

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

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

Discipline : **Immunologie**

Présenté par

Frédéric VELARD

Etude de l'activation des polynucléaires neutrophiles humains
en réponse aux particules d'hydroxyapatite et de sa
modulation par le zinc : implications dans le contrôle de la
réponse inflammatoire aiguë

Soutenue publiquement le 30 Octobre 2009

JURY

Rapporteurs

Pr. Thierry MOREAU (Tours)

Dr. Joëlle AMEDEE (Bordeaux)

Examineurs

Dr. Roselyne GARNOTEL (Reims)

Pr. Dominique LAURENT-MAQUIN (Reims)

Directeurs de thèse

Pr. Patrice LAQUERRIERE (Strasbourg)

Dr. Abderrazzaq BELAAOUAJ (Reims)

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Docteur **Joëlle AMEDEE**, Directrice de recherche à l'INSERM U577 à Bordeaux, et Monsieur le Professeur **Thierry MOREAU**, Professeur à l'INSERM U618 à Tours, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie Madame le Docteur **Roselyne GARNOTEL**, Maître de conférences à l'unité CNRS UMR6237 d'avoir accepté de juger ce travail.

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

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

Je remercie le Professeur **Eric TOULMONDE** pour avoir mis à ma disposition les ressources du service de cytophérèse de l'Etablissement Français du Sang Nord de France de Reims, pour l'approvisionnement en matériel biologique nécessaire à la réalisation de ce travail. Merci également à l'ensemble du personnel de l'EFS pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci enfin aux quatre-cents donneurs anonymes qui ont permis la réalisation de mes recherches.

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

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

Merci aux Docteurs **Richard LENAOUR** et **Bouchaib LAMKHIOUED** pour m'avoir initié à l'enseignement et à la recherche. Merci également pour les moments passés en dehors des murs de l'URCA

Merci au Docteur **Valérie GAFA** pour sa gentillesse, son sourire et les très instructives discussions sur la cytométrie de flux.

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

Je remercie **Catherine** d'avoir fait son « come-back » avec nous. Merci pour tes éclats de rire qui égaient les plus mauvaises journées.

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

Merci à **Christine GUILLAUME** pour son aide inestimable à la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité et son soutien, surtout durant cette dernière année.

Merci aux étudiants de l'unité : **Julien S, Sophie, Hélo** et **Louis** pour les bons moments passés ensemble et les fous-rires. Merci aussi aux collègues d'autres laboratoires : **Aurélie, Christelle C, Hassan, Kader et Rym** de l'EA4303, **Chris, Tom** et **Denise**, ex-EA3796, **Flo, Ben** et **Ced** mes compagnons de galère monitorale. Merci à tous d'avoir été là quand j'en ai eu besoin.

Merci surtout à mes amis, **Loulou et Flav**, merci de la confiance et des responsabilités que vous m'avez données, **Jul et Cocotte, Christelle et Manu, les Jo's et Brenda, Romu**, pour tous ces moments passés ensemble qui font que l'on se souvient qu'il y a une vie en dehors du labo et qu'elle est géniale. Pour tout ça et le reste , merci à vous tous.

Merci à l'ensemble de ma famille pour son soutien. A mes parents surtout d'avoir toujours cru en moi.

Merci à **Aurore**, mon amour et mon âme sœur, de m'avoir soutenu (et supporté...) toutes ces années et pour celles à venir. Merci de m'avoir donné **Raphaël**, qui amène un sens nouveau à ma vie.

Mes deux anges ce travail est pour vous, je vous le dédie.

SOMMAIRE

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	-1-
<u>LISTES DES ILLUSTRATIONS</u>	-5-
<u>CONTEXTE</u>	-8-
<u>INTRODUCTION</u>	-10-
A- La hanche	-10-
1- Anatomie	-10-
2- Pathologies de l'articulation coxo-fémorale	-11-
<u>2.1- Les coxarthroses</u>	-11-
<u>2.2- La chondrocalcinose</u>	-11-
<u>2.3- Les coxites</u>	-12-
<u>2.4- L'ostéonécrose de la tête fémorale</u>	-12-
<u>2.5- Les périarthrites de la hanche</u>	-13-
<u>2.6- L'algodystrophie de la hanche</u>	-13-
<u>2.7- Les autres affections de la hanche</u>	-14-
3- Les différents types de prothèses de hanche	-14-
<u>3.1- Les prothèses de resurfaçage</u>	-14-
<u>3.2- Les prothèses céphaliques</u>	-15-
<u>3.3- Les prothèses intermédiaires</u>	-16-
<u>3.4- Les prothèses totales</u>	-17-
4- Fixation des prothèses	-18-
<u>4.1- Fixation par ciment</u>	-18-
<u>4.2- Fixation sans ciment</u>	-18-
5- Les complications	-20-
<u>5.1- Le déboitement</u>	-20-
<u>5.2- Les paralysies nerveuses</u>	-20-
<u>5.3- Les fractures périprothétiques</u>	-20-

5.4- Le descellement septique	-20-
5.5- Le descellement aseptique	-21-
B- L'hydroxyapatite	-22-
1- Généralités	-22-
2- Les modes d'obtention	-22-
2.1- L'élaboration par précipitation en milieu aqueux	-22-
2.2- L'élaboration par réaction en phase solide	-23-
2.3- L'élaboration par solution-gélification	-23-
3- Les utilisations	-24-
3.1- Les revêtements prothétiques	-24-
3.1.1- Dépôt par torche à plasma	-24-
3.1.2- Electrodéposition	-26-
3.2- Le comblement osseux	-26-
3.3- Les ciments	-28-
C- Inflammation aiguë et polynucléaire neutrophile	-31-
1- Caractéristiques	-31-
2- La réaction inflammatoire aiguë	-31-
2.1- Généralités	-31-
2.2- Les différentes étapes de la réaction inflammatoire aiguë	-32-
2.2.1- Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire	-32-
2.2.2- Etape vasculaire de l'inflammation	-33-
2.2.3- Amplification de la réaction	-35-
2.2.4. Elimination de l'agent initiateur et réparation tissulaire	-36-
3- Les polynucléaires neutrophiles	-36-
4- Les médiateurs de l'inflammation	-38-
4.1- Les cytokines et chimiokines	-38-
4.1.1- Généralités	-38-
4.1.2- L'interleukine-1 α (IL-1 α)	-40-
4.1.2.1- Structure du gène et de la protéine	-40-

4.1.2.2- Sources et inducteurs	-41-
4.1.2.3- Récepteurs et activités biologiques	-41-
4.1.3- <i>L'interleukine-8(IL-8)</i>	-43-
4.1.3.1- Structure du gène et de la protéine	-43-
4.1.3.2- Sources et inducteurs	-44-
4.1.3.3- Récepteurs et activités biologiques	-45-
4.1.4- <i>Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1)</i>	-47-
4.1.4.1- Structure des gènes et des protéines	-47-
4.1.4.2- Sources et inducteurs	-48-
4.1.4.3- Récepteurs et activités biologiques	-49-
<u>4.2- Les protéases</u>	-49-
4.2.1- <i>Les différentes familles de protéases</i>	-49-
4.2.1.1- Les protéases à sérine	-49-
4.2.1.2- Les protéases à cystéine	-50-
4.2.1.3- Les métalloprotéases matricielles (MMPs)	-51-
4.2.2- <i>La MMP-9</i>	-52-
4.2.2.1- Structure du gène et de la protéine	-52-
4.2.2.2- Sources et inducteurs	-54-
4.2.2.3- Activités biologiques	-54-
5- L'inflammation liée aux débris de biomatériaux	-55-
 D- Le zinc	 -58-
 1- Généralités	 -58-
2- Les rôles du zinc	-58-
2.1- <u>Rôle dans le métabolisme osseux</u>	-58-
2.2- <u>Rôle dans la réponse immunitaire</u>	-58-
3- La déficience en zinc	-59-
4- Le zinc et la modulation de la réponse inflammatoire	-60-
 <u>OBJECTIFS DU TRAVAIL</u>	 -63-

RESULTATS

-64-

1^{ère} Partie : Les particules d'hydroxyapatite ont la capacité d'activer les polynucléaires neutrophiles humains et d'initier une réponse inflammatoire.

-64-

2^{ème} Partie : Modulation de la réponse des polynucléaires neutrophiles à l'hydroxyapatite par l'utilisation d'une hydroxyapatite substituée en zinc.

-76-

DISCUSSION GENERALE

-110-

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

-117-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-120-

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

-153-

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
Akt : Protéine kinase B
ANKH : *Ankylosis progressive homologue*
AP-1 : *Activator protein-1*
AP-2 : *Activator protein-2*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BFU : *Burst forming unit*
Ca : Calcium
CD : *Cluster of differentiation*
CFU : *Colony forming unit*
CFU-G : *CFU-Granulocyte*
CFU-GEMM : *CFU-Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte*
CFU-GM : *CFU-Granulocyte-Macrophage*
CRP : *C reactive protein*
CXCR1 : *CXC chemokine receptor 1*
CXCR2 : *CXC chemokine receptor 2*
EGF : *Epidermal growth factor*
ELISA : *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
ENA-78 : *Epithelial Neutrophil Activating Peptide-78*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*
ESL-1 : *E-selectin ligand 1*
FAK : *Focal adhesion kinase*
fMLP : *Formyl-Methionine-Leucine-Phenylalanine*
G-CSF : *Granulocyte colony stimulating factor*
GC : *Sp-1 binding site*
GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*
GMP : Guanosine monophosphate
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GRO : *Growth-related oncogene*

GTP : Guanosine triphosphate
HA : Hydroxyapatite
HA5% : Hydroxyapatite substituée avec 5% de zinc
ICAM : *Intercellular adhesion molecule*
ICE : *IL-1 β converting enzyme*
IFN : Interféron
IK β : *Inhibitor of NF κ B*
IKK : *IK β kinase*
IL: Interleukine
IL-1 α : Interleukine 1 α
IL-1 β : Interleukine 1 β
IL-1RI: *IL-1 receptor type I*
IL-1RII: *IL-1 receptor type II*
IL-1Ra: *IL-1 receptor antagonist*
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IL-8RA : *Interleukin 8 receptor A*
IL-8RB : *Interleukin 8 receptor B*
IL-10 : Interleukine 10
IMP: *Inhibitor of metalloproteinase*
IP-10 : *IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa*
IRAK : *IL-1 receptor associated kinase*
IRAP: *IL-1R accessory protein*
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JAK2 : *Janus-activated kinase 2*
Jnk : *c-Jun N-terminal Kinase*
kDa: KiloDalton
LBP : *LPS binding protein*
LB : Lymphocyte B
LD78 : Autre appellation de MIP-1 α
LFA-1 : *Lymphocyte associated function antigen 1*
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T

LTB4 : Leucotriène B4
m : Mètre
Mac-1 : *Macrophage antigen 1*
MAPK : *Mitogen activated protein kinase*
MBP : *Mannane binding protein*
MCP : *Macrophage chemoattractant protein*
MEB : Microscopie électronique à balayage
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : MAP/ERK kinase
MFI : *Mean fluorescence intensity*
MIP : *Macrophage inflammatory protein*
MKP : *MAPK phosphatase 1*
MMP : *Matrix Metalloproteinase*
MT-MMP : *Membrane Type Matrix Metalloproteinase.*
MTOR : *Mammalian target of the rapamycin*
NADPH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
NF-IL6 : *Nuclear factor IL-6*
NF- κ B : *Nuclear factor $k\beta$*
NK : *Natural killer*
OPG : *Osteoprotegerin*
P : Phosphore
PAI : *Plasminogen activator inhibitor*
PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*
pb : Paire de bases
PCR : *Polymerase chain reaction*
PDE : Phosphodiesterase des nucléotides cycliques
PDGF : *Platelet derived growth factor*
PEA3 : *Polyoma enhancer A binding protein-3*
PECAM : *Platelet-endothelial cell adhesion molecule*
PHA : Phytohémaglutinine A
PI3K : *Phosphatidyl-inositol-3-kinase*
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PKG : Protéine kinase G

PLC : Phospholipase C
PMMA : Poly(méthylmétacrylate)
PMN : *Polymorphonuclear Cell*
PRR : *Pattern-recognition receptors*
PSGL-1 : *Platelet-selectin glycoprotein ligand 1*
PTH : Prothèse totale de hanche
PTP: *Protein tyrosine phosphatase*
s : Seconde
RANK : *Receptor activator of NF- κ B*
RANK-L : *RANK ligand*
ROS : *Reactive oxygen species*
RT : *Reverse transcription*
STAT : *Signal transducers and activators of transcription*
t-PA : *Tissue type plasminogen activator*
TCP : *Tricalcium phosphate*
TGF β : *Transforming growth factor β*
TIMP : *Tissue Inhibitor of MMP*
Th lymphocyte : T helper lymphocyte
TLR : *Toll like receptor*
TNF α : *Tumor necrosis factor α*
TNFR : *TNF α receptor*
u-PA : *Urokinase type plasminogen activator*
VCAM : *Vascular cell adhesion molecule*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4 : *Very late antigen 4*
 α 2AP : *α 2 Antiplasmin*
 μ m: Micromètre
°C : Degrés Celsius

