant ainsi les résultats obtenus lors de l'étude de prolifération cellulaire.

A



B

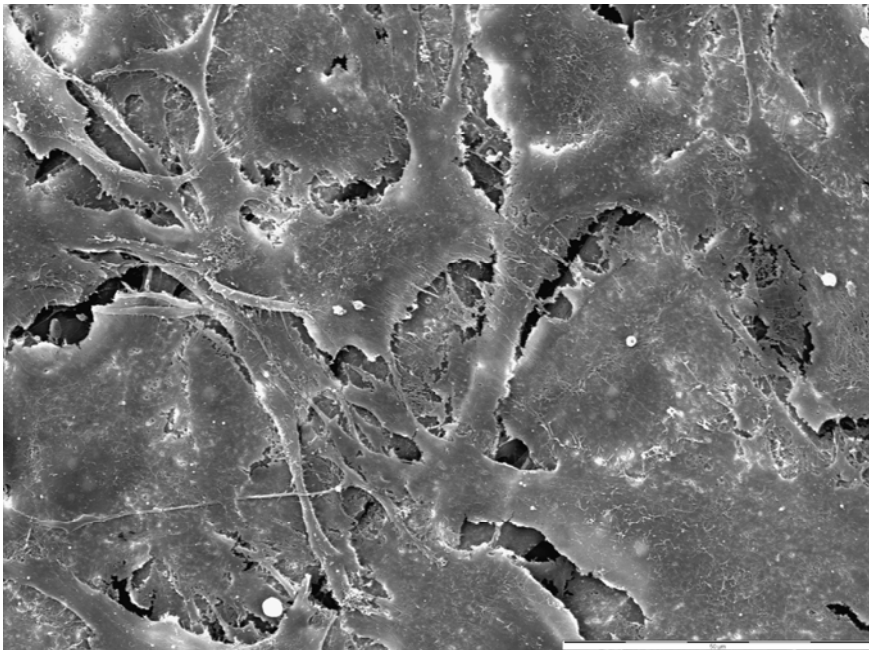
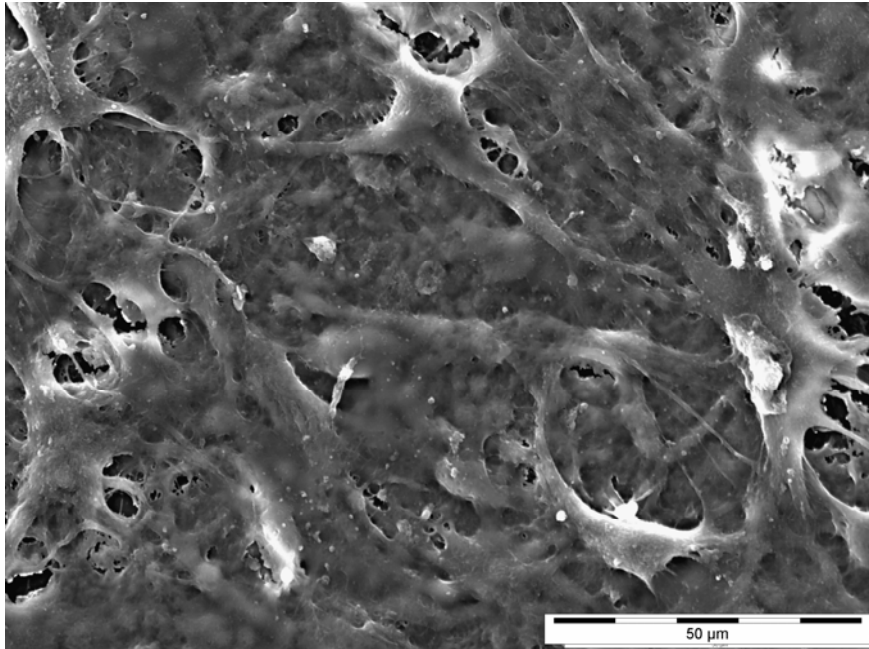


Figure 48 : Morphologie des cellules MG-63 cultivées sur lamelle de thermanox[®].

Les cellules MG-63 sont cultivées pendant 7 (A) et 14 jours (B) sur lamelle de thermanox[®] puis observées en MEB. Grandissement : X 750

A



B

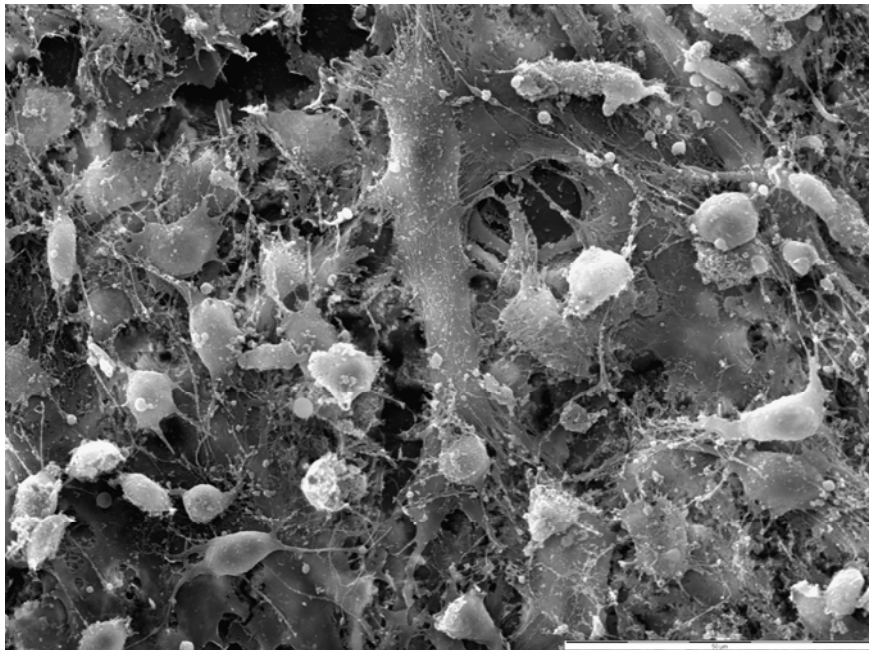
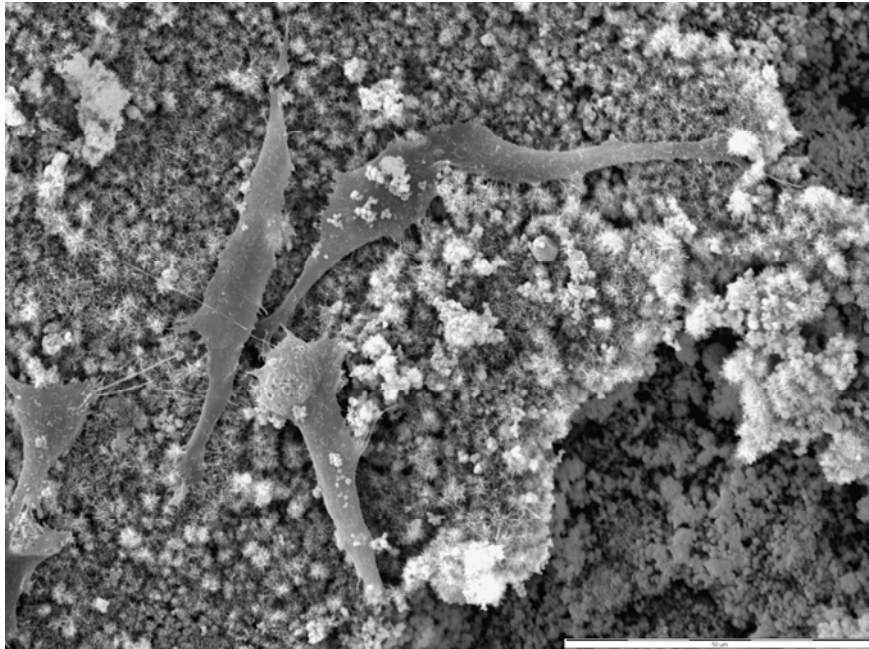


Figure 49 : Morphologie des cellules MG-63 cultivées sur lamelle de thermanox[®].

Les cellules MG-63 sont cultivées pendant 21 (A) et 28 jours (B) sur lamelle de thermanox[®] puis observées en MEB. Grandissement : X 750

A



B

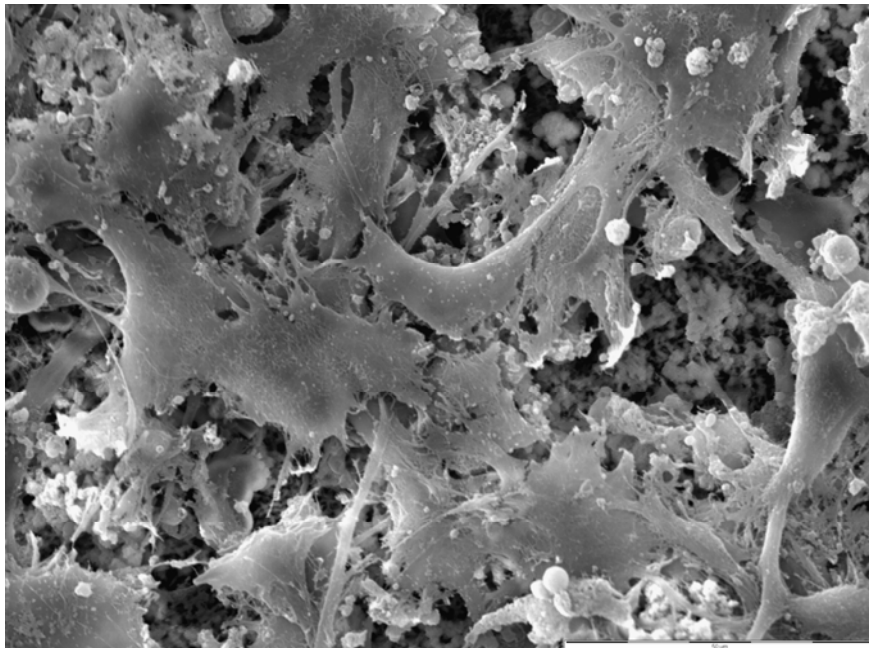
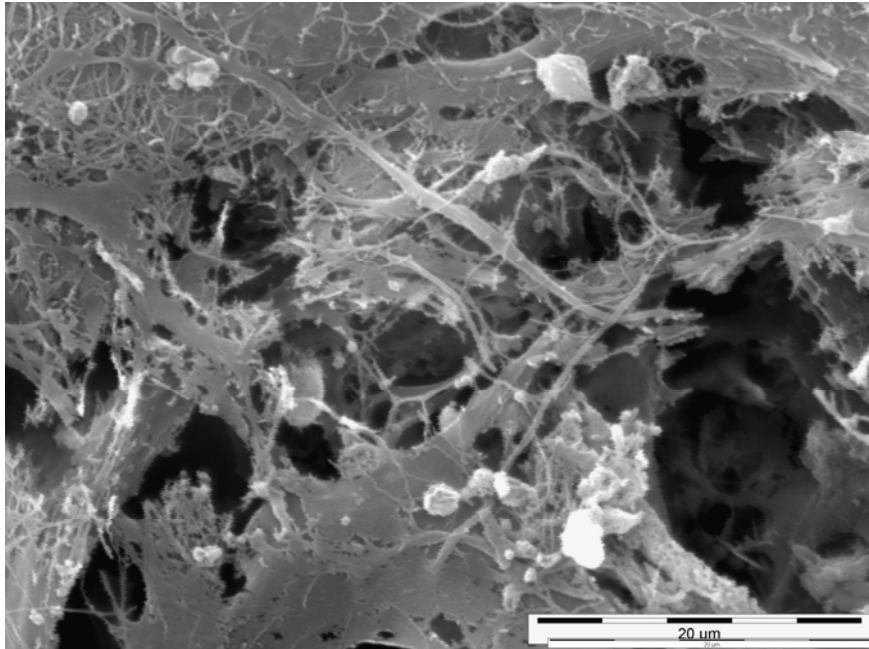