LISTE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Schéma 1. Anatomie de la hanche	-10-
Schéma 2. Ostéonécrose symptomatique de la hanche gauche	-12-
Schéma 3. Diagnostic d'algodystrophie	-13-
Schéma 4. Fixation d'un implant de resurfaçage de hanche de type Birmingham	-15-
Schéma 5. Implants de resurfaçage de hanche	-15-
Schéma 6. Radiographie d'une prothèse de hanche céphalique de Moore	-16-
Schéma 7. Prothèse intermédiaire type Charnley-Hastings	-17-
Schéma 8. Prothèse totale de hanche revêtue d'hydroxyapatite	-17-
Schéma 9. Repousse osseuse à l'abord d'une prothèse non revêtue	-19-
Schéma 10. Radiographies montrant une ossification périprothétique	-19-
Schéma 11. Modèle d'ostéolyse et descellement aseptique	-21-
Schéma 12. Dispositif de cristallisation de l'hydroxyapatite par précipitation	-23-
Schéma 13. Photographie en MEB d'une poudre d'hydroxyapatite obtenue par sol-gel	-24-
Schéma 14. Implants dentaires en cours de revêtement par torche à plasma	-25-
Schéma 15. Dispositif d'électrodéposition d'hydroxyapatite	-26-
Schéma 16. Radiographies d'ostéolyse diaphysaire comblée par de l'HA	-27-
Schéma 17. Exemple de granules phosphocalciques	-28-
Schéma 18. Grains d'hydroxyapatite utilisés pour le comblement osseux	-28-
Schéma 19. Absorption et intégration d'un ciment phosphocalcique par le tissu osseux	-29-
Schéma 20. Evolution de l'inflammation liée aux biomatériaux.	-30-
Schéma 21. Signalisation des TLRs aboutissant à l'activation de NFκB	-33-
Schéma 22. La migration transendothéliale des polynucléaires neutrophiles	-34-
Schéma 23. Des cellules souches hématopoïétiques aux neutrophiles circulants	-37-
Schéma 24. Phagocytose de BCGs par un PMN	-37-
Schéma 25. Classification fonctionnelle des cytokines	-39-
Schéma 26. Expression des récepteurs aux chimiokines sur les leucocytes humains	-40-
Schéma 27. Synthèse et activation de l'IL-1α.	-41-

Schéma 28. Modèle d'activation cellulaire par l'IL-1 α .	-42-
Schéma 29. Structure du gène de l'IL-8 humaine.	-43-
Schéma 30. Structure tridimensionnelle de l'IL-8	-44-
Schéma 31. Voies de transductions du signal IL-8 médié par CXCR1 et/ou CXCR2	-46-
Schéma 32. Régulation du réseau de cytokines stimulant la production d'IL-8	-47-
Schéma 33. Structures des gènes MIP-1	-47-
Schéma 34. Structure tertiaire de MIP-1 β humain	-48-
Schéma 35. Exemple de cascades d'activation des MMPs	-52-
Schéma 36. Structure des exons de la gélatinase B	-53-
Schéma 37. Eléments régulateurs des régions promotrices du gène de la MMP-9 humaine	-53-
Schéma 38. Inflammation médiée par les macrophages en réponse aux biomatériaux	-56-
Schéma 39. Influence du zinc sur la fonction des PMNs	-59-
Schéma 40. Effet du zinc sur la signalisation des TLRs	-61-
Schéma 41. Effet de la concentration en zinc sur la sécrétion des cytokines	-62-

RESULTATS

Publication 1 :

Figure 1. Phagocytose et/ou phagocytose frustrée de l'HA par les PMNs.	-70-
Tableau I. Mesure de la variation de concentration de 40 cytokines dans les surnageants de culture de PMNs au contact d'HA par Antibody Arrays.	-70-
Figure 2. HA induit une augmentation de la sécrétion de cytokines/chimiokines par les PMNs : évaluation par la technique d'Antibody Arrays.	-71-
Figure 3. Mesure en ELISA de la variation de concentration en IL-8 des surnageants de culture de PMNs au contact d'HA.	-71-
Figure 4. Activité gélatinolytique des surnageants de culture de PMNs au contact d'HA par zymographie.	-72-
Figure 5. Mesure des capacités chimioattractantes des surnageants de culture de PMNs au contact d'HA envers des monocytes ou des PMNs.	-72-
Figure 6. Proposition d'un modèle d'inflammation liée à l'activation des PMNs par les particules d'HA.	-73-

Publication 2 :

Tableau I.	Présentation des séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la PCR en temps réel et de leurs efficacités.	-84-
Figure 1.	HA5% diminue la production des ARNs messagers de l'IL-8 par les PMNs et sa concentration protéique dans les surnageants de culture.	-87-
Figure 2.	HA5% diminue le chimiotactisme des surnageants de culture des PMNs envers des PMNs fraîchement isolés.	-89-
Figure 3.	HA5% diminue l'activité gélatinolytique des surnageants de culture de PMNs mais ne régule pas la synthèse des ARN messagers de la MMP-9.	-91-
Figure 4.	Régulation de CXCR-1 et CXCR-2 en réponse au contact des PMNs avec HA et HA5% au niveau protéique et transcriptionnel.	-93-
Figure 5.	Effet du blocage différentiel de CXCR-1 et CXCR-2 sur l'expression et la production d'IL-8 par les PMNs.	-96-
Figure 6.	Effet du blocage différentiel de CXCR-1 et CXCR-2 sur l'activité gélatinolytique globale des surnageants de culture de PMNs.	-99-
Figure 7.	Proposition de mécanisme de la réponse inflammatoire des PMNs aux particules de biomatériaux et sa modulation par le zinc.	-104-

CONTEXTE

Avec le vieillissement de la population, les pathologies liées à la dégénérescence tissulaire sont de plus en plus nombreuses. Parmi elles, il existe des maladies dues à la dégradation du tissu cartilagineux (pathologies rhumatismales) ou osseux (ostéoporose). Ces deux types de pathologies peuvent amener à une perte de la fonction articulaire, soit directement, soit en facilitant les traumatismes tels que les fractures fémorales.

Il est aujourd'hui possible de pallier ces défaillances par des prothèses. Il en existe de divers types (polymères, métaux...), chacun étant adapté à la fonction de l'organe d'origine qu'il remplace (ménisque, fémur...). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux prothèses de hanches utilisées principalement dans des cas de fractures du col de fémur. Ces prothèses sont constituées majoritairement de titane et se trouvent couramment revêtues de biomatériaux, et notamment d'hydroxyapatite, favorisant leur intégration chez l'hôte.

L'ostéointégration de la prothèse chez l'hôte nécessite un remodelage de la matrice osseuse au contact de l'implant. Ce phénomène est dû aux ostéoclastes, cellules chargées d'assurer le remaniement osseux physiologique. On observe parallèlement une néosynthèse matricielle par les ostéoblastes. Cette balance entre dégradation et néoformation osseuse est la garante de la fonctionnalité du tissu osseux sain.

Cependant il a été démontré que le processus de remodelage osseux conduisait au relargage, sur le site périprothétique, de particules d'hydroxyapatite. Ces débris conduisent à une réaction inflammatoire qui va déréguler la balance entre dégradation et néosynthèse osseuses, aboutissant à une résorption osseuse exagérée et une désolidarisation de l'implant qui nécessitera d'opérer à nouveau le patient.

Cette réaction inflammatoire exacerbée a été étudiée très largement au niveau de la phase inflammatoire chronique. Cette phase se caractérise par la présence majoritaire de monocytes/macrophages, évoluant en cellules géantes plurinucléées. La réponse de ces cellules est bien caractérisée vis-à-vis des particules d'hydroxyapatite et il est également

connu que cette composante inflammatoire chronique peut être modulée, *in-vitro*, en utilisant une hydroxyapatite dont 5% des ions calcium sont substitués par des ions zinc.

Cependant très peu d'études sont disponibles concernant la phase inflammatoire aiguë et le rôle que jouent les cellules qui y sont majoritaires, les polynucléaires neutrophiles, lorsqu'elles se trouvent au contact de biomatériaux. Ce travail de thèse a donc pour but de montrer l'effet inflammatoire de l'interaction des polynucléaires neutrophiles humains avec les débris de biomatériaux et d'envisager de moduler cette réponse inflammatoire.

Ce manuscrit de thèse est organisé en trois parties :

La première partie est une introduction qui présente i) l'état de l'art concernant les pathologies de la hanche et la pose de prothèses, ii) l'hydroxyapatite et ses utilisations en médecine, iii) l'inflammation liée aux biomatériaux ; phase aiguë, polynucléaires neutrophiles, cytokines, chimiokines et protéases, et enfin iv) le zinc, ses rôles physiologiques et son implication dans l'inflammation.

La seconde partie présente au travers de deux articles les résultats obtenus durant ce travail de thèse. Un premier chapitre est consacré à la réponse inflammatoire due aux polynucléaires neutrophiles en réponse aux particules d'hydroxyapatite. Ces résultats font l'objet d'un article intitulé « Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction » qui a été publié dans le journal *Acta Biomaterialia*.

Le deuxième chapitre traite des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'effet immunomodulateur de l'hydroxyapatite substituée en zinc. Les résultats obtenus sont présentés dans un article intitulé « Effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils: potential modulatory role in bone implant-associated acute inflammation. » qui est soumis au journal *Biomaterials*.

Enfin, la troisième partie s'organise en une discussion/conclusion sur le rôle des polynucléaires neutrophiles dans la réponse inflammatoire aux particules de biomatériaux et sur les mécanismes cellulaires menant à une immunomodulation de cette inflammation par le zinc. Des perspectives sont proposées en dernier lieu pour approfondir ces travaux de thèse.

INTRODUCTION

A- La hanche

1- Anatomie

La hanche est une articulation des membres inférieurs à la jonction entre le bassin et le fémur (Schéma 1). Elle possède trois degrés de liberté (flexion/extension, adduction/abduction, rotation interne/rotation externe) et est notamment nécessaire à la marche.

La partie articulaire du bassin (ou pelvis) est une cavité hémisphérique appelée cotyle ou acetabulum. L'extrémité supérieure du fémur, appelée tête fémorale est articulée avec le cotyle et reliée au reste du fémur par le col du fémur. Les surfaces osseuses de la tête fémorale et de la cavité acétabulaire du bassin sont recouvertes de cartilage dont le rôle est de limiter les frictions liées aux mouvements.



Schéma 1. Anatomie de la hanche (D'après Jonhson, disponible sur http://www.orthopaedics.co.uk/boc/patients/total_hip_indications.htm)

La hanche est désaxée par rapport à l'axe du corps et ceci induit de très fortes contraintes mécaniques. Aussi le cartilage, et parfois l'os sous jacent, s'usent et perdent leurs propriétés de glissement et leur sphéricité, entraînant des pathologies douloureuses.

2- Pathologies de l'articulation coxo-fémorale

2.1- Les coxarthroses

Il s'agit des affections les plus fréquentes de la hanche. L'évolution de ces pathologies conduit le plus souvent à une restauration de la fonction articulaire par voie chirurgicale. Les coxarthroses primitives, d'étiologie souvent indéterminée, se déclarent en moyenne autour de soixante ans alors que les coxarthroses secondaires, majoritaires et consécutives à une cause précise, se développent en moyenne une dizaine d'années plus tôt (Kaplan *et al*, 1990). Ces pathologies se manifestent par des douleurs de type mécanique, c'est à dire survenant lors d'efforts physiques, dans les stades précoces de la maladie pour évoluer vers des douleurs inflammatoires (non atténuées par le repos) au cours de la pathologie.

Les coxarthroses peuvent être le résultat d'une malformation congénitale de type dysplasie (luxante ou protrusive), d'une malformation acquise (ostéochondrite, épiphysiolyse...) ou encore survenir en tant que séquelle de coxites, ostéonécrose, coxarthrose post traumatique ou même à force d'activités sportives intensives (Kaplan *et al*, 1990). Elles peuvent également résulter d'autres pathologies non liées directement à l'articulation coxo-fémorale, telles que l'hémochromatose, l'acromégalie, la maladie de Paget... (Nordin *et al*, 1992). Il existe également des coxarthroses dites « destructrices rapides ». Ces pathologies d'origine non-déterminée se caractérisent par une évolutivité très rapide, se soldant par une destruction totale de l'articulation coxo-fémorale (18 mois peuvent suffire). A ce jour, le seul traitement reconnu comme efficace consiste en la chirurgie prothétique (Richette, 2009).

2.2- La chondrocalcinose

Il s'agit d'une pathologie caractérisée par la présence de dépôts de microcristaux de pyrophosphate de calcium dans le liquide synovial. L'évolution de cette maladie en coxarthrose entraîne une destruction de l'articulation importante, notamment par l'érosion de la tête fémorale et le creusement du cotyle (Kaplan *et al*, 1990). Si le plus souvent l'étiologie de la chondrocalcinose n'est pas connue, il a été récemment montré qu'il existe des formes familiales de cette maladie mettant en jeu une mutation du gène ANKH codant une protéine impliquée dans le métabolisme des pyrophosphates (Netter *et al*, 2004).

2.3- Les coxites

Cette atteinte de la hanche est assez peu fréquente mais grave, compte tenu de la rapidité de son évolution. Elle est due à un syndrome inflammatoire générant fièvre et douleurs nocturnes. La survenue d'une coxite est prépondérante dans le cadre de pathologies rhumatismales telles que la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante (Berrebi, 2003). Bien qu'un traitement adapté et précoce réduise l'évolution de la maladie, des séquelles arthrosiques sont quasiment inévitables et conduisent à la perte de fonction articulaire (Kaplan *et al*, 1990).

Il existe également des coxites microbiennes, plus fréquentes. Une antibiothérapie adaptée permet de limiter la destruction ostéocartilagineuse. Les agents infectieux peuvent être très différents selon les cas : *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium avidum* (Million *et al*, 2008)...

2.4- L'ostéonécrose de la tête fémorale

Cette coxopathie fréquente (Schéma 2) peut avoir de multiples causes : corticothérapie à long terme, éthylisme, fracture du col du fémur... Elle survient majoritairement autour de quarante ans (Malizos *et al*, 2007). L'évolution vers une coxarthrose est inévitable en dépit de phases de stabilisation patients-dépendantes (Kaplan *et al*, 1990).



Schéma 2. Ostéonécrose symptomatique de la hanche gauche. a) Radiographie antéropostérieure et b) coupe coronale par IRM pondérée en T1 mettant en évidence les zones de nécrose (flèches blanches). (D'après Malizos *et al*, 2007)

2.5- Les périarthrites de la hanche

Il s'agit d'affections fréquentes dues à des inflammations aiguës des principaux groupes tendineux de l'articulation. Majoritairement, on observe une tendinite des pelvitrochanteriens se caractérisant par une inflammation douloureuse au pourtour du grand trochanter. Il est possible que cette périarthrite provoque une calcification accrue du pôle supérieur du grand trochanter, signe d'une évolution de la pathologie vers un rhumatisme à l'hydroxyapatite. Quoiqu'il en soit, l'évolution est spontanément régressive sous traitement (infiltrations) (Kaplan *et al*, 1990).

2.6- L'algodystrophie de la hanche

Elle se traduit par une forte déminéralisation de l'articulation (Schéma 3). Généralement post-traumatique, l'algodystrophie peut aussi être une conséquence de la grossesse. Dans tous les cas de figures, la pathologie est douloureuse et invalidante, mais couramment un simple traitement antalgique est prescrit. En effet, l'évolution de la maladie est toujours, et rapidement (de l'ordre de quelques mois), favorable à un retour de la fonction articulaire (Sellami *et al*, 2006). Toutefois, cette pathologie induit une fragilité articulaire susceptible d'entraîner des fractures nécessitant une intervention de chirurgie prothétique.

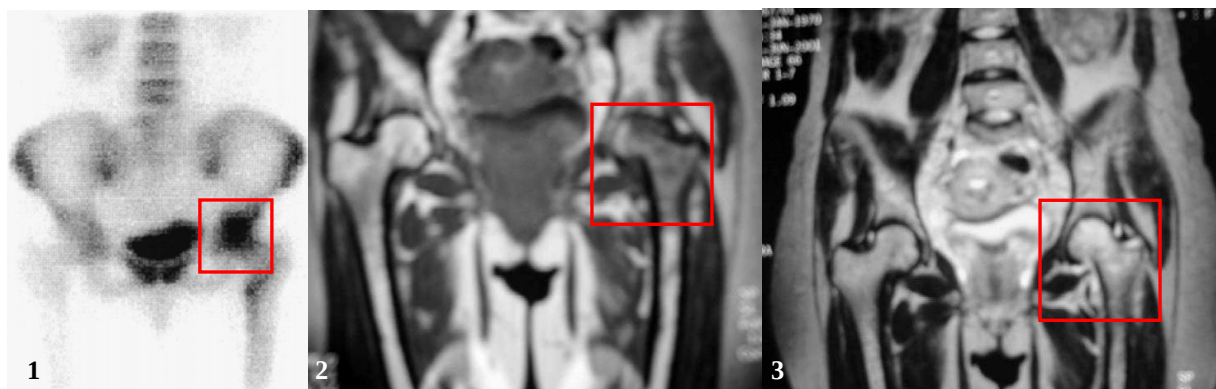


Schéma 3. Diagnostic d'algodystrophie par 1) Hyperfixation sur la tête fémorale gauche détectée par scintigraphie osseuse 2) hyposignal de la tête fémorale gauche par IRM pondérée en T1 3) hypersignal de la tête fémorale gauche par IRM pondérée en T2. (D'après Sellami *et al*, 2006)

2.7- Les autres affections de la hanche

Il existe de nombreuses autres pathologies touchant l'articulation de la hanche sans pour autant qu'il s'agisse de pathologies régionales.

L'ostéosarcome (surtout chez les patients jeunes) ou le sarcome d'Edwing (majoritairement fémoral) sont des cancers osseux dont l'exérèse peut s'avérer nécessaire et conduire à une reconstruction chirurgicale et/ou prothétique des zones ainsi lésées (Hosalkar *et al*, 2005). Le développement tumoral peut également avoir une action lytique aboutissant à la destruction de structures anatomiques locales de l'articulation coxo-fémorale (Kaplan *et al*, 1990).

L'ostéoporose et l'ostéomalacie sont deux maladies caractérisées par une déminéralisation osseuse importante et généralisée, augmentant sensiblement le risque de fractures, notamment du col du fémur (Reginato *et al*, 2003; Lewiecki, 2009). Ces fractures sont souvent l'occasion du diagnostic de la pathologie et leur traitement accompagne alors la chirurgie prothétique pour un recouvrement fonctionnel.

Ces deux exemples sont bien entendu non-exhaustifs, mais montrent que les pathologies rhumatoïdes ne sont pas les seules à conduire à la nécessité de remplacer tout ou partie de l'articulation coxo-fémorale afin de *i)* rendre au patient son autonomie et *ii)* enrayer les phénomènes douloureux et invalidants engendrés par les mouvements de la vie quotidienne.

3- Les différents types de prothèses de hanche

3.1- Les prothèses de resurfaçage

Il s'agit de prothèses qui proposent de ne remplacer que la surface endommagée de la tête fémorale et du cotyle (Itayem *et al*, 2007). Les surfaces impliquées sont fixées par des vis engagées dans le pelvis pour le cotyle et dans le col fémoral pour la tête fémorale (Schéma 4).

Ce traitement permet de conserver au maximum le patrimoine osseux du patient et est une alternative à la prothèse totale de hanche, notamment dans le traitement des coxarthroses (Daniel *et al*, 2004). Les surfaces au contact peuvent être métalliques (McMinn *et al*, 2005), céramiques, en polyéthylène (Heisel *et al*, 2005) ou mixtes (Schéma 5).

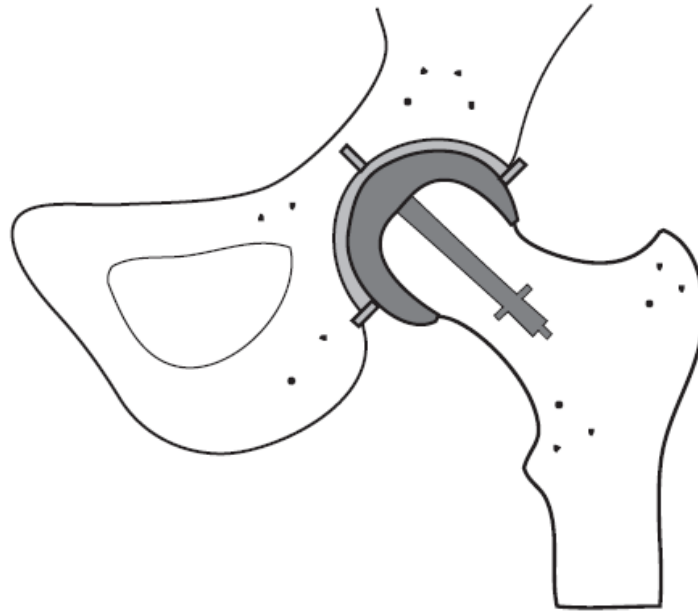


Schéma 4. Fixation d'un implant de resurfaçage de hanche de type Birmingham.
(D'après Itayem *et al*, 2007)

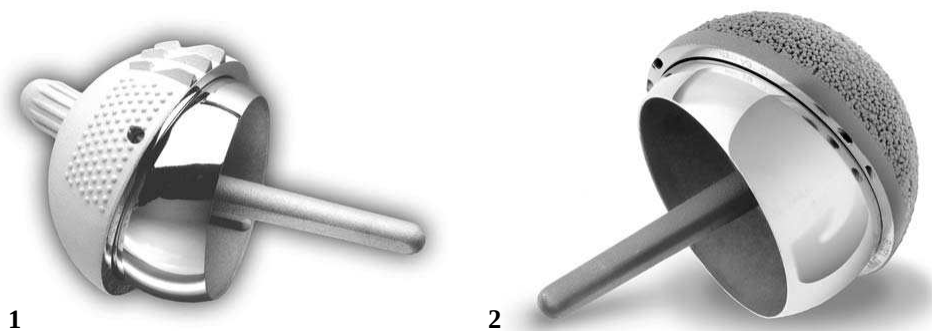


Schéma 5. Implants de resurfaçage de hanche de type 1) McNimm et 2) Birmingham.
(D'après Daniel *et al*, 2004)

3.2- Les prothèses céphaliques

Créées dans les années 1950 par Austin Moore aux Etats-Unis et Robert Judet en France, elles remplacent uniquement l'extrémité supérieure du fémur. Ce sont des prothèses monoblocs, majoritairement faites en titane, encastrées dans l'os (Schéma 6). Elles sont principalement utilisées dans le traitement des fractures du col du fémur. Puisqu'elles restent en regard du cotyle non modifié, elles frottent contre le cartilage acétabulaire entraînant, à

terme, une érosion importante de ce dernier. Elles sont donc préférentiellement réservées aux patients âgés avec un périmètre de marche restreint (Norrish *et al*, 2006).



Schéma 6. Radiographie d'une prothèse de hanche céphalique de Moore. (D'après Heywood-Waddington MB, 1966)

3.3- Les prothèses intermédiaires

Les premiers modèles sont ceux de Christiansen à la fin des années 1960 (Christiansen, 1969). On appelle prothèses intermédiaires (ou bipolaires) les prothèses de hanche présentant une articulation entre le cotyle et la prothèse, mais également au sein même de la prothèse (Schéma 7). Ces prothèses articulées ne nécessitent pas d'intervention de scellement sur le cotyle (Gschwind *et al*, 2008).

Lors des mouvements, la tête de la prothèse ne bouge pratiquement pas dans le cotyle, limitant l'usure du cartilage (Parker *et al*, 2006). Les matériaux employés sont principalement le titane pour la partie fémorale, et les parties articulées peuvent être métalliques, plastiques ou céramiques.



Schéma 7. Prothèse intermédiaire type Charnley-Hastings. (D'après Gaine *et al*, 2000)

3.4- Les prothèses totales

Elles remplacent à la fois l'extrémité supérieure du fémur par une prothèse fémorale et le cotyle par un cotyle prothétique (Schéma 8). Les prothèses totales de hanche (PTH) sont surtout mises en place en cas d'atteinte des deux surfaces articulaires (tête fémorale et cotyle). On les utilise, dans certains cas, pour le traitement des fractures du col du fémur chez le sujet encore jeune afin d'éviter le risque d'usure du cartilage du cotyle engendré par l'utilisation de prothèses céphaliques voire intermédiaires. Comme pour la majorité des prothèses orthopédiques, le matériau de référence reste l'alliage de titane pour la partie fémorale et différents matériaux variant selon les fabricants pour la tête fémorale et le cotyle.



Schéma 8. Prothèse totale de hanche revêtue d'hydroxyapatite (modèle Anatomique Benoist Girard de Stryker). (D'après Oosterbos *et al*, 2001)

4- Fixation des prothèses

Les prothèses peuvent être fixées au fémur ou dans le bassin soit par un ciment chirurgical, soit par repousse osseuse secondaire (sans ciment). La fixation par vis des cotyles prothétiques est considérée comme une fixation par repousse secondaire. Les deux techniques donnent des résultats relativement similaires à long terme, et le choix est principalement fonction du praticien (Morshed *et al*, 2007).

4.1- Fixation par ciment

Le ciment chirurgical est un polymère acrylique qui durcit en une quinzaine de minutes pendant l'intervention, la fixation est immédiatement solide et permet en théorie une charge complète.

Les premières études réalisées sur ce type de fixation montraient à 5 ans environ 20% de descellement prothétique et 30% à 40% à 10 ans (Stauffer, 1982). Cependant ce taux diminue à environ 20% pour les prothèses acétabulaires et 7% pour les fémorales dans des études plus récentes (Garcia-Cimbrello *et al*, 1992) sur 15 à 20 ans. Avec l'amélioration des techniques et ciments, certains auteurs arrivent à des résultats proches de 100% des prothèses non descellées à 10 ans (Lachiewicz *et al*, 2003; Meneghini *et al*, 2003).

4.2- Fixation sans ciment

Les prothèses (tige ou cupule) sans ciment, se stabilisent dans un délai de six à douze semaines selon le traitement de leur surface par un phénomène de repousse osseuse (Svehla *et al*, 2000). Le principe des revêtements de surface ostéoconducteurs des prothèses est apparu dans les années 1980 (Geesink *et al*, 1988): on projette (par une torche à plasma) une couche d'hydroxyapatite qui vient se fixer à la surface des prothèses. L'hydroxyapatite (HA) favorise l'intégration de l'implant et la repousse osseuse (Svehla *et al*, 2000), et les résultats sont concluants à partir de fines épaisseurs de revêtement (100 μ m) (Svehla *et al*, 2002). L'efficacité du revêtement d'HA a été démontrée depuis plusieurs années (Palm *et al*, 2002), mettant en évidence une très bonne ostéointégration sur le long terme (8 ans d'utilisation par les patients).

Avec un recul supérieur à dix ans, les revêtements ostéoconducteurs apparaissent comme le meilleur procédé de fixation des prothèses de hanche, aussi bien au niveau du

fémur qu'au niveau du cotyle. Certaines études montrent que 90% de PTH (Kawamura *et al*, 2001) voire jusqu'à 100% de prothèses fémorales et 97% de prothèses acétabulaires (Oosterbos *et al*, 2004) ne présentent aucun signe de descellement.

Cependant, en marge des revêtements, il a été montré que les implants non revêtus, mais dont la surface était traitée pour être poreuse, pouvaient également induire une repousse osseuse (Christie *et al*, 1999 et 2000) (Schémas 9 et 10) et que la taille de ces pores était importante (Bobyne *et al*, 1980).