Figure 50 : Influence du revêtement phosphocalcique sur la morphologie des cellules MG-63. Les cellules MG-63 sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique pendant 7 (A) et 14 jours (B) puis observées en MEB. Grandissement : X 750

A



B

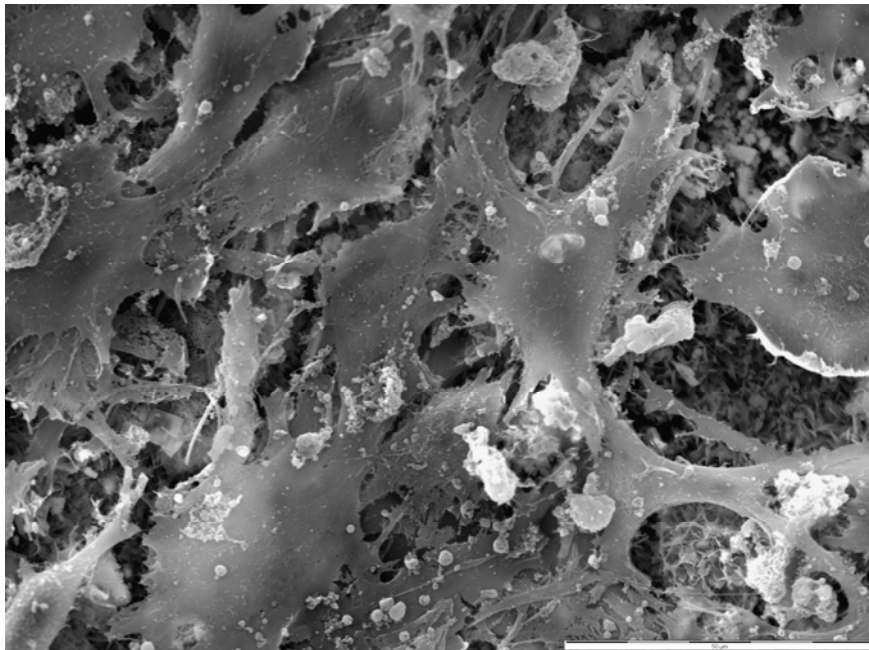


Figure 51 : Influence du revêtement phosphocalcique sur la morphologie des cellules MG-63. Les cellules MG-63 sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique pendant 21 (A) et 28 jours (B) puis observées en MEB. Grandissement : X 2000 (A) ; X 750 (B)

3-4 Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur le phénotype ostéoblastique des cellules MG-63

L'étude de la morphologie des cellules MG-63 ayant montré la présence d'une matrice extracellulaire plus développée lorsque les cellules sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique, une étude sur l'expression des gènes de la matrice extracellulaire osseuse dans les cellules MG-63 par la technique de RT-PCR a été menée afin de démontrer le potentiel différenciant du revêtement.

L'expression du gène du collagène de type I ne varie pas en fonction du temps quel que soit le support de culture cellulaire, c'est à dire plastique destiné à la culture cellulaire ou revêtement phosphocalcique (figure 52).

Par contre, le niveau d'expression du gène de la phosphatase alcaline est stimulé lorsque les cellules sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique au 21 et 28^{ème} jour de culture (figure 52).

Le gène du marqueur terminal de la différenciation osseuse, l'ostéocalcine, est quant à lui stimulé aux temps 7, 14 et 21 jours lorsque les cellules MG-63 sont cultivées sur le revêtement phosphocalcique (figure 52). Au 28^{ème} jour de culture en présence ou non du revêtement, le niveau d'expression du gène de l'ostéocalcine est légèrement diminué.

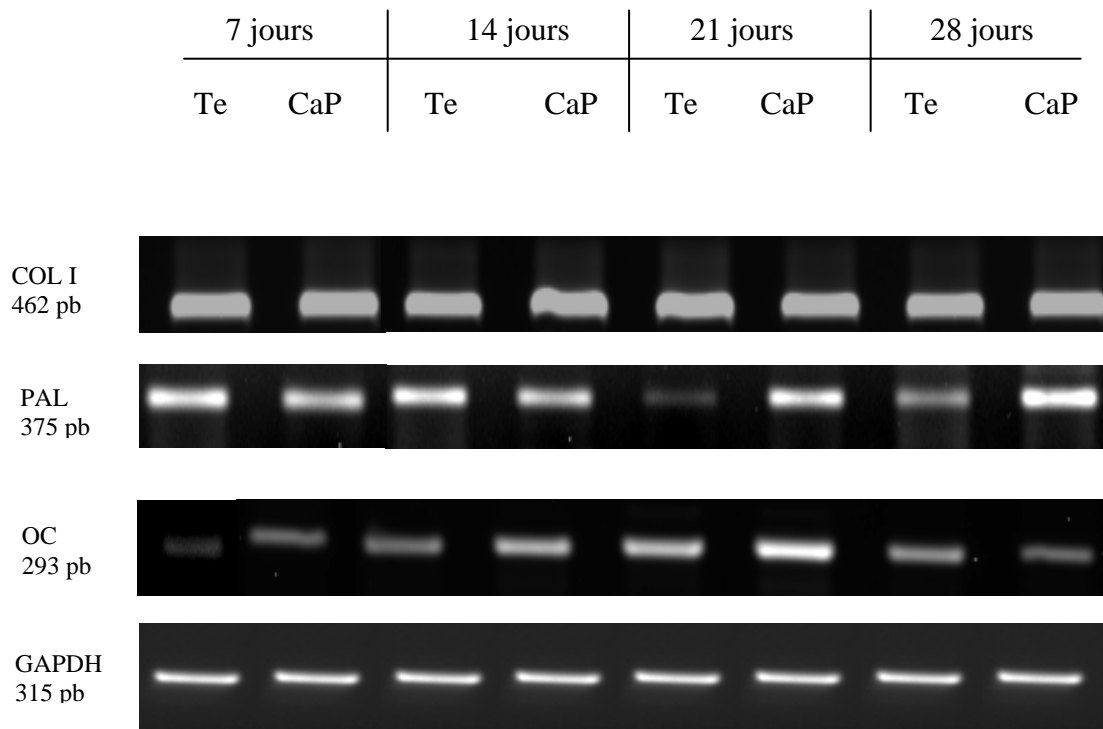


Figure 52 : Influence du revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition sur l'expression de gènes de la matrice osseuse dans les cellules MG-63. Les cellules MG-63 sont cultivées pendant 7, 14, 21 et 28 jours sur plastique (Te) ou sur le revêtement de phosphate de calcium (CaP). A chaque temps, les ARNs sont extraits et l'expression des gènes est analysée par la technique de RT-PCR. COL I : Collagène de type I, PAL : phosphatase alcaline, OC : ostéocalcine, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (gène de référence) ; pb : paire de bases.

IV- DISCUSSION

L'objectif à long terme du laboratoire, est de réaliser des biomatériaux fonctionnalisés qui, une fois implantés en site osseux, seront dotés de propriétés biologiques favorisant la régénération osseuse en agissant sur les ostéoblastes environnant l'implant. Pour réaliser ce projet, nous avons choisi d'incorporer un lipopeptide, Ea-KRFK, activateur du TGF- β 1 latent et inhibiteur de certaines MMPs dans un système particulaire incorporé à un biomatériau. Toutefois, avant d'en arriver à ce but ultime, il nous est apparu judicieux d'étudier les effets à long terme du TGF- β 1 actif afin de déterminer à quel moment le système particulaire devrait libérer le lipopeptide activateur du TGF- β 1 latent pour qu'il ait un effet maximal sur la croissance osseuse. Puis, nous avons vérifié la réelle capacité du lipopeptide Ea-KRFK à activer le TGF- β 1 latent dans un système de cellules osseuses humaines. Et enfin nous avons évalué *in vitro* la biocompatibilité du matériau choisi, un revêtement de phosphate de calcium électrodéposé sur un alliage de titane TiAl6V4.

1- Etude cinétique des effets du TGF- β 1 sur les cellules osseuses humaines en culture

Les actions du TGF- β 1 sur la formation osseuse restent incertaines à cause de ses effets divergents qui ont été rapportés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* en fonction des conditions expérimentales, de l'espèce, du lieu d'origine et du stade de maturité des cellules ostéoblastiques [Iimura et al., 1994 ; Long et al., 1995].