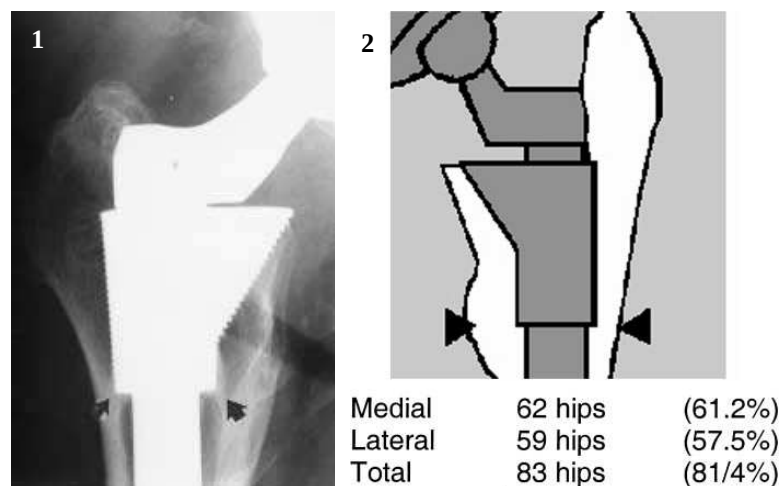


Schéma 9. 1) Repousse osseuse (flèches noires) à l'abord d'une prothèse non revêtue après 5 ans (D'après Christie *et al*, 1999) et 2) schéma de la localisation de cette repousse osseuse (D'après Christie *et al*, 2000).

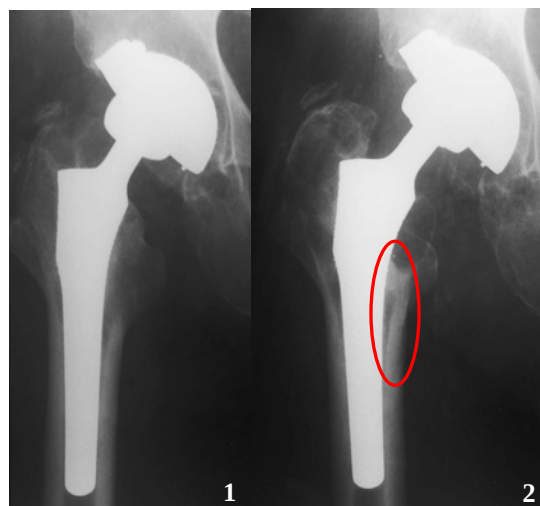


Schéma 10. Radiographies à 1) 3 ans et 2) 13 ans montrant une ossification périprothétique d'une prothèse chrome-cobalt avec revêtement poreux. (D'après Kawamura *et al*, 2001)

5- Les complications

5.1- Le déboitement

Une complication courante est la luxation de la tête de la prothèse hors du cotyle prothétique (Lee, 2008). Ce déboitement peut concerner jusqu'à 5% des prothèses sur une vingtaine d'années (Sierra *et al*, 2006). Souvent ce phénomène est récurrent (Barnes *et al*, 1995) et impose une nouvelle intervention chirurgicale du patient.

5.2- Les paralysies nerveuses

On observe également des complications nerveuses telles que la paralysie (Barrack, 2004). De fréquence exceptionnelle (environ 1%), elles touchent principalement le nerf sciatique et le pronostic de recouvrement fonctionnel est d'environ 80% (Schmalzried, 1997).

5.3- Les fractures périprothétiques

Les fractures périprothétiques peuvent être acétabulaires ou fémorales. Elles surviennent majoritairement durant le geste opératoire avec une prévalence accrue lors de l'insertion de la tige fémorale, et ceci est d'autant plus vrai qu'il s'agit de tiges non cimentées devant être insérées en force. Il est également possible d'observer, mais moins fréquemment, des fractures postopératoires. Les révisions de prothèses sont également un facteur de risque important. (Lindahl, 2007).

5.4- Le descellement septique

Les cas d'infections menant au descellement prothétique sont rares (2% en moyenne) (Salemi *et al*, 1997; Barnes *et al*, 2006; Lohman *et al*, 2007) mais souvent graves (Eid *et al*, 2007, Ong *et al*, 2009). Il existe également des cas encore plus rares, mais tout de même répertoriés, d'échecs de prothèse dus à des phénomènes allergiques (métallose) (Biant *et al*, 2009) ou à des métastases cancéreuses (Dramis *et al*, 2008). Dans tous les cas le descellement est mis en évidence radiologiquement et montre une forte résorption osseuse à l'interface os/implant.

5.5- Le descellement aseptique

Le descellement aseptique des prothèses est la cause majeure d'échec d'implants pour les arthroplasties de la hanche. Le taux d'échec peut atteindre 20% (Mulroy *et al*, 1996) à 25% (Wirtz *et al*, 1997; Wooley *et al*, 2004) selon les études et que l'on considère séparément ou non les parties acétabulaires et fémorales.

Bien qu'étant une pathologie multifactorielle, la composante inflammatoire chronique conduisant à l'ostéolyse est bien documentée (Schéma 11). Ces phénomènes mettent en jeu les macrophages (Hukkanen *et al*, 1997) qui favorisent l'activité ostéoclastique par le biais des cytokines qu'ils relarguent en réponse à la phagocytose des débris des biomatériaux composant les implants (Greenfield *et al*, 2002). Notamment, l'interleukine-8 (IL-8) a été retrouvée augmentée dans le sérum et le liquide synovial de patients présentant une ostéolyse (Tanaka *et al*, 2005).

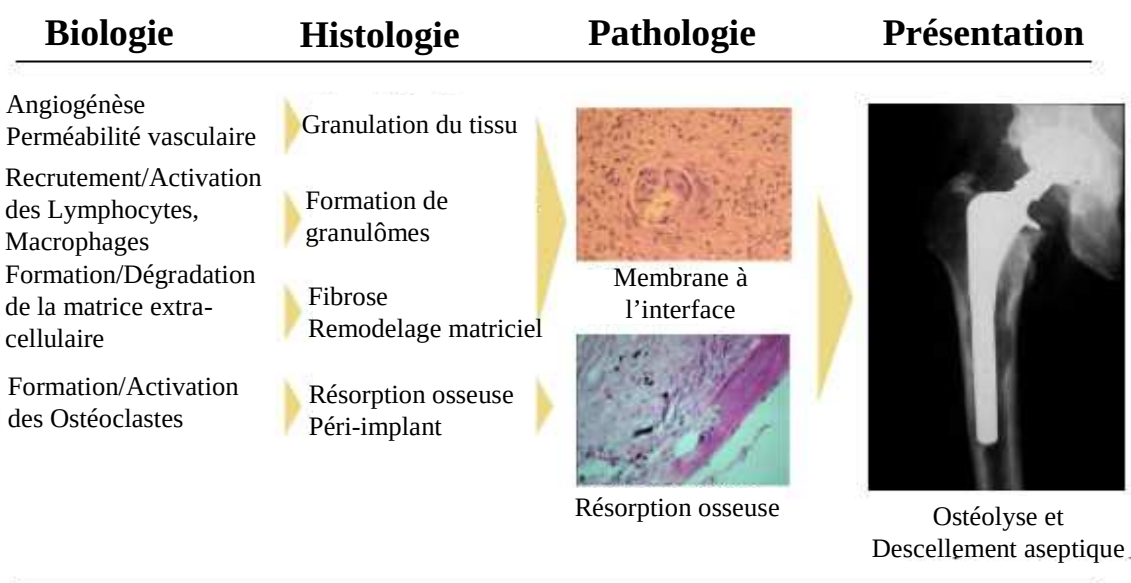


Schéma 11. Modèle d'ostéolyse et descellement aseptique. (D'après Garrigues *et al*, 2005)

Les pathologies de l'articulation coxo-fémorale aboutissent le plus souvent à la nécessité de poser une prothèse. C'est pourquoi la recherche dans le domaine des substituts osseux est en évolution constante. Notamment, l'intérêt de notre étude repose en partie sur le fait que l'HA est le biomatériau le plus utilisé en chirurgie orthopédique grâce à ses qualités biologiques telles qu'une structure analogue à la phase minérale osseuse et la favorisation de la repousse osseuse.

B- L'hydroxyapatite

1- Généralités

L'hydroxyapatite est une céramique phosphocalcique. Elle appartient à la famille cristallographique des apatites, un ensemble de composés possédant une même structure hexagonale (Kay *et al*, 1964). Ses principales utilisations sont le revêtement de prothèses et le comblement osseux (blocs de céramique phosphocalcique, ciments ioniques...) (Jarcho, 1981 ; De Groot, 1993; Finkemeier, 2002). L'hydroxyapatite est naturellement présente chez l'homme. Elle est le composant majoritaire de la phase minérale osseuse et représente environ 67% de la masse de l'os (Nanci, 2008). Les apatites naturelles sont le plus souvent non-stœchiométriques, c'est à dire qu'elles présentent un rapport calcium sur phosphore (Ca/P) inférieur à 1,67 en raison de l'incorporation de constituants mineurs de l'environnement (cations, anions...) (Mayer *et al*, 2000). L'hydroxyapatite synthétique, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, affiche quant à elle un rapport Ca/P de 1,67 et est donc stœchiométrique. Il existe d'autres phosphates de calcium présentant des rapports Ca/P différents qui donnent lieu à une classification des composés obtenus : pour des valeurs comprises entre 1 et 1,33, il est question de phosphates dicalciques parmi lesquels se trouve la brushite (Johnsson *et al*, 1992), entre 1,33 à 1,5 se trouvent les phosphates octocalciques, et pour des valeurs allant de 1,5 à 1,67 on trouve les hydroxyapatites déficitaires en calcium (Han *et al*, 2001).

2- Les modes d'obtention

2.1- L'élaboration par précipitation en milieu aqueux

La synthèse d'hydroxyapatite par précipitation en phase aqueuse est obtenue en ajoutant de façon contrôlée une solution cationique (contenant le calcium) à une solution anionique (contenant le phosphore) (Akao *et al*, 1981). Le précipité ainsi obtenu est ensuite lavé et séché (Schéma 12). Différentes méthodes faisant intervenir différents réactifs sont bien entendu possibles : pour exemple, considérant la formule



$10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ est la solution cationique et $6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ la solution anionique (D'après Rodriguez-Lorenzo *et al*, 2001).

- 1.- Réactifs
- 2.- Pompe péristaltique
- 3.- Contrôle de la température
- 4.- Contrôle de l'agitation
- 5.- Récipient de réaction
- 6.- Valve d'admission
- 7.- Agitateur
- 8.- Soupape d'échappement
- 9.- Valve de sécurité
- 10.- Chambre thermostatique

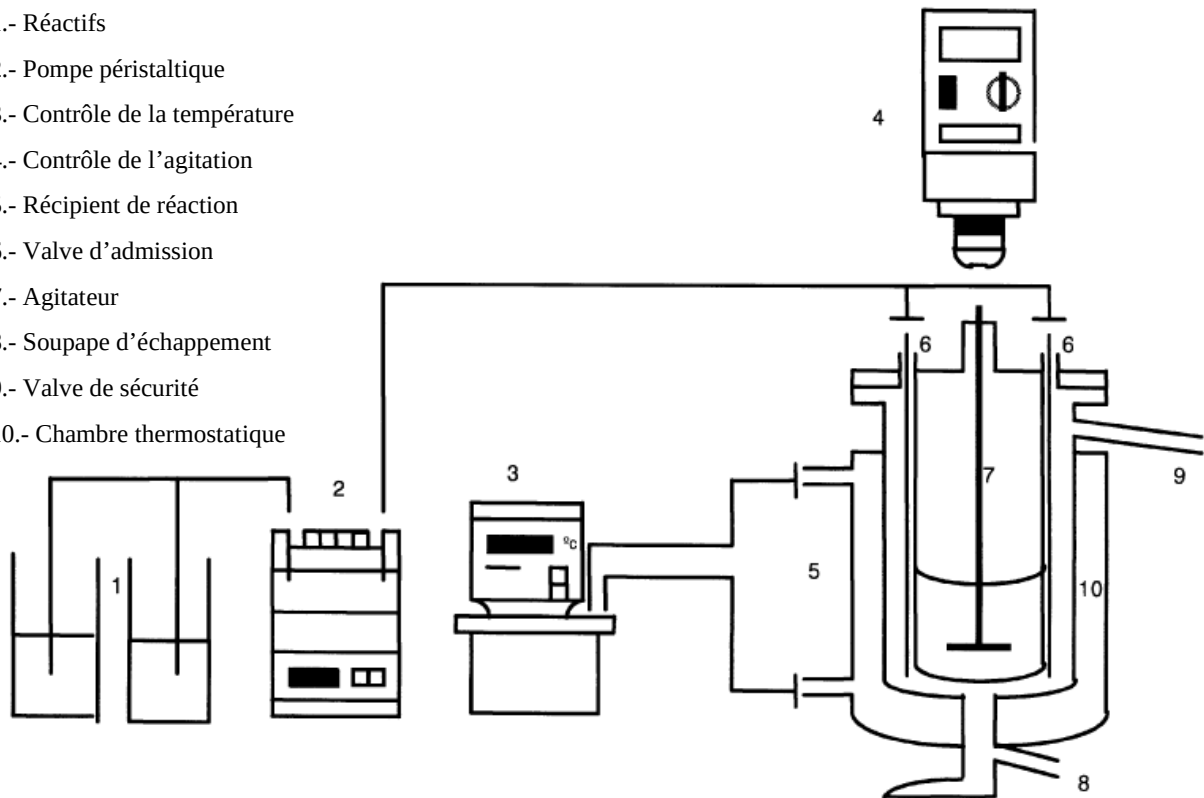


Schéma 12. Dispositif de cristallisation de l'hydroxyapatite par précipitation. (D'après Rodriguez-Lorenzo *et al*, 2001)

Il est également possible d'obtenir un précipité d'hydroxyapatite par neutralisation d'une solution de chaux par ajout d'une solution d'acide phosphorique. Cette réaction permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'hydroxyapatite phosphocalcique avec peu de matériel (Osaka *et al*, 1991).

2.2- L'élaboration par réaction en phase solide

La synthèse par réaction en phase solide consiste à chauffer un mélange réactionnel, constitué de pyrophosphate de calcium et de carbonate de calcium dans un rapport molaire $\frac{3}{4}$ afin d'obtenir un Ca/P de 1,67 (Rhee, 2002). Ce mélange doit être parfaitement homogène pour permettre une réaction totale.

2.3- L'élaboration par solution-gélification

La technique « sol-gel » correspond à la transformation d'une solution en un solide (Livage *et al*, 1992). Là encore, différentes chimies sont envisageables : du phosphate

d'ammonium et du nitrate de calcium gélifiés par de l'urée (Bezzi *et al*, 2003), du nitrate de calcium et du phosphate dissous dans de l'éthanol qui, une fois évaporés, permettent l'obtention d'une poudre d'hydroxyapatite hautement pure avec une homogénéité chimique favorisée comparativement à la méthode de précipitation (Jallot *et al*, 2005) (Schéma 13).

Ce procédé permet en outre de facilement envisager la substitution ionique du calcium par des éléments traces naturellement présents dans les os (Jallot *et al*, 2005). En outre, pour ce travail de thèse, cette méthode a été à la base de l'élaboration des biomatériaux, dopés ou non, que nous ont fournis Edouard Jallot et Jean-Marie Nedelec de l'Université Blaise Pascal à Clermont-Ferrand.

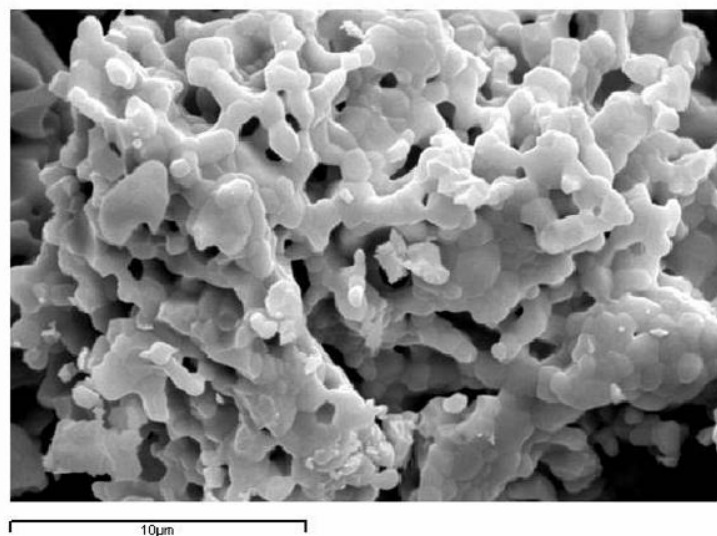


Schéma 13. Photographie en microscopie électronique à balayage (MEB) d'une poudre d'HA obtenue par sol-gel. (D'après Jallot *et al*, 2005)

3- Les utilisations

3.1- Les revêtements prothétiques

3.1.1- Dépôt par torche à plasma

Ce processus est utilisé industriellement depuis les années 80 (Geesink, 1989; Furlong *et al*, 1991) et est désormais la méthode la plus répandue pour appliquer l'hydroxyapatite à la surface des implants dentaires et orthopédiques (Schéma 14). La poudre d'hydroxyapatite est

injectée dans la flamme du plasma et se trouve alors accélérée à plus de 200 m.s^{-1} . Elle va alors frapper le substrat et se coller sur le titane sous-jacent sous l'effet de l'énergie cinétique libérée à l'impact (Fauchias *et al*, 1992 ; Pfender 1994).

Le revêtement phosphocalcique des prothèses s'est répandu car il permet une fixation rapide et forte de l'os sur l'implant (Geesink 1988, Stephenson 1991).

Cependant, le procédé torche à plasma présente quelques inconvénients. Il induit la présence de différentes espèces phosphocalciques à la surface de l'implant : α et β phosphate tricalcique (TCP), phosphate tetracalcique, oxyde de calcium et phosphate de calcium amorphe (De Groot *et al*, 1994; Kim *et al*, 1994). Notamment cette dernière composante voit sa quantité varier fortement entre les différents fabricants. De nombreux paramètres entrent en jeu dans ces variations : distance du substrat, taille des particules projetées, angle du substrat, débit de gaz du plasma et refroidissement de la pièce revêtue entre autres (Gross *et al*, 1998). Cette phase amorphe modifiant la réaction de l'os au contact de l'implant, il convient donc de la maîtriser et de normaliser sa quantité (Sun *et al*, 2001).

Par ailleurs, le recouvrement n'est pas uniforme en densité et des altérations chimiques et structurales du matériau de recouvrement ont été décrites lors de l'utilisation du procédé torche à plasma (Filiaggi *et al*, 1991; Radin *et al*, 1992).

Enfin, si la fixation de l'os sur la prothèse augmente avec la présence d'hydroxyapatite, la fixation globale de l'implant n'est pas améliorée comparativement aux prothèses non-revêtues puisque la zone de jonction entre le titane et l'hydroxyapatite est une zone de fragilité (Ong *et al*, 2004). Cependant de par son rendement, cette technique de torche à plasma est aujourd'hui la seule viable industriellement vu les contraintes de production.

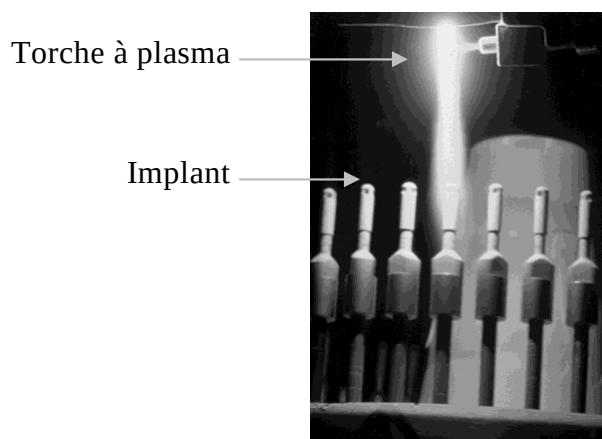


Schéma 14. Implants dentaires en cours de revêtement par torche à plasma (D'après Sun *et al*, 2001).

3.1.2- Electrodeposition

Cette technique de revêtement permet de recouvrir d'hydroxyapatite des substrats à faible température (65°C) (Dumelie et al, 2008) et sans utiliser de poudre de biomatériau préalablement élaborée (Han *et al*, 1999) (Schéma 15). La technique se déroule en deux temps : tout d'abord le dépôt du phosphate de calcium puis sa conversion en hydroxyapatite par des traitements appropriés. En l'occurrence, la brushite obtenue à l'issue de l'électrodéposition subit un traitement hydro-thermique (125°C en atmosphère humide saturée) avant d'être cuite à plus de 400°C pour finalement donner un revêtement d'hydroxyapatite stœchiométrique (Benhayoune *et al*, 2002). Bien que transposable dans le monde industriel, cette méthodologie est trop chronophage en l'état pour satisfaire aux exigences du marché.

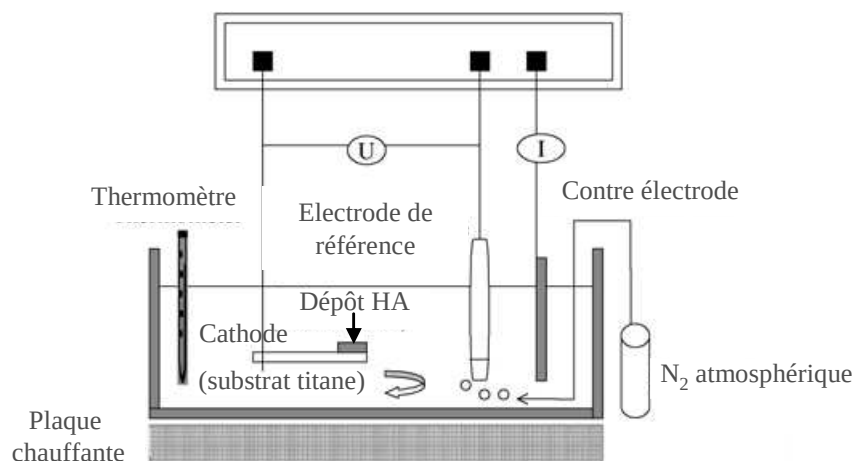


Schéma 15. Dispositif d'électrodéposition d'hydroxyapatite (D'après Benhayoune *et al*, 2002)

3.2- Le comblement osseux

La résection et le curetage de tumeurs osseuses, même bénignes, entraîne des opérations de comblements osseux (Matsumine *et al*, 2004). La fréquence de ces interventions fait du tissu osseux le second tissu transplanté après le sang (Van Heest *et al*, 1999; Boyce *et al*, 1999) avec 2,2 millions d'interventions annuelles à travers le monde (Giannoudis *et al*, 2005).

Dans ce cadre, la greffe osseuse autologue est la méthode de référence. Elle consiste en la greffe d'os cortical ou spongieux issu du donneur même. La fraction osseuse est obtenue depuis la crête iliaque du patient. Les avantages de la technique reposent sur le fait que le greffon possède toutes les qualités nécessaires à sa bonne intégration : il est à la fois ostéoconducteur, ostéoinducteur, ostéogène et ne déclenche pas de réponse immunitaire susceptible de provoquer un rejet. Cependant, ces atouts sont à mettre en balance avec un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, la quantité de matériel osseux qu'il est possible d'obtenir ne permet pas de combler les larges cavités et ceci est d'autant plus vrai lorsque le patient est un enfant. De plus, on observe un risque accru de hernies, traumatismes neuro-vasculaires, infections, hématomes ou encore douleur chronique (Reddy *et al*, 2005) lié à la nécessité d'avoir un second site opératoire. Par ailleurs, les temps d'opération et donc d'anesthésie sont considérablement allongés. L'allogreffe et la xenogreffe, quant à elles, posent le problème du stockage des échantillons, de leur préservation et surtout de la transmission éventuelle de pathologies (Natarajan *et al*, 2003).

L'hydroxyapatite est compatible avec l'os et la moëlle osseuse (Uchida *et al*, 1990) et présente, dans le cadre d'un comblement osseux, une bonne intégration à l'os hôte en radiologie bien que n'étant pas entièrement résorbée (Matsumine *et al*, 2004) (Schéma 16).

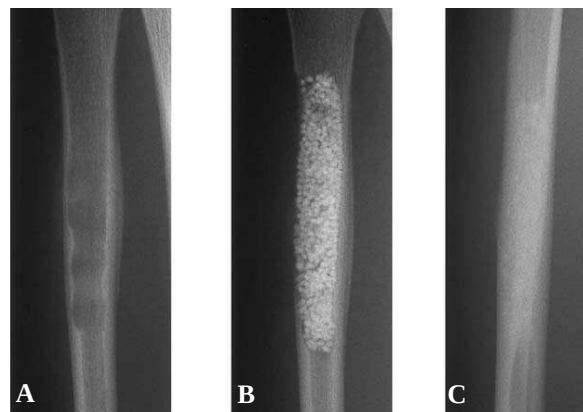


Schéma 16. Radiographie d'ostéolyse diaphysaire de fibula (A), comblée par de l'hydroxyapatite (B) (un mois après opération) qui à terme est résorbée à plus de 50% (C) (10 ans après opération). (D'après Matsumine *et al*, 2004).

L'hydroxyapatite, en tant que substitut osseux, peut être obtenue sous forme de blocs mais nécessite une mise en forme par le chirurgien en fonction de la zone à combler (Kent *et al*, 1986). Elle est également disponible sous forme de particules (Schémas 17 et 18).

Cependant ces particules ont le désavantage de migrer du site d'implantation en fonction des contraintes mécaniques qu'elles subissent (Wittkamp, 1988).

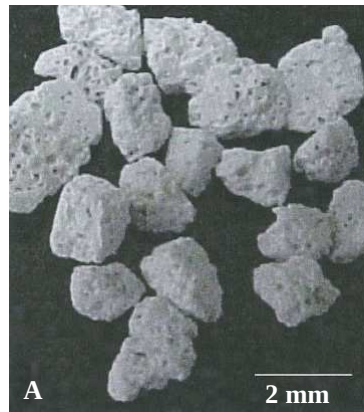


Schéma 17. Exemple de granules phosphocalciques commercialisés (Bonesave® Stryker). (D'après Voor *et al*, 2004).



Schéma 18. Grains d'hydroxyapatite utilisés pour le comblement osseux (A) d'une cavité de la partie proximale de la fibula (B) (Radiographie préopératoire) et la cavité comblée juste après l'opération (C). (D'après Saikia *et al*, 2008).

3.3- Les ciments

Les premiers ciments furent utilisés pour le scellement prothétique et étaient composés de poly(méthylmétacrylate) (PMMA) (Morita *et al*, 1998). Si leurs capacités adhésives étaient satisfaisantes, ils ne facilitaient pas la repousse osseuse et ont évolué vers des ciments de nouvelle génération dans lesquels sont incluses des particules d'hydroxyapatite, notamment pour la fixation des prothèses orthopédiques (Oonishi *et al*, 2008), mais aussi pour le comblement osseux de zones où les cristaux ne sont pas adaptés (Li *et al*, 2009) (Schéma 19).



Schéma 19. Radiographies montrant l'absorption et l'intégration d'un ciment phosphocalcique par le tissu osseux après implantation: (a) à 3 jours; (b) 4 semaines; (c) 8 semaines, et (d) 12 semaines. (D'après Li *et al*, 2009).

Les ciments à base d'hydroxyapatite sont également utilisés en reconstruction craniofaciale (Friedman *et al*, 1998) et permettent de combler des cavités de plus de 25 cm² lorsqu'ils sont couplés à des supports de type grille de titane (Durham *et al*, 2003; Abe *et al*, 2009). Ces ciments peuvent être fonctionnalisés avec, par exemple, de l'oxyde de zinc et du chitosan (Li *et al*, 2009).

L'utilisation de l'hydroxyapatite est de plus en plus courante et favorisée par les résultats encourageants obtenus en terme d'ostéointégration du matériau. Cependant, comme cela a été mentionné précédemment, la genèse de particules d'HA par usure de l'implant ou réponse biologique de l'hôte peut être problématique, surtout en orthopédie, où ces particules sont considérées comme un facteur majeur de l'inflammation aboutissant au descellement des prothèses.