Ainsi, dans notre modèle d'ostéoblastes humains en culture primaire, dans le cadre d'une étude menée sur 28 jours, le TGF- β 1 à la concentration de 3 ng/ml stimule la prolifération cellulaire et augmente de ce fait le pool d'ostéoblastes. La même étude a été effectuée sur une lignée de type "d'ostéoblastes-like" issus d'ostéosarcome humain, les cellules MG-63. Dans ce cas, le TGF- β 1 a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature : en effet, le TGF- β 1 stimule la prolifération cellulaire des cellules ostéoblastiques non transformées murines ou des ostéoblastes en culture primaire issues de chirurgies mandibulaires [Noda et Rodan, 1986 ; Reyes-Botella et al., 2002]. Ainsi, il apparaît logique que le TGF- β 1 induise la prolifération des ostéoblastes humains en culture primaire. Les résultats obtenus sur la prolifération des cellules MG-63 sont également en accord avec ceux décrits dans la littérature [Pfeilschifter et

al., 1987]. Ces différences observées sur la prolifération des cellules humaines de type ostéoblastique peuvent s'expliquer par des variations d'expression de certaines cyclines, de certaines kinases dépendantes des cyclines ou de protéines inhibitrices des cyclines contrôlant la progression des cellules dans les différentes phase du cycle cellulaire, par exemple le passage de la phase G1 à S de l'interphase [Gurlek et Kumar, 2001]. Les variations d'expression de ces différentes protéines seraient sous le contrôle des Smads, protéines impliquées dans la transduction du signal du TGF- β 1, qui peuvent activer ou inhiber des gènes spécifiques [Nishimori et al., 2001].

L'étude de la morphologie cellulaire des ostéoblastes en culture primaire confirme l'étude de la prolifération. En effet, en l'absence de TGF- β 1 les cellules arrivent à confluence au 14^{ème} jour de culture et sécrètent une matrice extracellulaire bien visible seulement au 21^{ème} jour. Au terme de l'étude morphologique, c'est-à-dire après 28 jours de culture, la matrice extracellulaire est bien présente mais n'empêche pas toutefois de distinguer les cellules. Par contre en présence de TGF- β 1, les ostéoblastes en culture primaire présentent une morphologie différente de celle des cellules témoins dès le 4^{ème} jour. La production de matrice apparaît dès le 7^{ème} jour de culture et devient de plus en plus présente jusqu'au terme de la période de culture (28 jours) ne permettant plus de distinguer les cellules. Ainsi, dans notre modèle d'ostéoblastes en culture primaire, le TGF- β 1 stimule la prolifération et la production de matrice extracellulaire.

Dans le cas des cellules MG-63, l'étude morphologique ne montre pas la production de matrice extracellulaire en présence ou en absence de TGF- β 1, à la différence des ostéoblastes en culture primaire. En présence de TGF- β 1, on note un changement dans l'organisation des cellules : elles forment un réseau avec des mailles en nid d'abeille qui s'élargissent avec le temps, les cellules n'atteignant pas de ce fait la confluence. Des cellules de calvaria de rats fœtaux, traitées par le TGF- β 1 pendant leur phase proliférative, montrent également une morphologie différente, plus étalée qu'en l'absence de TGF- β 1 [Breen et al., 1994]. Lomri et Marie [1990] ont montré dans un système d'ostéoblastes murins que le TGF- β 1 affectait certaines protéines du cytosquelette comme l'actine, l' α -actinine ou encore la vimentine, et induisait un changement morphologique. Ainsi dans les cellules MG-63, le TGF- β 1 a un effet inhibiteur sur la prolifération et cet effet est accompagné d'un changement de morphologie cellulaire certainement dû à une réorganisation des protéines du cytosquelette.

A priori dans notre modèle d'ostéoblastes en culture primaire, le TGF- β 1 influencerait non seulement la prolifération cellulaire mais aussi la différenciation puisqu'on remarque

l'apparition d'une matrice extracellulaire lorsque la confluence des cellules est atteinte ce qui démontre la progression des cellules vers un phénotype de plus en plus avancé.

Ainsi nous avons étudié la cinétique d'expression des gènes de protéines de la matrice osseuse. Dans notre modèle d'ostéoblastes humains en culture primaire, dans des conditions de culture basales, on ne note pas de variation dans l'expression du gène du COL I, à la différence du modèle d'ostéoblastes humains décrit par Siggelkow et al. [1999], où le gène du COL I est réprimé quand la confluence est atteinte. De même, il a été montré que le TGF- β 1 induisait le gène et la production du COL I [Wrana et al., 1988], toutefois dans notre modèle cellulaire et avec nos conditions de culture cellulaire, nous ne notons pas de différence d'expression de ce gène, même lorsque la confluence est atteinte. De même, une étude menée dans une lignée d'ostéosarcome humain, HOS 58, n'a montré aucune différence d'expression du gène du COL I dans des conditions basales [Siggelkow et al., 2002]. Cependant, même si nous ne notons pas de différence d'expression du gène du COL I au cours du temps, l'étude immunohistochimique réalisée avec notre modèle montre une augmentation du marquage du COL I avec le temps et l'apparition d'une matrice extracellulaire collagénique en présence de TGF- β 1. Cette différence observée au niveau du marquage entre les conditions de culture témoins et en présence de TGF- β 1 qui ne se retrouve pas dans l'étude d'expression du gène du COL I pourrait être imputée à des différences post-transcriptionnelles et traductionnelles de ce gène.

Nous avons également étudié la cinétique d'expression du gène de la PAL : celui-ci dans les conditions témoins suit le profil d'expression décrit par Lian et Stein en 1992. En effet, il est fortement exprimé pendant la phase de prolifération puis il est réprimé dès l'arrêt de la prolifération et est fortement exprimé pendant la phase de maturation de la matrice, qui subit des modifications dans sa composition et sa structure qui la rendent compétente pour la minéralisation, et enfin il est de nouveau inhibé à la fin de la phase de maturation matricielle et pendant la phase de minéralisation [Lian et Stein, 1992]. Nous avons choisi d'utiliser des conditions de culture basales, c'est-à-dire sans addition de facteurs permettant la minéralisation de la matrice osseuse comme le β glycérophosphate par exemple, afin de ne montrer que les effets propres du TGF- β 1 sur les cellules osseuses humaines. Ainsi il est tout à fait logique de ne pas observer l'inhibition du gène de la PAL à la fin de l'étude cinétique puisque les cellules ne sont pas entrées dans la phase de minéralisation. Le TGF- β est considéré comme un inducteur de la maturation de la matrice en diminuant le niveau d'expression du gène de la PAL [Lomri et Marie, 1990]. Dans notre modèle d'ostéoblastes

humains en culture primaire, en présence de TGF- β 1, le niveau d'expression du gène de la PAL varie. Toutefois, celui-ci est inhibé du 14 au 28^{ème} jour de culture suggérant ainsi que le TGF- β 1 induit la différenciation des ostéoblastes en culture primaire puisqu'à la fin de l'étude de la cinétique, les cellules se trouvent dans la phase de maturation de la matrice en l'absence de TGF- β 1 ; par contre en présence de celui-ci, les cellules se trouveraient à la fin de la phase de maturation de la matrice.

Le profil d'expression du gène de l'OPN dans notre modèle d'ostéoblastes humains en culture primaire, en l'absence de TGF- β 1, suit également le profil décrit par Lian et Stein, à savoir qu'il est stimulé pendant la phase de prolifération puis réprimé pendant la phase de post-prolifération et est ensuite augmenté à la fin de la phase de maturation de la matrice et au début de la minéralisation. En présence de TGF- β 1, le profil d'expression du gène demeure inchangé ; toutefois son intensité est stimulée. La sécrétion d'OPN a été également étudiée dans notre modèle d'ostéoblastes en culture primaire : celle-ci reste constante au début de la phase de prolifération puis est augmentée en fonction du temps. Une forte augmentation de sécrétion d'OPN a lieu entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de culture, cette augmentation du niveau de la protéine est due à l'augmentation de l'expression du gène de l'OPN observée au 4^{ème} jour de culture. Ensuite le gène est réprimé pour n'être que faiblement stimulé au 28^{ème} jour de culture ce qui se traduit par un ralentissement de la vitesse de sécrétion de l'OPN qui augmente toutefois avec le temps. En présence de TGF- β 1, la sécrétion d'OPN est également augmentée en fonction du temps. Cette observation est en accord avec une étude menée sur les cellules ROS 17/2.8 (rat) à 4 jours de culture par Noda et al. [1988] où le TGF- β 1 stimule l'ARNm de l'OPN et la sécrétion de la protéine. L'ARNm de l'OPN est également stimulé dans les cellules MC3T3-E1 (souris). De même, dans ces cellules, le promoteur de l'OPN est stimulé par le TGF- β 1 [Hullinger et al., 2001]. Nous avons également étudié la sécrétion de l'OPN dans la lignée MG-63 et nous retrouvons, à 4 jours, la stimulation de sécrétion de l'OPN par le TGF- β 1 suggérant ainsi que la stimulation de l'OPN par le TGF- β 1 peut se généraliser à toutes les cellules de type ostéoblastique.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la cinétique d'expression du gène de l'OC, marqueur terminal de la différenciation ostéoblastique. Celui-ci n'apparaît dans les conditions témoin qu'au 14^{ème} jour où il est très faiblement exprimé, puis il reste présent jusqu'au 28^{ème} jour. Dans notre modèle, le TGF- β 1 inhibe le gène de l'OC, ceci est en corrélation avec l'étude menée par Breen et al. [1994] qui montrent que le TGF- β 1 est un inhibiteur de la différenciation terminale des ostéoblastes (calvaria de rat fœtaux). Dans différents modèles

d'ostéoblastes murins, le TGF- β induit la répression de Cbfa-1 par l'action de Smad3 ce qui aboutit à une diminution de l'expression d'OC et à une inhibition de la différenciation terminale des ostéoblastes. Ainsi, on peut supposer qu'un tel mécanisme soit impliqué dans notre modèle d'ostéoblastes humains en culture primaire [Alliston et al., 2001].