L'inflammation mise en place par l'hôte en réponse aux particules de biomatériaux suit des étapes définies avec des acteurs spécifiques pour chacune d'entre elles (Schéma 20). La plus étudiée est la phase inflammatoire chronique et, plus particulièrement, la réponse des monocytes et macrophages. Notre travail s'intéresse à l'inflammation aiguë et plus spécifiquement aux polynucléaires neutrophiles. Cette phase inflammatoire est très peu documentée jusqu'alors dans le cadre des particules d'HA mais est pourtant de première importance puisqu'elle initie la réponse immunitaire aux biomatériaux.

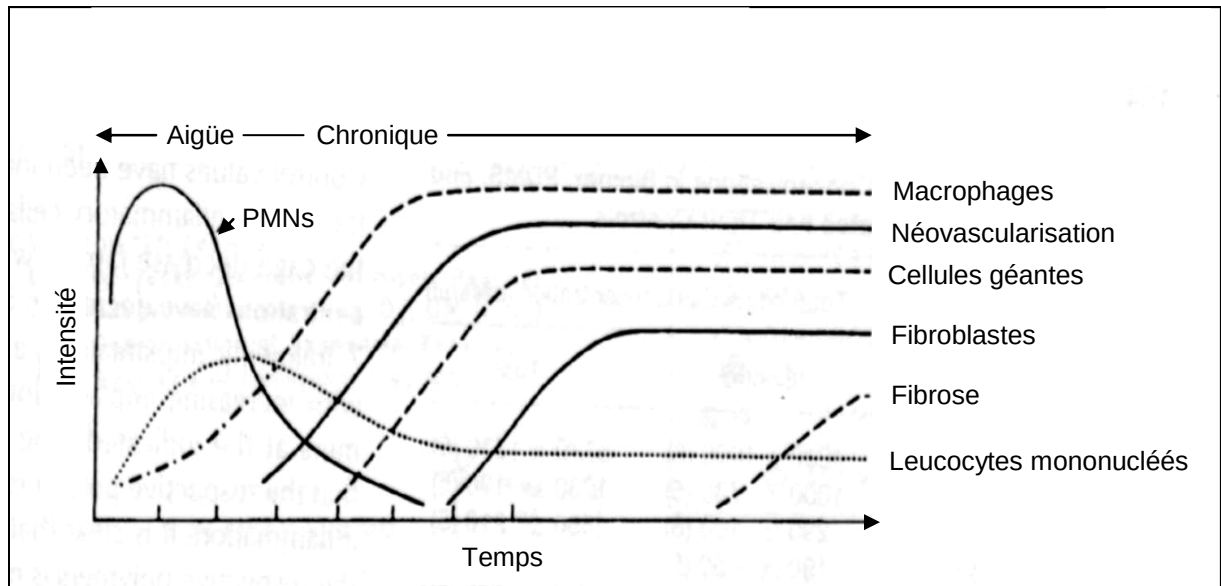


Schéma 20. Evolution de l'inflammation liée aux biomatériaux. (D'après Anderson, 1988)

C- Inflammation aiguë et polynucléaire neutrophile

1- Caractéristiques

L'inflammation est un processus déclenché en réponse à une agression de l'organisme, qu'il s'agisse d'une lésion, d'un stress ou d'agents étrangers. Elle se caractérise par une accumulation de cellules et de facteurs dits inflammatoires.

Les cellules résidentes des tissus interagissent directement avec l'agent inflammatoire et libèrent des molécules telles que les facteurs du complément, les cytokines et les chimiokines (détail dans le chapitre 4.1).

Ces molécules permettent la mise en place de l'inflammation en activant les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, dans un premier temps, ce qui favorise le recrutement des cellules du système immunitaire (polynucléaires neutrophiles (PMN), monocytes/macrophages...).

Les PMNs sont recrutés précocement et massivement sur le site inflammatoire (phase aiguë) (Laskay *et al*, 2008). Les monocytes arrivent ensuite sur le site lésionnel, puis ils se différencient en macrophages, et leur nombre dépasse progressivement celui des PMNs (phase chronique).

2- La réaction inflammatoire aiguë

2.1- Généralités

La phase inflammatoire aiguë est caractérisée par une durée limitée dans le temps et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. La réaction inflammatoire peut être divisée en quatre grandes étapes (Dinh-Xuan *et al*, 2002) :

- La reconnaissance de l'agent initiateur et l'initiation de la réponse inflammatoire
- L'étape vasculaire permettant le recrutement des cellules du système immunitaire sur le site inflammatoire
- L'amplification de la réaction inflammatoire par l'ensemble des cellules effectrices de l'inflammation
- L'élimination de l'agent initiateur et la réparation tissulaire.

2.2- Les différentes étapes de la réaction inflammatoire aiguë

2.2.1- Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire

Les facteurs à l'origine d'une réaction inflammatoire peuvent être de différentes natures :

- Biologiques : d'origine exogène tels que les bactéries, les virus ou les parasites, ou encore les produits issus de ces agents pathogènes (ex : toxines bactériennes)
- Biologiques : d'origine endogène tels que les produits de dégradation tissulaire et cellulaire ou les molécules solubles de l'inflammation
- Physiques : tels que la chaleur, le froid ou les rayonnements ionisants
- Chimiques : tels que les acides, les bases ou tout autre produit toxique

La reconnaissance des agents pathogènes exogènes se fait par un type de récepteur particulier appelé PRR (Pattern-recognition receptors). Ce sont les récepteurs du système immunitaire qui reconnaissent des motifs non présents chez l'Homme mais bien conservés chez les pathogènes (Medzhitov *et al*, 1997) appelés PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns).

Parmi les PRRs, les plus étudiés sont les TLRs (Toll-like receptors) dont une dizaine de membres a été identifiée chez l'Homme, chacun d'entre eux reconnaissant des ligands très spécifiques (Turvey *et al*, 2006) (par exemple le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne qui est reconnu par le TLR-4, ou la flagelline qui est reconnue par le TLR-5).

Les TLRs sont exprimés par de nombreux types cellulaires, y compris ceux ne faisant pas partie du système immunitaire, comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales qui jouent alors un rôle de sentinelle de l'intégrité des tissus. Les cellules du système immunitaire comme les PMNs, les macrophages et les monocytes, portent des PRRs qui leur permettent d'induire une réponse immune. L'ensemble des TLRs, par exemple, est exprimé à la surface des PMNs (Kurt-Jones *et al*, 2002 ; Gabrilovich, 2005).

La fixation d'un ligand sur un PRR induit, quel que soit le type cellulaire, l'activation des voies de signalisation associées. Ceci aboutit à l'activation de facteurs de transcription régulant les gènes codant les médiateurs inflammatoires. Notamment un certain nombre de gènes ainsi activés vont initier l'étape suivante de l'inflammation : l'étape vasculaire. Parmi les facteurs de transcription activés, les Smads et STATs (Hanada *et al*, 2002; Hayden *et al*,

2006) mais surtout le NF- κ B (nuclear factor κ B) (Hatada *et al*, 2000) jouent un rôle prépondérant (Schéma 21).

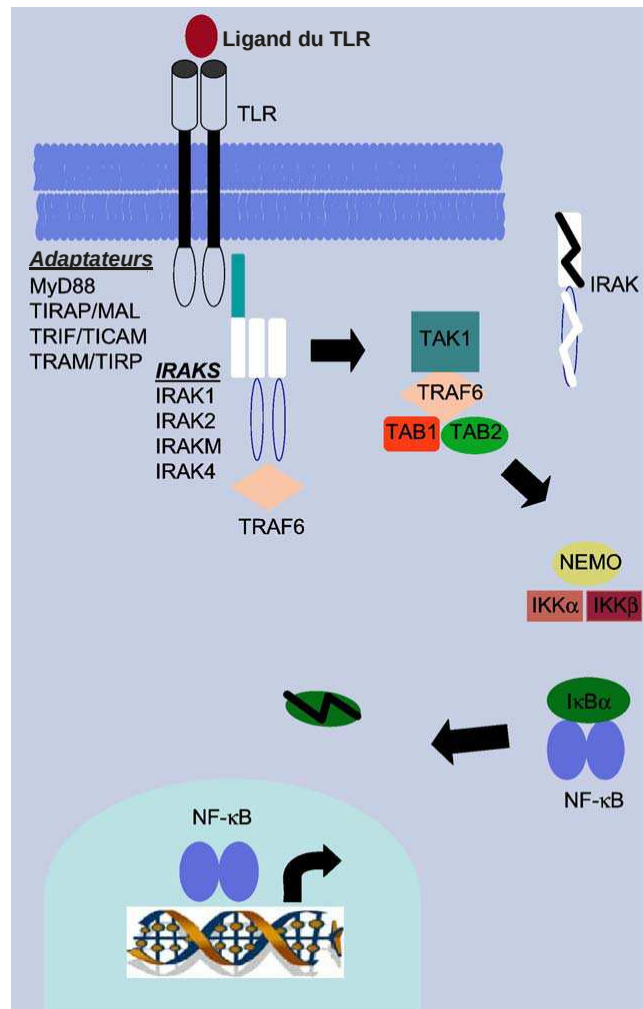


Schéma 21. Signalisation induite par la fixation de PAMP sur TLR aboutissant à l'activation de NF κ B (D'après Turvey *et al*, 2006).

2.2.2- Etape vasculaire de l'inflammation

Les cellules endothéliales des vaisseaux constituent les principaux acteurs de l'étape vasculaire. Ces cellules endothéliales sont activées sous l'effet de médiateurs inflammatoires libérés à la suite du contact avec l'agent initiateur. Ces médiateurs, présents à la surface des cellules endothéliales, en regard de la lumière vasculaire, permettent d'attirer les cellules immunitaires circulantes (PMNs, monocytes) et de les « capter » à la surface de l'endothélium (Zarbock *et al*, 2008). Les PMNs vont ensuite rouler le long de l'endothélium vasculaire avant

de ralentir et de s'arrêter. Une fois fermement adhérentes, les cellules vont migrer à travers la paroi vasculaire (Laudanna *et al* , 2005; Ley *et al*, 2006) (Schéma 22).

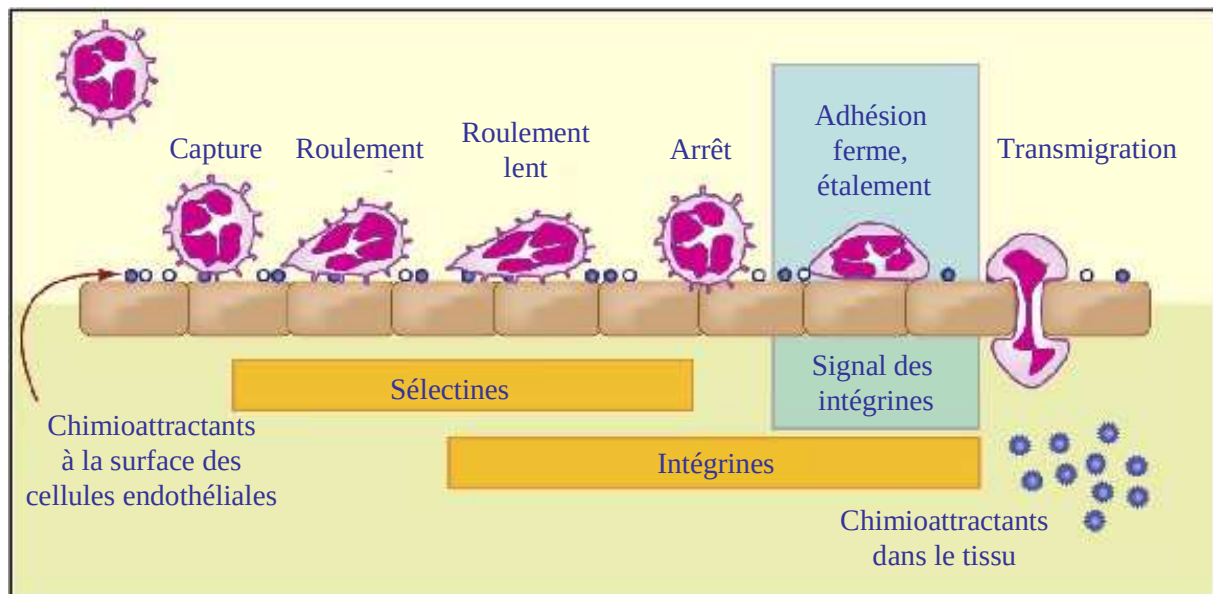


Schéma 22. La migration transendothéliale des polynucléaires neutrophiles (D'après Ley *et al*, 2006)

Le roulement des cellules inflammatoires se fait de façon physiologique *via* des interactions entre des protéines portées par les leucocytes, les L-sélectines et leurs ligands présents à la surface des cellules endothéliales (Kansas, 1996). Dans un contexte inflammatoire, les cellules endothéliales vont exprimer à leur surface les E-sélectines et P-sélectines (Wagner *et al*, 2000).

A l'occasion du roulement, ces molécules vont entrer en contact avec leurs ligands présents à la surface des cellules immunitaires à savoir ESL-1 (Endothelial-selectin ligand 1) et PSGL-1 (Platelet-selectin glycoprotein ligand 1) respectivement. Il est intéressant de noter que les TLRs peuvent directement influencer sur ces mécanismes en interagissant avec les L-sélectines (Sabroe *et al*, 2005). Cette interaction entre les sélectines des cellules endothéliales et de leurs ligands va ralentir les leucocytes et induire pour ces derniers la mobilisation d'intégrines à la surface cellulaire (Berton *et al*, 1999). La mobilisation de ces intégrines par les PMNs est également sous contrôle des cytokines pro-inflammatoires du microenvironnement cellulaire (Atzeni *et al*, 2002). Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une chaîne α et d'une chaîne β . A la surface des leucocytes vont apparaître Mac-1

(Macrophage antigen 1 ou $\alpha_M\beta_2$) et LFA-1 (Lymphocyte associated function antigen 1 ou $\alpha_L\beta_2$) ainsi que VLA-4 (Very late antigen 4 ou $\alpha_4\beta_1$) qui vont interagir avec leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales que sont ICAM-1 et -2 (Intercellular adhesion molecule) et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule) respectivement (Luscinskas *et al*, 1996). Par ailleurs, la mise en jeu de ces intégrines provoque un signal renforçant l'activation des PMNs (Detmers *et al* 1998; Sengupta *et al*, 2006). Cette fixation va finir de ralentir les leucocytes et initier l'adhésion ferme de ces derniers sur l'endothélium (Dunne *et al*, 2002; Laudanna *et al*, 2006).