Parallèlement à l'étude des marqueurs phénotypiques des ostéoblastes, nous avons également étudié les effets du TGF- β 1 sur le profil d'expression de différentes MMPs et de leurs inhibiteurs, les TIMP-1 et -2. Le TGF- β 1 est capable d'inhiber la MMP-1 dans des cultures de fibroblastes dermiques [Cauchard et al., 2004] et la MMP-3 dans des cellules endométriales [Bruner-Tran et al., 2002]. En conséquence, le TGF- β 1 exerce divers effets sur l'expression des différentes MMPs selon les types cellulaires. Dans notre modèle d'ostéoblaste en culture primaire, le TGF- β 1 stimule la sécrétion de la MMP-1 et de la MMP-3 et l'expression du gène de la MMP-13 dans les temps précoces de l'étude cinétique. Puis lorsque les ostéoblastes en culture primaire avancent dans leur stade de maturation et produisent une matrice collagénique, le TGF- β 1 exerce un effet inhibiteur sur ces MMPs. Concernant les inhibiteurs de ces MMPs, les TIMP-1 et -2, ils sont exprimés dans les ostéoblastes en culture primaire. La sécrétion de TIMP-1, dans les conditions de culture témoins, est augmentée pendant la phase de prolifération et de production de la matrice osseuse puis est légèrement diminuée. Le TGF- β 1 augmente la sécrétion de TIMP-1 par rapport aux conditions témoins dans les ostéoblastes en culture primaire. La sécrétion du TIMP-2, quant à elle, est diminuée en fonction du temps dans les conditions de culture témoins permettant ainsi aux MMPs de remodeler la matrice osseuse en vue de la rendre compétente pour la minéralisation ou pour entamer le processus de résorption osseuse. Par contre, en présence de TGF- β 1, cette sécrétion est diminuée en fonction du temps mais reste supérieure à celle quantifiée dans les conditions de culture témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux démontrés dans des ostéoblastes en culture primaire de rat où le TGF- β 1 diminue la quantité d'ARNm et la sécrétion de la MMP-13 tout en augmentant l'expression du TIMP-1 [Rydziel et al., 1997]. L'inhibition de l'expression des collagénases, de la stromélysine et l'augmentation de la sécrétion de leurs inhibiteurs dans notre modèle d'ostéoblastes en culture primaire, en présence de TGF- β 1, suggèrent un rôle important de ce facteur dans la préservation de la matrice collagénique et l'inhibition de la résorption osseuse.

Le TGF- β 1 n'induit pas les mêmes effets sur les MMPs et leurs inhibiteurs dans les cellules MG-63. En effet, le TGF- β 1 augmente la sécrétion de la MMP-1 et du TIMP-1 de façon dépendante du temps, ainsi que la sécrétion de MMP-3 qui est supérieure à celle

obtenue dans les conditions de culture témoins. Par contre, il n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion du TIMP-2. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cellules MG-63 en présence de TGF- β 1 produisent peu de matrice extracellulaire et s'organisent en formant des réseaux avec des mailles en nid d'abeilles, nécessitant peut-être l'action de ces MMPs.

2- Activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK dans un modèle d'ostéoblastes humains

La deuxième partie de ce travail a été de démontrer la capacité du lipopeptide Ea-KRFK à activer la petite forme latente du TGF- β 1 dans un système ostéoblastique. Nous avons choisi d'utiliser deux modèles cellulaires : des ostéoblastes humains en culture primaire et la lignée MG-63 issue d'ostéosarcome humain. Le fait d'utiliser deux systèmes cellulaires nous permettra de généraliser l'efficacité du lipopeptide à activer le TGF- β 1 latent dans les ostéoblastes humains.

Le lipopeptide Ea-KRFK est un composé bifonctionnel composé d'un acide gras, l'acide élaïdique, lié de manière covalente au peptide KRFK, séquence présente dans la thrombospondine de type I. L'acide élaïdique est un acide gras à 18 atomes de carbone comportant une double liaison trans en position 9 : c'est donc l'isomère trans de l'acide oléique. Cet acide est capable *in vitro* d'inhiber l'activité des gélatinases en se liant à leur domaine de fibronectine de type II [Berton et al., 2001]. Il n'est pas cytotoxique dans un modèle de fibroblastes dermiques [Berton, 2000] et stimule même leur prolifération avec des concentrations allant de 1 à 50 μ M. Dans les cellules MG-63 et SaOS-2, un autre acide gras, l'acide linoléique, ne présente pas d'effets cytotoxiques et augmenterait l'activité phosphatase alcaline et stimulerait ainsi la formation osseuse [Cusack et al., 2005]. Dans un modèle d'ostéoblastes murins, les cellules MC3T3-E1, un autre acide gras : l'acide éicosapenténoïque augmente également l'activité phosphatase alcaline et le niveau d'ostéocalcine [Watkins et al., 2001], suggérant ainsi un rôle important des acides gras dans le métabolisme osseux. Dans nos deux modèles d'ostéoblastes humains, l'acide élaïdique n'induit pas de changements significatifs de la prolifération ni de la morphologie cellulaire, dans les concentrations utilisées (0,5 à 25 μ M). A la dose de 5 μ M pendant 24 h, il inhibe la sécrétion de la MMP-1 et de la MMP-3 dans nos deux modèles de cellules osseuses et il augmente la sécrétion du TIMP-1 dans les cellules MG-63. Donc cet acide gras aurait un effet bénéfique sur la formation osseuse en inhibant les MMPs-1 et -3 et en augmentant le TIMP-1 puisque la

dégradation de la matrice extracellulaire est dépendante de la balance entre les différentes MMPs et leurs inhibiteurs. De ce fait, l'utilisation d'un composé bifonctionnel comportant cet acide gras dans un modèle d'ostéoblastes humains pourrait influencer la formation osseuse, propriété recherchée pour l'élaboration d'un biomatériau fonctionnalisé.

Le lipopeptide Ea-KRFK a donc été mis en présence des deux types cellulaires en culture. Nous avons choisi de cultiver les cellules sans sérum afin de limiter l'apport exogène de TGF- β 1, qui pourrait masquer l'effet de l'activation du TGF- β 1 latent. De ce fait nous avons choisi de travailler sur des périodes de culture courtes (24 h), les cellules étant très sensibles à la privation de sérum. De même, la quantité de TGF- β 1 latent sécrétée par les cellules dans ces conditions de culture étant très faibles, nous ne pouvons remarquer l'action du lipopeptide qu'en ajoutant du TGF- β 1 latent exogène dans la culture.

Dans les ostéoblastes en culture primaire et dans les cellules MG-63, l'association du lipopeptide Ea-KRFK avec le TGF- β 1 latent provoque une augmentation de la prolifération cellulaire après 24h de traitement comparable à celle obtenue en présence de TGF- β 1. L'acide élaïdique, le TGF- β 1 latent et le lipopeptide seuls n'ont pas d'effet significatif sur la prolifération des cellules. Ceci nous laisse suggérer que la stimulation de la prolifération cellulaire observée avec l'association lipopeptide et TGF- β 1 latent est imputable à une activation du TGF- β 1 latent par ce lipopeptide d'autant que l'association reproduit les effets du TGF- β 1 seul. Cependant l'effet de cette association est moins marqué en ce qui concerne les cellules MG-63, ce qui n'est pas surprenant puisque la première partie de ce travail a montré un très léger effet stimulateur du TGF- β 1 sur la prolifération à 24 h comparativement à l'effet observé après 24 h sur la prolifération des ostéoblastes en culture primaire.

Le dosage du TGF- β 1 sécrété par les deux types cellulaires a démontré la réelle capacité du lipopeptide Ea-KRFK à activer le TGF- β 1 latent. Le lipopeptide seul n'augmente pas de manière significative la production de TGF- β 1 par les cellules mais ceci est dû à une production insuffisante de TGF- β 1 latent avec des conditions de culture sans sérum. En ajoutant du TGF- β 1 latent exogène dans la culture, le lipopeptide augmente significativement la quantité de TGF- β 1 montrant ainsi l'efficacité de ce lipopeptide dans les ostéoblastes.

La partie peptidique du lipopeptide a été montrée comme étant la séquence qui interagit avec la séquence LSKL du LAP permettant l'activation du TGF- β 1 latent [Schultz-Cherry et al., 1995 ; Ribeiro et al., 1999]. De plus, un lipopeptide comparable au lipopeptide Ea-KRFK, le lipopeptide Ea-KFK, active le TGF- β 1 latent dans un modèle de

fibroblastes dermiques humains. Cette effet sur le TGF- β 1 latent entraîne une inhibition de l'activité des MMPs-1 et -3 et stimule l'expression du TIMP-1 [Cauchard et al., 2004]. Dans nos modèles d'ostéoblastes humains, l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK provoque également une modulation de l'expression des MMPs et des TIMPs. Dans les 2 types cellulaires utilisés lors de l'étude, l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide stimule l'expression de la MMP-1 et de la MMP-3. Toutefois l'association du TGF- β 1 latent avec le lipopeptide Ea-KRFK ne reproduit pas totalement les effets du TGF- β 1 suggérant ainsi que le lipopeptide n'est cependant pas capable d'activer tout le TGF- β 1 latent exogène. L'effet du TGF- β 1, dans les cellules MG-63, sur la MMP-3 ne correspond pas à celui observé dans la première partie de notre travail (une diminution de l'expression), toutefois il faut noter que les conditions de culture sont différentes puisque l'étude cinétique a été réalisée en présence de sérum alors que l'étude du lipopeptide est réalisée sans sérum ce qui peut changer le comportement des cellules.

Nos résultats obtenus avec l'association lipopeptide/TGF- β 1 latent dans les deux types d'ostéoblastes humains semblent être en désaccord avec l'effet observé sur les MMPs-1 et -3 dans le modèle de fibroblastes dermiques humains. Toutefois les conditions de culture utilisées par Cauchard et al. [2004] sont différentes de celles utilisées dans notre étude : en effet, l'inhibition de l'expression des MMPs-1 et-3 dans les fibroblastes dermiques humains est observée en présence d'ester de phorbol dans la culture. Dans les fibroblastes dermiques, le TGF- β 1 a peu d'influence sur les niveaux d'expression des MMPs-1 et -3 dans des conditions basales, par contre lorsque celles-ci sont activées par un ester de phorbol le TGF- β 1 inhibe leur expression. Dans nos modèles de culture cellulaire, nous ne traitons pas les cellules par un ester de phorbol, ne permettant pas l'induction des MMPs-1 et -3 ; ainsi nous n'observons pas d'inhibition de l'expression de ces MMPs.

L'expression du TIMP-1 est augmentée seulement dans les cellules MG-63 par l'association du TGF- β 1 latent et du lipopeptide Ea-KRFK, l'expression du TIMP-2 est quand à elle stimulée par cette association seulement dans les ostéoblastes en culture primaire. Dans l'étude menée par Cauchard et al. [2004], l'expression du TIMP-1 est également augmentée par l'association du lipopeptide Ea-KRFK et du TGF- β 1 latent alors que l'expression du TIMP-2 demeure inchangée. Cette différence vient du fait que le TGF- β 1 n'a pas d'effet sur l'expression du TIMP-2 dans les fibroblastes dermiques humains alors qu'il stimule l'expression du TIMP-2 dans les ostéoblastes humains.

Donc l'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK, en modulant l'expression des MMPs-1 et -3 et des TIMP-1 et -2, est capable de moduler le remodelage osseux. Toutefois après 24 h de culture, nous ne sommes pas capables de nous prononcer sur le fait que cette activation conduise à une augmentation de la formation ou de la résorption osseuse puisque dans nos modèles d'ostéoblastes humains, l'expression des MMPs-1 et -3 est augmentée.

L'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK est capable d'influencer la formation osseuse puisqu'elle stimule, et ce de manière comparable au TGF- β 1, l'expression du gène de l'OPN dans les 2 types cellulaires et celle du gène de la PAL dans les ostéoblastes en culture primaire seulement. Ceci peut s'expliquer par le fait que le TGF- β 1 stimule la production de la PAL dans les cellules à un stade de maturité assez avancé alors qu'il n'aurait pas d'effet ou aurait un effet inhibiteur sur la PAL dans des cellules moins matures [Centrella et al., 1994 ; Centrella et al., 1987]. Les cellules MG-63 étant considérées comme des ostéoblastes immatures, la différence de réponse entre les 2 types cellulaires peut s'expliquer par une différence de stade de maturité des cellules.

Toutefois en reproduisant les effets du TGF- β 1 sur les ostéoblastes humains, nous avons montré pour la première fois que le lipopeptide Ea-KRFK active le TGF- β 1 latent dans des ostéoblastes humains en culture primaire et dans la lignée MG-63. Bien que l'effet du TGF- β 1 soit différent d'une lignée à l'autre, nos résultats permettent de généraliser l'effet activateur du lipopeptide quelle que soit l'origine des cellules ostéoblastiques.

De plus le lipopeptide Ea-KRFK semble avoir une action sur le remodelage osseux car il provoque une augmentation des gènes de la PAL et de l'OPN et une inhibition du gène de la MMP-1 dans les ostéoblastes en culture primaire. Dans les cellules MG-63, le lipopeptide Ea-KRFK diminue l'expression de la MMP-3 et augmente celle du TIMP-1 jouant ainsi un rôle sur la formation osseuse. Ces résultats suggèrent que le lipopeptide Ea-KRFK jouerait un rôle positif sur la formation osseuse validant ainsi son utilisation ultérieure dans un système de biomatériau fonctionnalisés.

3- Evaluation de la biocompatibilité d'un revêtement phosphocalcique élaboré par électrodéposition

Le titane et ses alliages sont les matériaux les plus utilisés pour la fabrication des implants dentaires ou orthopédiques. Afin d'améliorer la biocompatibilité du titane et de ses alliages, des revêtements de phosphate de calcium peuvent être déposés à la surface des

implants de titane. Les revêtements de phosphate de calcium rendent la surface de l'implant bioactive en formant une couche d'hydroxyapatite carbonatée sur cette surface permettant une meilleure ostéointégration de cet implant (apposition d'os à la surface de l'implant sans intervention de tissu fibreux). Il existe plusieurs techniques d'élaboration de revêtement phosphocalcique comme la torche à plasma, l'implantation ionique, l'immersion dans une solution de phosphate de calcium, la technique sol-gel. Au sein de notre laboratoire, des revêtements de phosphate de calcium sont élaborés par électrodéposition [Benhayoune et al., 2002]. Le revêtement étudié dans cette étude a été élaboré à une densité de courant de 5 mA/cm² correspondant principalement à une hydroxyapatite déficiente en calcium. Le revêtement présente 2 morphologies : en aiguilles et en sphères.

La biocompatibilité de ce revêtement a été évaluée en utilisant les cellules MG-63. Depuis de nombreuses années ces cellules sont utilisées pour évaluer la biocompatibilité des matériaux car elles sont d'origine humaine et présentent des caractéristiques d'ostéoblastes immatures [Shirosaki et al., 2005 ; Clover et Gowen, 1994]. Nous avons choisi d'effectuer cette étude sur une lignée cellulaire afin d'obtenir des résultats plus reproductibles que lorsque l'on utilise des cultures primaires qui présentent des variabilités de l'expression phénotypique des ostéoblastes dues aux variations entre donneurs notamment [Ahmad et al., 1999]. Toutefois, il faut noter que les cellules MG-63 dérivant d'un ostéosarcome humain présentent une prolifération beaucoup plus rapide que des ostéoblastes en culture primaire.

L'ostéogénèse est caractérisée par l'engagement, la prolifération et la différenciation de cellules souches multipotentes, qui se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse puis ces ostéoblastes deviennent des ostéocytes enchâssés dans la matrice ou meurent par apoptose [Marie, 2001]. Afin d'évaluer si le revêtement avait un effet sur la prolifération des cellules MG-63 ou la production de matrice osseuse, nous avons choisi d'effectuer une étude longue sur une période de 28 jours.

L'étude de la cytotoxicité n'a révélé aucun effet cytotoxique du revêtement envers les cellules MG-63. L'étude de prolifération montre une chute dramatique du nombre de cellules MG-63 à 28 jours sur plastique (témoin) ; ceci pouvant s'expliquer par le fait que les cellules présentent une vitesse de prolifération élevée et qu'à 28 jours les cellules ayant atteint la confluence commencent à mourir. En présence du revêtement de phosphate de calcium, et indépendamment de la morphologie (sphères ou aiguilles), les cellules prolifèrent moins vite que sur le plastique mais on observe également une chute du nombre de cellules à 28 jours. Ceci suggère que le revêtement phosphocalcique est favorable à la différenciation des cellules

et à la production de matrice extracellulaire. En effet, la prolifération est ralentie et la chute du nombre de cellules observée à 28 jours pourrait être due au fait que les cellules ont produit une matrice extracellulaire et sont enchâssées à l'intérieur devenant plus difficiles à décoller par l'action de la trypsine. De plus, il a été établi que l'accumulation de matrice extracellulaire était associée à un ralentissement voire à une cessation de la prolifération cellulaire [Massas et al., 1993 ; Stein et al., 1996]. L'étude de la morphologie réalisée en MEB a montré qu'en présence du revêtement phosphocalcique les cellules étaient plus allongées au 7^{ème} jour que dans les conditions de culture témoins et produisaient une matrice extracellulaire dès le 21^{ème} jour. La morphologie des cellules au 7^{ème} jour sur le revêtement est typique de la morphologie de cellules au contact d'apatite [Chou et al., 2005]. Dans cette étude, l'apatite favorise l'élongation des cellules MC3T3-E1 en réarrangeant le cytosquelette. De plus la prolifération cellulaire est ralentie sur l'apatite suggérant que les cellules s'engagent dans un état plus différencié lorsqu'elles sont en contact avec l'apatite. La présence de matrice extracellulaire montre la capacité du revêtement à induire la différenciation des cellules. De plus, l'étude de l'expression des marqueurs spécifiques de la différenciation des ostéoblastes par RT-PCR montre que le gène de la PAL est stimulé au contact du revêtement dès le 21^{ème} jour. La PAL est exprimée par les ostéoblastes pendant la phase de production et de maturation de la matrice osseuse. Le fait que ce gène soit stimulé en présence du revêtement montre la capacité de celui-ci à induire la différenciation des cellules. Le marqueur terminal de la différenciation des ostéoblastes, l'ostéocalcine, est exprimé à la fin de la phase de maturation de la matrice extracellulaire et au début de la phase de minéralisation. En présence du revêtement, le gène de l'OC est également stimulé jusqu'au 21^{ème} jour par rapport aux conditions de culture témoins puis au 28^{ème} jour on observe une diminution de l'expression du gène de l'OC dans les conditions de culture témoins. Cette diminution est encore plus accentuée en présence du revêtement phosphocalcique. Cette observation est en accord avec la cinétique d'expression du gène de l'OC décrite par Stein et al. [1996], Siebers et al. [2004], ont également observé une répression du gène de l'OC par des cellules osseuses de rat au terme d'une étude cinétique de 24 jours en présence de revêtement de phosphate de calcium.

Ainsi le revêtement de phosphate de calcium élaboré au sein de notre laboratoire favorise la différenciation des cellules MG-63 puisque les marqueurs tardifs de la différenciation des ostéoblastes sont stimulés au contact du revêtement et qu'il favorise la production de matrice osseuse.

V- CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

1- Conclusions

Le TGF- β 1 est un facteur de croissance majeur présent dans la matrice osseuse. Il est sécrété sous forme latente par les ostéoblastes et est stocké dans la matrice extracellulaire. Ses effets sur les ostéoblastes sont différents selon le type de cellules utilisées et les conditions de culture. Dans notre modèle d'ostéoblastes humains en culture primaire, le TGF- β 1 favorise l'augmentation du pool d'ostéoblastes en stimulant la prolifération cellulaire. En conséquence de cet accroissement du pool d'ostéoblastes, la formation osseuse sera également augmentée. Le TGF- β 1 stimule également l'expression de certaines protéines de la matrice osseuse (OPN, PAL et OC) et la production de matrice extracellulaire tout en inhibant les MMPs responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans les cellules MG-63, le TGF- β 1 exerce des effets différents sur la prolifération, l'expression des MMPs et la production de matrice. Toutefois, comme le TGF- β 1 présente des effets stimulants sur la prolifération cellulaire et la formation osseuse, la perspective de moduler l'activité de ce facteur de croissance par le biais d'un biomatériau fonctionnalisé semble intéressante.