La migration des cellules au travers de la paroi endothéliale va se faire à la jonction de trois cellules endothéliales et impliquer des protéines particulières nommées PECAM (Platelet-endothelial cell adhesion molecule) qui sont à la fois ligands et récepteurs pour elles-mêmes et le CD99 également nécessaire à la migration cellulaire (Lou *et al*, 2007). Cette migration est d'autant plus facilitée que les médiateurs inflammatoires augmentent la perméabilité vasculaire (Gonlugur *et al*, 2004).

2.2.3- Amplification de la réaction

Les PMNs sont les premières cellules à s'accumuler sur le site inflammatoire. Puis viennent ensuite les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) qui vont progressivement les remplacer (Doherty *et al*, 1988; Melnicoff *et al*, 1989).

Les PMNs sont des cellules phagocytaires qui ingèrent les pathogènes et les débris cellulaires puis les dégradent en utilisant une combinaison d'un système oxydatif (dérivés actifs de l'oxygène) et d'un système non-oxydatif. Le système non-oxydatif est composé de peptides anti-microbiens (défensines) et de protéases (MMP, protéases à sérine). Le système oxydatif repose sur la génération de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase et leur transformation notamment en acide hypochloreux par la myéloperoxydase (Gougerot-Pocidalot *et al*, 2002; Roos *et al*, 2003).

Les systèmes oxydatifs et non-oxydatifs peuvent être libérés par exocytose dans l'environnement cellulaire immédiat, ce qui contribue à l'amplification de la réaction inflammatoire (Faurschou *et al.*, 2003). Ce phénomène est sous contrôle de l'environnement cytokinique (Mur *et al*, 1997; Niwa *et al*, 2000). Les médiateurs tels que les facteurs du complément, les cytokines, les chimiokines, les médiateurs lipidiques (Sampson, 2000) réactivent les cellules présentes sur le site inflammatoire, et entretiennent la réaction inflammatoire jusqu'à l'élimination de l'agent initiateur.

2.2.4- Elimination de l'agent initiateur et réparation tissulaire

Le retour à l'équilibre tissulaire implique l'élimination de tous les éléments inducteurs de l'inflammation et des produits résultant de la dégradation du tissu altéré par les cellules phagocytaires. L'entrée en apoptose des PMNs et leur phagocytose par les macrophages entraîne une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Fadok *et al.*, 1998). La désactivation de la réponse inflammatoire implique également une succession de mécanismes immunosuppresseurs agissant notamment sur la paroi vasculaire (Tedgui *et al.*, 2001), nécessitant la participation de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance (Garzon *et al.*, 2004). Parallèlement, les macrophages produisent des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β et l'IL-10 en réponse à la reconnaissance des PMNs apoptotiques (notamment via CD36) (Voll *et al.*, 1997), ainsi que des facteurs de croissance qui permettent la prolifération des fibroblastes. Ces derniers synthétisent les protéines matricielles qui vont permettre la réparation des tissus lésés (Weber *et al.*, 1995).

Dans certaines conditions physiopathologiques (persistance de l'agent initiateur, réponse inflammatoire inadaptée, intervention de facteurs génétiques et/ou environnementaux), la réponse inflammatoire peut évoluer vers un état de chronicité (Benoist *et al.*, 2001; Rioux *et al.*, 2005). L'inflammation chronique est caractérisée par une accumulation anormale de cellules inflammatoires (majoritairement monocytes/macrophages, PMNs, ...) qui perdure dans le temps et occasionne d'importants dommages tissulaires (Nathan *et al.*, 1989).

3- Les polynucléaires neutrophiles.

Les polynucléaires neutrophiles (PMNs) sont les cellules représentatives de la phase inflammatoire aiguë. Ils comptent pour 50% à 70% des leucocytes totaux circulants (Peake, 2002). Ils font partie de la sous-famille des granulocytes dont ils représentent 95% des éléments circulants. Le PMN est décrit comme étant la première cellule de l'immunité à migrer sur site inflammatoire. Les PMNs sont issus de la moelle osseuse hématopoïétique et plus précisément des cellules souches pluripotentes (CD34+). Ces dernières, en présence de GM-CSF, G-CSF et d'IL-3 vont donner des PMNs matures prêts à passer dans la circulation sanguine en environ deux semaines (Schéma 23). Ces cellules ont une demi-vie d'environ 6 à 9h (Seely *et al.*, 2003).

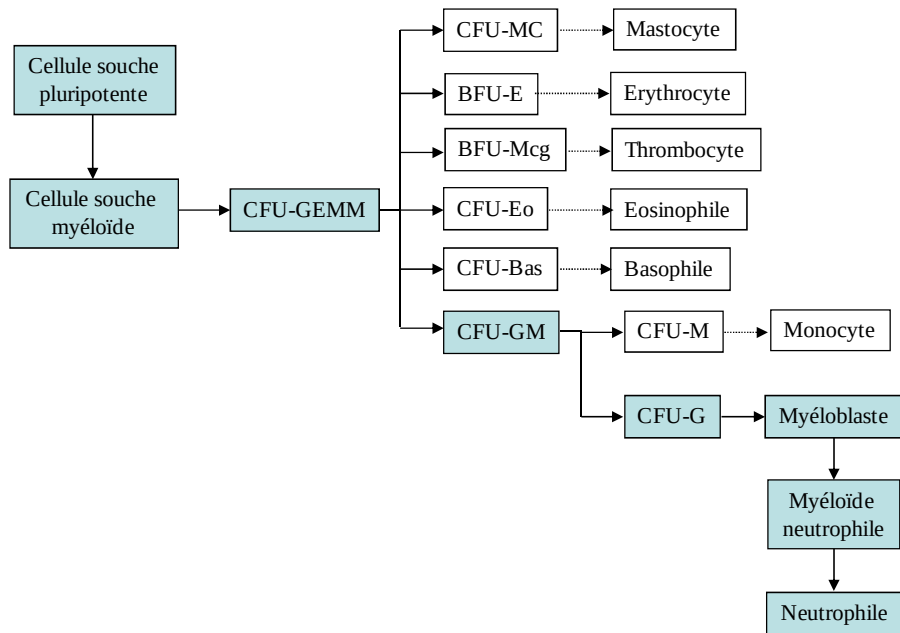


Schéma 23. Des cellules souches hématopoïétiques aux neutrophiles circulants. (D'après Menten *et al*, 2002)

Les PMNs mesurent de 7 μm à 10 μm de diamètre et présentent un noyau polylobé très caractéristique. La fonction primaire des PMNs est d'être dans la première ligne de défense de l'organisme. Ils ont pour cela la capacité de migrer sur les sites inflammatoires où ils vont phagocyter et détruire des corps étrangers par un arsenal d'agents réactifs et d'enzymes protéolytiques (Schéma 24).

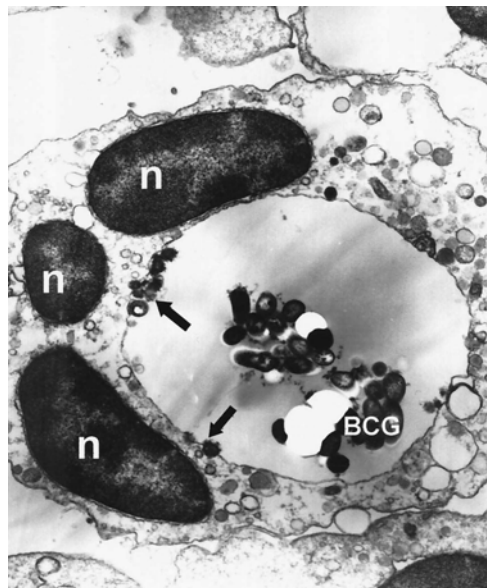


Schéma 24. Phagocytose de BCGs par un PMN. N=noyau, les flèches indiquent des lysosomes en train de fusionner avec le phagolysosome. (D'après Suttman, 2003).

Le fonctionnement de ces cellules dépend des nombreux granules cytoplasmiques qu'elles contiennent et dont on distingue quatre types (Borregaard *et al*, 1997; Chertov *et al*, 2000; Faurschou *et al*, 2003):

Les granules azurophiles (ou primaires) qui fusionnent avec le phagosome et contiennent entre autres, les sérines protéases du neutrophile (Elastase du neutrophile, Protéinase 3, Cathepsine G), la myéloperoxydase, et les défensines. Ces granules participent à la dégradation intracellulaire des pathogènes phagocytés. Les granules spécifiques (ou secondaires) contiennent un certain nombre de substances antimicrobiennes (lactoferrine) à l'instar des granules primaires, mais peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire et sont dépourvus de myéloperoxydase. Les granules gélatinases (ou tertiaires) entreposent les enzymes de dégradation de la matrice et les récepteurs utiles à la migration transendothéliale du neutrophile (Chertov *et al*, 2000). Les granules sécrétoires contiennent principalement les récepteurs de l'adhésion ferme à l'endothélium ($\beta 2$ intégrine, récepteur au fMLP).

Lors de son activation, le PMN va libérer séquentiellement le contenu de ses granules pour migrer sur le site de l'inflammation et participer à la réaction inflammatoire. Entre autres médiateurs, le PMN sécrète très abondamment de l'IL-8, mais également de l'IL-1 α et du MIP-1 α et β (Cassatella, 1995). Ces cytokines et chimiokines peuvent être synthétisées et libérées en réponse à divers stimuli faisant du polynucléaire neutrophile non seulement un phagocyte « professionnel » mais également une cellule pivot de la réponse immune à même de participer à l'élaboration du réseau cytokinique permettant d'orchestrer la réponse inflammatoire (Cassatella, 2000).

4- Les médiateurs de l'inflammation

4.1- Les cytokines et chimiokines

4.1.1- Généralités

Les cytokines sont des protéines de masse moléculaire relativement faible (8 à 40 kDa), formées le plus souvent d'une seule chaîne polypeptidique. Elles sont en général glycosylées, ce qui permet de les stabiliser et de faciliter leur solubilisation. Il n'existe pas de similitude de séquence primaire ou de structure tridimensionnelle entre toutes les cytokines. Seules leurs activités biologiques permettent de les classer en différents groupes (Schéma 25).

Les cytokines agissent à de très faibles concentrations comme les hormones endocrines. Cependant, elles se distinguent des hormones par la diversité des cellules susceptibles de les synthétiser, par la diversité des cellules cibles sur lesquelles elles agissent, et enfin par la diversité de leurs activités qui peuvent être endocrines, paracrines ou autocrines. Les cytokines sont essentiellement impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire.

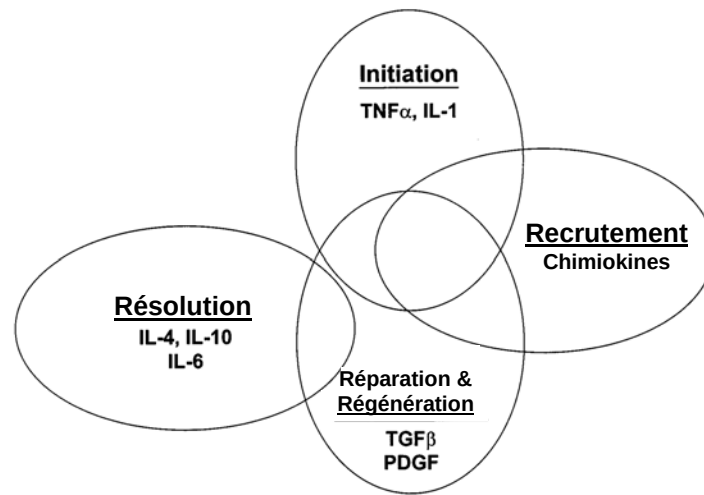


Schéma 25. Classification fonctionnelle des cytokines tenant compte de leur rôle dans la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire. (D'après Driscoll, 2000)

Au cours du processus inflammatoire, les cytokines capables de promouvoir l'inflammation sont dites pro-inflammatoires (exemple du $TNF-\beta$, de l'IL-1 β et de l'IL-6) par opposition aux cytokines limitant ce phénomène (exemple de l'IL-10 et du $TGF-\beta$) qui sont dites anti-inflammatoires (Driscoll, 2000). Les cytokines, douées de capacités attractantes envers les cellules, sont appelées chimioquinas (pour cytokines chimioattractantes) et sont déterminantes dans les phénomènes de migration cellulaire vers les sites infectieux, ou dans le trafic des cellules présentatrices d'antigène vers les ganglions lymphatiques pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. On en dénombre actuellement une cinquantaine chez l'homme (Baggiolini, 2001). Elles sont classées en quatre groupes rendant compte de la position des deux premiers de quatre résidus cystéines hautement conservés dans leur structure (Baggiolini *et al*, 1994 et 1997). On trouve ainsi les chimioquinas de type CC, CXC (majoritaires), XC et CX3C où X est un acide aminé quelconque. Les chimioquinas peuvent lier un ou plusieurs récepteurs (nommés XCR, CCR, CXCR et CX3CR) et ces récepteurs peuvent également lier une ou plusieurs chimioquinas. Les récepteurs aux chimioquinas sont des protéines à sept hélices transmembranaires couplées à des protéines G. Chaque type cellulaire

présente un panel de récepteurs qui lui sont propres et orientent sa réponse migratoire (Schéma 26).