Dans la deuxième partie de ce travail, la capacité activatrice du lipopeptide Ea-KRFK a été étudiée. Ce lipopeptide est destiné à être encapsulé par un système particulaire, incorporé à un biomatériau, en vue de sa libération prolongée permettant ainsi l'activation du TGF- β 1 latent et la stimulation de la formation osseuse. Dans les ostéoblastes humains en culture primaire et dans les cellules MG-63 le lipopeptide est capable d'activer le TGF- β 1 latent, généralisant ainsi l'efficacité de ce lipopeptide dans un système ostéoblastique humain. L'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK, conduit à une modulation de l'expression des MMPs-1 et -3, des TIMP-1 et -2, et peut favoriser le remodelage osseux. Cependant cette activation est aussi capable d'influencer l'expression de certaines protéines de la matrice osseuse comme la PAL et l'OPN, favorisant ainsi la formation osseuse. L'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK peut donc influencer soit la formation, soit la résorption osseuse. Toutefois, comme le TGF- β 1 provoque des effets stimulateurs sur la formation osseuse dans les ostéoblastes en culture primaire tout au long de l'étude cinétique (montré dans la première partie du travail), il est probable que si l'étude concernant l'activation du TGF- β 1 latent était menée sur des temps plus longs, les MMPs seraient

inhibées et les TIMPs et les protéines de la matrice extracellulaire osseuse stimulées favorisant ainsi la formation osseuse.

Enfin le biomatériau destiné à être fonctionnalisé a été étudié en terme de biocompatibilité. Il s'agit d'un revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition élaboré au sein de notre laboratoire. Non seulement nous avons démontré que ce revêtement présentait une bonne biocompatibilité envers les cellules MG-63, mais nous avons également montré son potentiel inducteur de la différenciation osseuse et de la formation osseuse en stimulant l'expression de la PAL et de l'OC. Donc ce revêtement de phosphate de calcium est un excellent candidat pour l'élaboration d'un biomatériau fonctionnalisé puisqu'il sera capable de potentialiser les effets du lipopeptide sur la formation osseuse une fois implanté en site osseux.

En conclusion, cette étude a montré que le lipopeptide Ea-KRFK active le TGF- β 1 latent dans un système d'ostéoblastes humains et que le biomatériau destiné à être fonctionnalisé est biocompatible et induit la différenciation et la formation osseuse.

2- Perspectives

Avant de finaliser ce projet, il apparaît nécessaire d'effectuer une étude du lipopeptide Ea-KRFK en présence des ostéoblastes humains sur des temps plus longs afin de juger de sa réelle efficacité sur la formation osseuse. La première partie de ce travail ayant montré la capacité du TGF- β 1 à favoriser la formation osseuse sur des temps longs, il serait pertinent de mener l'expérience d'activation du TGF- β 1 latent par le lipopeptide Ea-KRFK à un temps de la cinétique assez avancé permettant de juger quant au réel effet exercé par cette activation sur la formation osseuse.

De plus les modèles de culture cellulaire utilisés dans notre étude ne reflètent pas les conditions *in vivo*, ainsi il serait intéressant de cultiver les ostéoblastes humains en présence du lipopeptide dans un système de culture en 3D comme des lattis de collagène I mimant la matrice extracellulaire.

L'étape suivante sera de conceptualiser le système particulaire nécessaire à la libération prolongée du lipopeptide et de l'incorporer sur le revêtement de phosphate de calcium. Il sera pour cela nécessaire de déterminer avec précision à quel moment le lipopeptide devra être libéré pour activer le TGF- β 1 et agir positivement sur la formation osseuse. Une fois ce paramètre établi, il faudra synthétiser un système particulaire capable de libérer le lipopeptide Ea-KRFK encapsulé au temps déterminé. Une fois l'encapsulation du lipopeptide effectuée, il faudra incorporer le système de libération du lipopeptide et le lipopeptide sur le revêtement de phosphate de calcium et vérifier que cette incorporation ne modifie pas les conditions de relargage du lipopeptide Ea-KRFK.

Mais la perspective essentielle à ce travail, est de tester *in vivo* le lipopeptide Ea-KRFK, encapsulé ou non, afin de déterminer son rôle dans la cicatrisation osseuse. En effet, il serait possible d'appliquer le lipopeptide Ea-KRFK sur un site de fracture et de vérifier au cours du temps si il a un réel rôle dans la cicatrisation osseuse. Le fait de suivre l'effet du lipopeptide Ea-KRFK *in vivo* nous permettra également de déterminer encore plus précisément à quel moment celui-ci doit intervenir pour avoir un effet maximal sur la formation osseuse. Afin de démontrer que les conditions d'implantation du biomatériau fonctionnalisé ne modifient pas la libération du lipopeptide Ea-KRFK, ce matériau devra lui aussi être implanté *in vivo* et son rôle dans la cicatrisation osseuse ainsi que son innocuité devront être vérifiés.

VI- BIBLIOGRAPHIE

Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G.

Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5.
Development 1999 ; 126 (17) : 3795-809.

Adams JC.

Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions.

Annu Rev Cell Dev Biol 2001 ; 17 : 25-51.

Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G.

An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials.

Biomaterials 1999 ; 20 (3) : 211-20.

Albrektsson T, Jansson T, Lekholm U

Osseointegrated dental implants.

Dent Clin North Am 1986 ; 30 (1) : 151-74.

Albrektsson T, Johansson C.

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.

Eur Spine J 2001 ; 10 Suppl 2 : S96-101.

Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R.

TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation.

Embo J 2001 ; 20 (9) : 2254-72.

Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW.

A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes.

Proc Natl Acad Sci U S A 1971 ; 68 (1) : 240-3.

Baier RE, Meyer AE.

Implant surface preparation.

Int J Oral Maxillofac Implants 1988 ; 3 (1) : 9-20.

Benhayoune H, Laquerriere P, Jallot E, Perchet A, Kilian L, Balossier G, Bubendorff JL, Sockalingum GD.

Micrometer level structural and chemical evaluation of electrodeposited calcium phosphate coatings on TA6V substrate by STEM-EDXS.

J Mater Sci Mater Med 2002 ; 13 (11) : 1057-63.

Berton A

Conceptualisation d'un lipopeptide bifonctionnel inhibiteur des métalloprotéinases matricielles et activateur du TGFβ1 latent. Détermination de son efficacité in vitro et ex vivo.

Thèse de doctorat de l'université de Reims Champagne-Ardenne 2000 ; Reims.

Berton A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Patthy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, Emonard H.

Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids.

J Biol Chem 2001 ; 276 (23) : 20458-65.

Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G.

A twist code determines the onset of osteoblast differentiation.

Dev Cell 2004 ; 6 (3) : 423-35.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG.

Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues.

Calcif Tissue Int 1991 ; 49 (6) : 421-6.

Bonewald LF, Dallas SL.

Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation.

J Cell Biochem 1994 ; 55 (3) : 350-7.

Boskey AL, Wians FH, Jr., Hauschka PV.

The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth.

Calcif Tissue Int 1985 ; 37 (1) : 57-62.

Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB.

TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype.

J Cell Physiol 1994 ; 160 (2) : 323-35.

Bruner-Tran K, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen KG

Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice.

J Clin Endocrinol Metab 2002 ; 87 (10) : 4782-91.

Cauchard JH, Berton A, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G.

Activation of latent transforming growth factor beta 1 and inhibition of matrix metalloprotease activity by a thrombospondin-like tripeptide linked to elaidic acid.

Biochem Pharmacol 2004 ; 67 (11) : 2013-22.

Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL.

Transforming growth factor-beta gene family members and bone.

Endocr Rev 1994 ; 15 (1) : 27-39.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E.

Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone.

J Biol Chem 1987 ; 262 (6) : 2869-74.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E.

Transforming growth factor-beta and remodeling of bone.

J Bone Joint Surg Am 1991 ; 73 (9) : 1418-28.

Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M.

Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor Cbfa1 on bone cells by glucocorticoid.

J Biol Chem 1998 ; 273 (9) : 4892-6.

Chenu C, Delmas PD.

Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human.

J Bone Miner Res 1992 ; 7 (1) : 47-54.

Chou YF, Huang W, Dunn JC, Miller TA, Wu BM.

The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression.

Biomaterials 2005 ; 26 (3) : 285-95.

Clover J, Gowen M.

Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype?

Bone 1994 ; 15 (6) : 585-91.

Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Jr., Stetler-Stevenson WG.

MMP-2: expression, activation and inhibition.

Enzyme Protein 1996 ; 49 (1-3) : 7-19.

Curran S, Murray GI.

Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis.

J Pathol 1999 ; 189 (3) : 300-8.

Curran S, Murray GI.

Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis.

Eur J Cancer 2000 ; 36 (13 Spec N°) : 1621-30.

Cusack S, Jewell C, Cashman KD.

The effect of conjugated linoleic acid on the viability and metabolism of human osteoblast-like cells.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005 ; 72 (1) : 29-39.

Daculsi G.

Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute.

Biomaterials 1998 ; 19 (16) : 1473-8.

Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E.

Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites : a new concept for bone and dental substitution biomaterials.

Bone 1999 ; 25 (suppl 2) : 59s-61s

Dallas SL, Keene DR, Bruder SP, Saharinen J, Sakai LY, Mundy GR, Bonewald LF.

Role of the latent transforming growth factor beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo.

J Bone Miner Res 2000 ; 15 (1) : 68-81.

Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF.

Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein.

J Cell Biol 1995 ; 131 (2) : 539-49.

De Vernejoul MC, Cohen-Solal M, Orcel P.

Bone cytokines.

Curr Opin Rheumatol 1993 ; 5 (3) : 332-8.

Denhardt DT, Noda M.

Osteopontin expression and function: role in bone remodeling.

J Cell Biochem Suppl 1998 ; 30 (31) : 92-102.

Derynck R, Zhang Y, Feng XH.

Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses.

Cell 1998 ; 95 (6) : 737-40.

Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R.

Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase.

J Biol Chem 1995 ; 270 (18) : 10618-24.

Ducy P.

Contrôle génétique de la squelettogénèse.

Médecine/Sciences 2001 ; 17 (12) : 1242-51.

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G.

A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development.

Genes Dev 1999 ; 13 (8) : 1025-36.

Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R.

Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling.

Mol Biol Cell 1998 ; 9 (7) : 1903-18.

Feige JJ, Quirin N, Souchelnitskiy S

TGF- β , un peptide biologique sous contrôle : formes latentes et mécanismes d'activation.

Médecine/Sciences 1996 ; 12 (8-9) : 929-39.

Gebken J, Feydt A, Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, Batge B.

Ligand-induced downregulation of receptors for TGF-beta in human osteoblast-like cells from adult donors.

J Endocrinol 1999 ; 161 (3) : 503-10.

Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sorensen ES, Boskey AL.

Importance of Phosphorylation for Osteopontin Regulation of Biomineralization.

Calcif Tissue Int 2005 (disponible en ligne).

Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, Hunter GK.

Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite.

Connect Tissue Res 2001 ; 42 (1) : 25-37.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Wagner EF.

Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene.

Trends Genet 1995 ; 11 (11) : 436-41.

Gurlek A, Kumar R.

Regulation of osteoblast growth by interactions between transforming growth factor-beta and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.

Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2001 ; 11 (4) : 299-317.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM.

Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone.

Physiol Rev 1989 ; 69 (3) : 990-1047.

Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, Lomri A, Lasmoles F, Marie PJ.

N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2.

J Cell Physiol 2000 ; 183 (1) : 117-28.

Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA.

Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin.

J Bone Miner Res 1992 ; 7 (3) : 335-43.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK.

Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. Part 1.

J Biomed Mater Res Symp 1971 ; 2 : 117-141.

Hench LL, Polak JM.

Third-generation biomedical materials.

Science 2002 ; 295 (5557) : 1014-7.

Hullinger TG, Pan Q, Viswanathan HL, Somerman MJ.

TGFbeta and BMP-2 activation of the OPN promoter: roles of smad- and hox-binding elements.

Exp Cell Res 2001 ; 262 (1) : 69-74.

Hunter GK, Goldberg HA.

Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993 ; 90 (18) : 8562-5.

Hunter GK, Goldberg HA.

Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.

Biochem J 1994 ; 302 (Pt 1) : 175-9.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA.

Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins.

Biochem J 1996 ; 317 (Pt 1) : 59-64.

Hurteaux R.

Activités biologiques d'un peptide et mise au point d'un système de libération prolongée par microencapsulation en vue de la fonctionnalisation de biomatériaux.

Thèse de doctorat de l'université de Reims champagne-Ardenne 2003 ; Reims.

Hurteaux R, Benhayoune H, Edwards-Levy F, Bouthors S, Balossier G, Laurent-Maquin D.

Preparation and characterization of an electrodeposited calcium phosphate coating associated with a calcium alginate matrix.

J Mater Sci Mater Med 2005 ; 16 (1) : 9-13.

Iimura T, Oida S, Ichijo H, Goseki M, Maruoka Y, Takeda K, Sasaki S.

Modulation of responses to TGF-beta by 1, 25 dihydroxyvitamin D3 in MG-63 osteoblastic cells: possible involvement of regulation of TGF-beta type II receptor.

Biochem Biophys Res Commun 1994 ; 204 (2) : 918-23.

Ito Y, Kajihara M, Imanishi Y.

Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide.

J Biomed Mater Res 1991 ; 25 (11) : 1325-37.

Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P.

The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators.

Trends Genet 1993 ; 9 (10) : 338-41.

Kanzaki T, Olofsson A, Moren A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Heldin CH.

TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences.

Cell 1990 ; 61 (6) : 1051-61.

Karsenty G.

The genetic transformation of bone biology.

Genes Dev 1999 ; 13 (23) : 3037-51.

Kassem M, Kveiborg M, Eriksen EF.

Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol.

Eur J Clin Invest 2000 ; 30 (5) : 429-37.

Keramidas M, Chambaz EM, Feige JJ.

Inhibition of adrenocortical steroidogenesis by alpha 2-macroglobulin is caused by associated transforming growth factor beta.

Mol Cell Endocrinol 1992 ; 84 (3) : 243-51.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T.

Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.

Cell 1997 ; 89 (5) : 755-64.

Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E.

TIMPs as multifacial proteins.

Crit Rev Oncol Hematol 2004 ; 49 (3) : 187-98.

Leonardi A, Cortivo R, Fregona I, Plebani M, Secchi AG, Abatangelo G.

Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003 ; 44 (1) : 183-9.

Lian JB, Stein GS.

Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation.

Crit Rev Oral Biol Med 1992 ; 3 (3) : 269-305.

Lind M.

Growth factors: possible new clinical tools. A review.

Acta Orthop Scand 1996 ; 67 (4) : 407-17.

Liu YH, Ma L, Kundu R, Ignelzi M, Sangiorgi F, Wu L, Luo W, Snead ML, Maxson R.

Function of the *Msx2* gene in the morphogenesis of the skull.

Ann N Y Acad Sci 1996 ; 785 : 48-58.

Lomri A, Marie PJ.

Effects of transforming growth factor type beta on expression of cytoskeletal proteins in endosteal mouse osteoblastic cells.

Bone 1990 ; 11 (6) : 445-51.

Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG.

Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors.

J Clin Invest 1995 ; 95 (2) : 881-7.

Loty C, Loty S, Sautier JM.

Interface os/matériaux bioactifs implantables.

Implant 1998 ; 4 (2) : 101-109.

Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL.

Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin.

J Cell Biol 1990 ; 110 (4) : 1361-7.

Manolagas SC.

Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.

Endocr Rev 2000 ; 21 (2) : 115-37.

Marie PJ.

Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste.

Médecine/Sciences 2001 ; 17 (12) : 1252-59.

Marucci DD, Yu Y, McTavish J, Fiona Bonar S, Poole MD, Walsh WR.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone remodelling following distraction osteogenesis of the sheep mandible.

J Craniomaxillofac Surg 2002 ; 30 (4) : 208-12.

Masi L, Brandi ML, Robey PG, Crescioli C, Calvo JC, Bernabei P, Kerr JM, Yanagishita M.

Biosynthesis of bone sialoprotein by a human osteoclast-like cell line (FLG 29.1).

J Bone Miner Res 1995 ; 10 (2) : 187-96.

Massagué J.

TGF-beta signal transduction.

Annu Rev Biochem 1998 ; 67 : 753-91.

Massagué J, Woton D

Transcriptional control by TGF- β /Smad signaling system

Embo J 2000 ; 19 (8) : 1745-54

Massas R, Pitaru S, Weinreb MM.

The effects of titanium and hydroxyapatite on osteoblastic expression and proliferation in rat parietal bone cultures.

J Dent Res 1993 ; 72 (6) : 1005-8.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S.

Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.

Faseb J 1998 ; 12 (12) : 1075-95.

McCawley LJ, Matrisian LM.

Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!

Curr Opin Cell Biol 2001 ; 13 (5) : 534-40.

Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH.

Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization.

J Biol Chem 1988 ; 263 (13) : 6407-15.

Moursi AM, Globus RK, Damsky CH.

Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro.

J Cell Sci 1997 ; 110 (Pt 18) : 2187-96.

Mundy GR, Bonewald LF.

Role of TGF beta in bone remodeling.

Ann N Y Acad Sci 1990 ; 593 : 91-7.

Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB.

Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation.

Kidney Int 1997 ; 51 (5) : 1376-82.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D.

The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.

Cell 1999 ; 96 (3) : 319-28.

Murphy G, Knauper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendas AM, Lopez-Otin C.

Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.

Ann N Y Acad Sci 1999 ; 878 : 25-39.

Murphy-Ullrich JE, Poczatek M.

Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology.

Cytokine Growth Factor Rev 2000 ; 11 (1-2) : 59-69.

Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Hook M.

Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin.

Mol Biol Cell 1992 ; 3 (2) : 181-8.

Murray GI.

Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules.

J Pathol 2001 ; 195 (2) : 135-7.

Nagase H.

Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.

Biol Chem 1997 ; 378 (3-4) : 151-60.

Nakamura I, Rodan GA, Duong le T.

Regulatory mechanism of osteoclast activation.

J Electron Microsc (Tokyo) 2003 ; 52 (6) : 527-33.

**Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR,
De Crombrughe B.**

The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.

Cell 2002 ; 108 (1) : 17-29.

**Nishimori S, Tanaka Y, Chiba T, Fujii M, Imamura T, Miyazono K, Ogasawara T,
Kawaguchi H, Igarashi T, Fujita T, Tanaka K, Toyoshima H.**

Smad-mediated transcription is required for transforming growth factor-beta 1-induced p57(Kip2) proteolysis in osteoblastic cells.

J Biol Chem 2001 ; 276 (14) : 10700-5.

Noda M, Rodan GA.

Type-beta transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells.

Biochem Biophys Res Commun 1986 ; 140 (1) : 56-65.

Noda M, Yoon K, Prince CW, Butler WT, Rodan GA.

Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor.

J Biol Chem 1988 ; 263 (27) : 13916-21.

Ogata Y, Niisato N, Furuyama S, Cheifetz S, Kim RH, Sugiyama H, Sodek J.

Transforming growth factor-beta 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF-beta activation element in the rat BSP gene promoter.

J Cell Biochem 1997 ; 65 (4) : 501-12.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y.

PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993 ; 90 (14) : 6859-63.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ.

Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.

Cell 1997 ; 89 (5) : 765-71.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J.

Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression.

J Biol Chem 1991 ; 266 (21) : 14064-71.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS.

Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix.

J Cell Physiol 1990 ; 143 (3) : 420-30.

Pfeilschifter J, Diel I, Scheppach B, Bretz A, Krempien R, Erdmann J, Schmid G, Reske N, Bismar H, Seck T, Krempien B, Ziegler R.

Concentration of transforming growth factor beta in human bone tissue: relationship to age, menopause, bone turnover, and bone volume.

J Bone Miner Res 1998 ; 13 (4) : 716-30.

Pfeilschifter J, D'Souza SM, Mundy GR.

Effects of transforming growth factor-beta on osteoblastic osteosarcoma cells.

Endocrinology 1987 ; 121 (1) : 212-8.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science 1999 ; 284 (5411) : 143-7.

Purchio AF, Cooper JA, Brunner AM, Lioubin MN, Gentry LE, Kovacina KS, Roth RA, Marquardt H.

Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor.

J Biol Chem 1988 ; 263 (28) : 14211-5.

Raghunath M, Unsold C, Kubitscheck U, Bruckner-Tuderman L, Peters R, Meuli M.

The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) and is a repository for latent TGF-beta 1.

J Invest Dermatol 1998 ; 111 (4) : 559-64.

Reddy SV.

Regulatory mechanisms operative in osteoclasts.

Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2004 ; 14 (4) : 255-70.

Reyes-Botella C, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C.

Effect of different growth factors on human cultured osteoblast-like cells.

Cell Physiol Biochem 2002 ; 12 (5-6) : 353-8.

Rezania A, Thomas CH, Branger AB, Waters CM, Healy KE.

The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein.

J Biomed Mater Res 1997 ; 37 (1) : 9-19.

Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE.

The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta.

J Biol Chem 1999 ; 274 (19) : 13586-93.

Rodan GA, Rodan SB.

Expression of osteoblastic phenotype.

Annual advance in bone and mineral research 1984 ; 2 : 244-85

Robinet A.

Régulation de l'expression et/ou de l'activation de la Gélatinase A par deux peptides issus de la thrombospondine et de l'élastine : Implication dans l'invasion tumorale et l'angiogénèse.

Thèse de doctorat de l'université de Reims Champagne-Ardenne 2003 ; Reims.

Rydziel S, Varghese S, Canalis E.

Transforming growth factor beta1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures.

J Cell Physiol 1997 ; 170 (2) : 145-52.

Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Kruttsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE.

Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1.

J Biol Chem 1995 ; 270 '13) : 7304-10.

Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE.

The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta.

J Biol Chem 1994 ; 269 (43) : 26783-8.

Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE.

Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism.

J Cell Biol 1993 ; 122 (4) : 923-32.

Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, Murphy-Ullrich JE.

Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system.

J Biol Chem 1994 ; 269 (43) : 26775-82.

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP.

Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling.

Cell 1998 ; 94 (5) : 585-94.

Shiels MJ, Mastro AM, Gay CV.

The effect of donor age on the sensitivity of osteoblasts to the proliferative effects of TGF-beta and 1,25(OH)₂ vitamin D₃.

Life Sci 2002 ; 70 (25) : 2967-75.

Shimokawa K, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H.

Complexes of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human seminal plasma.

J Androl 2003 ; 24 (1) : 73-7.

Shin H, Jo S, Mikos AG.

Biomimetic materials for tissue engineering.

Biomaterials 2003 ; 24 (24) : 4353-64.

Shirkhazadeh M, Azadegan M.

Formation of carbonate apatite on calcium phosphate coatings containing silver ions.

J Mater Sci Mater Med 1998 ; 9 (7) : 385-91.

Shirosaki Y, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, Lopes MA, Santos JD, Fernandes MH.

In vitro cytocompatibility of MG-63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes.

Biomaterials 2005 ; 26 (5) : 485-93.

Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA.

Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings, an *in vitro* study with osteoblast-like cells.

Biomaterials 2004 ; 25 (11) : 2019-27.

Siegel PM, Massague J.

Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.

Nat Rev Cancer 2003 ; 3 (11) : 807-21.

Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hufner M.

Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation.

J Cell Biochem 1999 ; 75 (1) : 22-35.

Siggelkow H, Schenck M, Rohde M, Viereck V, Tauber S, Atkinson MJ, Hufner M.

Prolonged culture of HOS 58 human osteosarcoma cells with 1,25-(OH)₂-D₃, TGF-beta, and dexamethasone reveals physiological regulation of alkaline phosphatase, dissociated osteocalcin gene expression, and protein synthesis and lack of mineralization.

J Cell Biochem 2002 ; 85 (2) : 279-94.

Sodek J, Ganss B, McKee MD.

Osteopontin.

Crit Rev Oral Biol Med 2000 ; 11 (3) : 279-303.

Souchelnitskiy S, Chambaz EM, Feige JJ.

Thrombospondins selectively activate one of the two latent forms of transforming growth factor-beta present in adrenocortical cell-conditioned medium.

Endocrinology 1995 ; 136 (11) : 5118-26.

Stein GS, Lian JB.

Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype.

Endocr Rev 1993 ; 14 (4) : 424-42.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M.

Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.

Physiol Rev 1996 ; 76 (2) : 593-629.

Strewler GJ.

Local and systemic control of the osteoblast.

J Clin Invest 2001 ; 107 (3) : 271-2.

Sung V, Stubbs JT 3rd, Fisher L, Aaron AD, Thompson EW.

Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins.

J Cell Physiol 1998 ; 176 (3) : 482-94.

Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J.

Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells.

J Biol Chem 1995 ; 270 (9) : 4689-96.

Taira M, Nakao H, Takahashi J, Araki Y.

Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells.

J Oral Rehabil 2003 ; 30 (7) : 697-701.

Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB.

Latent TGF-beta binding proteins.

Int J Biochem Cell Biol 2005 ; 37 (1) : 38-41.

Tsuji K, Komori T, Noda M.

Aged mice require full transcription factor, Runx2/Cbfa1, gene dosage for cancellous bone regeneration after bone marrow ablation.

J Bone Miner Res 2004 ; 19 (9) : 1481-9.

Tu Q, Yamauchi M, Pageau SC, Chen JJ.

Autoregulation of bone sialoprotein gene in pre-osteoblastic and non-osteoblastic cells.

Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 316 (2) : 461-7.

Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, Nagai Y, Ikeda T, Yamato H, Kawaguchi H.

Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells.

J Cell Physiol 2000 ; 185 (2) : 207-14.

Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M.

Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts.

J Cell Biochem 2002 ; 86 (2) : 348-56.

Vincent L, Varet J, Pille JY, Bompais H, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C, Mirshahi M, Lu H, Vannier JP, Soria C, Li H.

Efficacy of dendrimer-mediated angiostatin and TIMP-2 gene delivery on inhibition of tumor growth and angiogenesis: in vitro and in vivo studies.

Int J Cancer 2003 ; 105 (3) : 419-29.

Vu TH, Werb Z.

Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.

Genes Dev 2000 ; 14 (17) : 2123-33.

Watkins BA, Lippman HE, Le Bouteiller L, Li Y, Seifert MF.

Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function.

Prog Lipid Res 2001 ; 40 (1-2) : 125-48.

Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J.

Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations.

J Cell Biol 1988 ; 106 (3) : 915-24.

Wuthier RE, Register TC.

The role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues.

The chemistry and biology of mineralized tissues 1984 ; 114-124

Yamaguchi A, Komori T, Suda T.

Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1.

Endocr Rev 2000 ; 21 (4) : 393-411.

Yamamuro T, Shikata J, Okumura H, Kitsugi T, Kakutani Y, Matsui T, Kokubo T.

Replacement of the lumbar vertebrae of sheep with ceramic prostheses.

J Bone Joint Surg Br 1990 ; 72 (5) : 889-93.

Yamauchi M, Ogata Y, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J.

AP-1 regulation of the rat bone sialoprotein gene transcription is mediated through a TPA response element within a glucocorticoid response unit in the gene promoter.

Matrix Biol 1996 ; 15 (2) : 119-30.

Yang L, Tao T, Wang X, Du N, Chen W, Tao S, Wang Z, Wu L.

Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro.

Chin Med J (Engl) 2003 ; 116 (9) : 1357-60.

Yang R, Gerstenfeld LC.

Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone stimulation of bone sialoprotein gene expression in osteoblasts.

J Biol Chem 1996 ; 271 (47) : 29839-46.

Yu Q, Stamenkovic I.

Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.

Genes Dev 2000 ; 14 (2) : 163-76.

N°

RICHARD Doriane- 1, rue du Maréchal Juin, 51095 Reims cedex

Comportement de cellules osseuses humaines en culture en présence du lipopeptide Ea-KRFK et au contact d'un revêtement phosphocalcique en vue de la fonctionnalisation de biomatériaux

Thèse de doctorat de l'université de Reims Champagne-Ardenne. : 2005

L'objectif de notre laboratoire est de conceptualiser des biomatériaux fonctionnalisés. La réalisation de ces biomatériaux se fait par adjonction d'un système de libération prolongée de peptides sur un revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition.

Le peptide utilisé dans cette étude est un lipopeptide (élaïdyl-KRFK) composé d'acide élaïdique pour sa partie lipidique et du peptide KRFK, issu de la thrombospondine de type I. Ce lipopeptide a la capacité d'activer le TGF- β 1 latent.

Le TGF- β 1 est un facteur de croissance majeur présent sous forme latente dans la matrice extracellulaire osseuse. Une fois activé, le TGF- β 1 exerce des effets stimulateurs sur les ostéoblastes et la formation osseuse. Toutefois, ses effets varient selon le type cellulaire utilisé et la concentration de TGF- β 1 utilisée notamment. Ainsi, la première partie de notre étude a consisté à étudier les effets du TGF- β 1 sur la formation osseuse dans un modèle d'ostéoblastes humains en culture tout au long de leur cinétique de différenciation. Cette étude nous a permis de déterminer à quel moment de la cinétique de différenciation des ostéoblastes le lipopeptide doit être libéré du biomatériau pour aller activer le TGF- β 1 latent présent dans la matrice osseuse.

La deuxième partie de ce travail a permis de démontrer la réelle capacité du lipopeptide élaïdyl-KRFK à activer le TGF- β 1 latent dans les ostéoblastes humains.

Et enfin la dernière partie du travail a mis en évidence la biocompatibilité et la non cytotoxicité du revêtement de phosphate de calcium élaboré par électrodéposition destiné à être utilisé pour la fonctionnalisation des matériaux.

Ainsi nous avons montré que le lipopeptide est un bon candidat à l'encapsulation en vue d'une libération prolongée et que le revêtement était un bon matériau pour la fonctionnalisation.

Mots Clés

Biomatériaux - Fonctionnalisation - TGF- β 1 - Lipopeptide - Biocompatibilité - Revêtement phosphocalcique

Membres du Jury

Georges BELLON, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, URCA – Président

Marie-Danielle NAGEL, Professeur des Universités, Université Technologique de Compiègne - Rapporteur

Jean-Michel SAUTIER, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Paris VII - Rapporteur

Sandrine LORIMIER, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, URCA - Examineur

Benoît CHENAIS, Professeur des Universités, Le Mans - Co-Directeur de Thèse

Dominique LAURENT-MAQUIN, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, URCA - Co-Directeur de Thèse