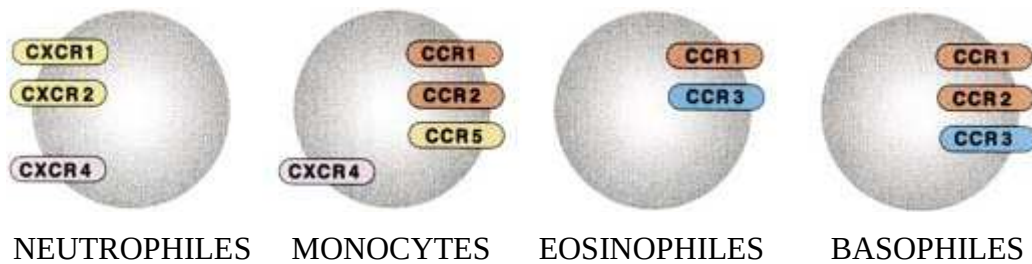


Schéma 26. Expression des récepteurs aux chimiokines sur les leucocytes humains. (D'après Baggiolini, 2001)

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence qu'un nombre restreint de cytokines et chimiokines étaient en concentration augmentée lorsque les PMNs étaient au contact de particules d'hydroxyapatite. La suite de ce chapitre sera, en conséquence, focalisé sur ces médiateurs spécifiquement impliqués dans notre modèle expérimental.

4.1.2- L'interleukine-1 α (IL-1 α)

4.1.2.1- Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'IL-1 α humaine est localisé sur le bras long du chromosome 2 (Webb *et al.*, 1986). Il est composé de 7 exons dont un non-codant (Auron *et al.*, 1984). De nombreux sites de fixation pour différents facteurs de transcription sont présents dans les régions régulatrices du promoteur du gène et notamment AP-1 et NF- κ B présents dans la partie proximale du promoteur (Hunninghake *et al.*, 1992; Hiscott *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1993).

La protéine IL-1 α est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa (pro-IL-1 α) en association avec les microtubules du cytosquelette et non dans le réticulum endoplasmique (Stevenson *et al.*, 1992). Ce précurseur est entièrement actif (Mosley *et al.*, 1987) mais ne possède pas de peptide signal. En conséquence, et contrairement à la plupart des autres cytokines, l'IL-1 α est abondamment stockée dans le cytoplasme (Cavaillon *et al.*, 1990) mais peut également être myristoylé et être présent à la membrane cellulaire. La production d'IL-1 α mature (17 kDa) nécessite une modification post-traductionnelle qui consiste en un clivage

de la pro-IL-1 α sous l'action de protéases à cystéine membranaires et dépendantes du calcium: les calpaïnes (Miller *et al*, 1994). L'IL-1 α peut cependant être sécrétée sous sa pro-forme quand les cellules sont en souffrance, et être clivée par d'autres protéases présentes au niveau du site inflammatoire (Kobayashi *et al*, 1990). La partie non-fonctionnelle clivée, tout comme la pro-IL-1 α , a la capacité de se lier à l'ADN et de réguler la transcription génique (Mizel *et al*, 1987) (Schéma 27).

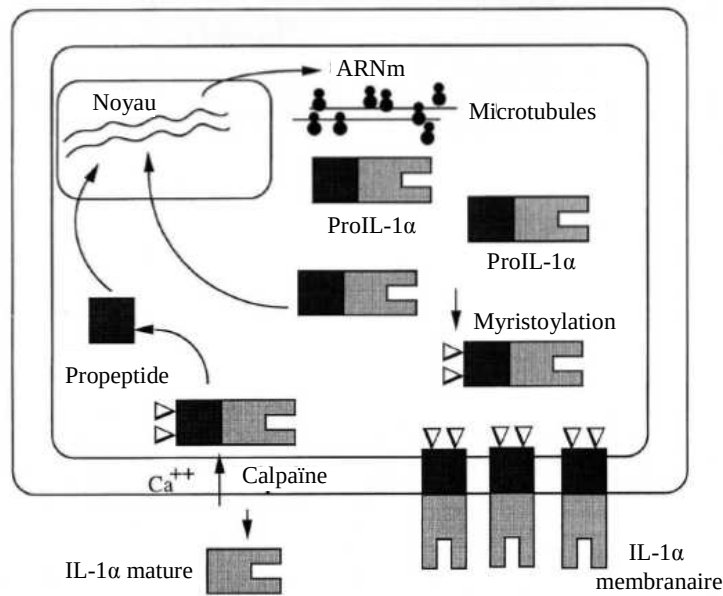


Schéma 27. Synthèse et activation de l'IL-1 α . (D'après Dinarello, 1996)

4.1.2.2- Sources et inducteurs

L'IL-1 α est essentiellement produite par les PMNs, les monocytes et les macrophages stimulés, (Suttman *et al*, 2003), et, dans une moindre mesure, par les lymphocytes B et T, les fibroblastes ou encore les cellules endothéliales (Dinarello, 1988). La plupart des agents pathogènes et leurs produits (endotoxines bactériennes par exemple) sont capables de stimuler la synthèse d'IL-1 α . De nombreux produits non microbiens peuvent induire la production de cette cytokine. C'est le cas par exemple de certains produits de la matrice extracellulaire (MEC) tels la fibronectine (Dinarello, 1996) et le collagène de type I (Pacifici *et al.*, 1991).

4.1.2.3- Récepteurs et activités biologiques

L'IL-1 α médie son action par le biais de la fixation aux récepteurs à l'IL-1 de type I

(IL-1RI) et de type II (IL-1RII) qui font partie de la superfamille des immunoglobulines.

Après une fixation de relativement faible affinité de l'IL-1 α à l'IL-1RI, l'IRAP (IL-1R accessory protein) forme un complexe avec l'IL-1 α fixé sur son récepteur. Ce complexe désormais de haute affinité, induit la transduction du signal. Cette dernière requiert l'activation des fractions cytoplasmiques de l'IL-1RI et de l'IRAP qui contiennent chacun un domaine GTPase. Les protéines associées au domaine cytosolique de l'IL-1RI incluent notamment une protéine activatrice des GTPases, qui va permettre l'hydrolyse du GTP et aboutir à la libération de céramides et, *in fine*, à l'activation de la MAPK p38 et des voies qui en découlent. La répression du système IL-1 se fait via l'IL-1Ra (receptor antagonist), qui fixe l'IL-1RI avec la même affinité que l'IL-1 α mais ne déclenche pas de réponse biologique. L'IRAP ne forme pas de complexe avec le dimère IL-1Ra/IL-1RI, ce qui explique qu'aucun signal ne soit transduit (Dinarello, 1996). Les fractions solubles des récepteurs à l'IL-1 jouent également un rôle important dans la réponse biologique à cette cytokine en régulant la disponibilité des ligands. IL-1RII, quant à lui, ne semble pas induire de signalisation (Sims *et al*, 1993; Dower *et al*, 1994) (Schéma 28).

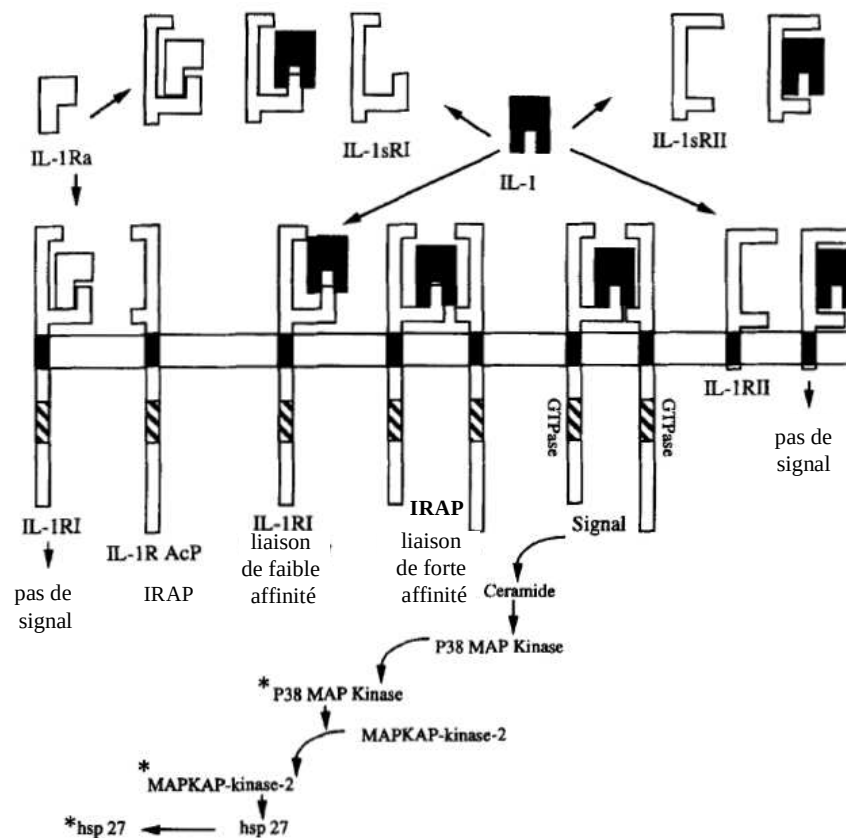


Schéma 28. Modèle d'activation cellulaire par l'IL-1 α . (D'après Dinarello, 1996)

L'IL-1 α et l'IL-1 β ont globalement les mêmes fonctions et sont des cytokines pléiotropes. Elles stimulent les cellules immunitaires et augmentent le niveau d'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire (Lidington *et al.*, 1998).

Elles participent à la maturation et la prolifération des lymphocytes B (Dinarello, 1994).

En synergie avec l'IL-6, l'IL-1 agit sur les hépatocytes et active la synthèse de protéines de l'inflammation, et en particulier de la protéine C réactive (CRP), de l' α 1-antitrypsine et de l' α 2-macroglobuline, ainsi que de lectines comme la protéine de liaison du mannane (MBP) et la protéine de liaison du LPS (LBP) (Dinarello *et al.*, 1986).

L'IL-1 entraîne la production de protéases dans différents types cellulaires et notamment la synthèse de MMP-2 et MMP-9 par les fibroblastes (Siwik *et al.*, 2000). Elle intervient également dans l'hématopoïèse, le sommeil et possède une activité anti-tumorale (Cavaillon, 1996).

4.1.3- L'interleukine-8 (IL-8)

4.1.3.1- Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'interleukine 8 est situé sur le bras court du chromosome 4 chez l'homme. Il est constitué de 4 exons (Modi *et al.*, 1990).

La région promotrice du gène permet la régulation de son expression par des facteurs de transcription tels que AP-1, NF-IL6 et NF- κ B (Mukaida *et al.*, 1994) (Schéma 29), mais aussi AP-2, interferon-regulatory factor 1, hepatocyte nuclear factor 1, glucocorticoid receptor et octamer binding protein (Gabrilovich, 2005).

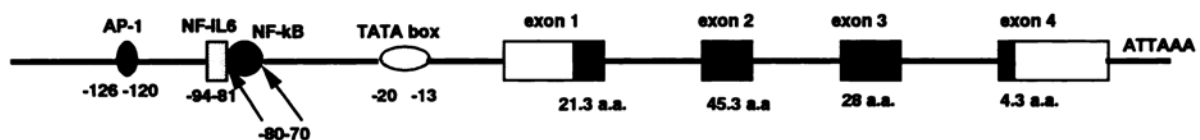


Schéma 29. Structure du gène de l'IL-8 humaine. Les carrés blancs et noirs représentent les portions des exons respectivement non transcrits et transcrits (D'après Mukaida *et al.*, 1994)

L'IL-8 est produite sous forme d'un peptide de 72 acides aminés dérivant d'un précurseur de 99 acides-aminés (Matsushima *et al*, 1988). En solution, elle est retrouvée sous forme monomérique et dimérique avec des liaisons de type hydrogène, les deux étant en équilibre en terme de concentration. Elle présente deux hélices α antiparallèles et symétriques au sommet d'un feuillet β formé de 6 brins antiparallèles (Baldwin *et al*, 1991) (Schéma 30). Cette structure semble être celle de toutes les chimiokines de la famille de l'IL-8 (Gro α , β , γ , ENA78 et IP-10)

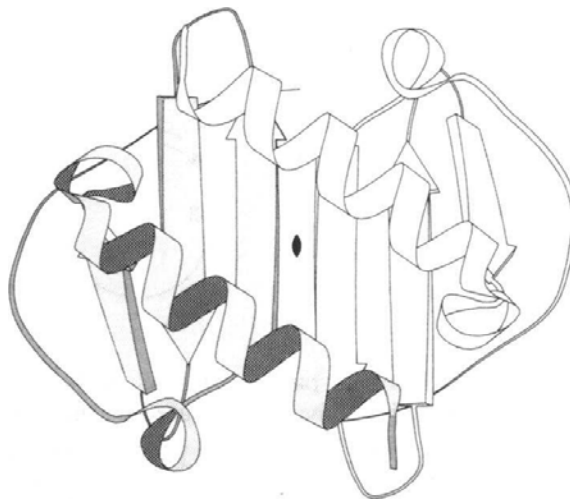


Schéma 30. Structure tridimensionnelle de l'IL-8 (D'après Baldwin *et al*, 1991).

4.1.3.2- Sources et inducteurs

De nombreuses cellules (PMNs, monocytes/macrophages, cellules endothéliales, hépatocytes...) sont capables de synthétiser de l'IL-8 en réponse notamment à une stimulation par le TNF- α ou l'IL-1 (Baggiolini *et al*, 1989; Leonard *et al*, 1990). De façon très intéressante, les neutrophiles, à même de produire de grandes quantités de cette chimiokine, en sont également les cibles principales. Ceci potentialise ainsi leur influx sur les sites inflammatoires (Bazzoni *et al*, 1991; Cassatella, 1995).

Principalement la production et la libération de l'IL-8 sont médiées par l'action de cytokines pro-inflammatoires. Cependant d'autres cytokines (IL-3, GM-CSF), les dérivés microbiens (endotoxines), les esters de phorbol, les complexes immuns et la phagocytose sont également à même d'induire la sécrétion d'IL-8 par les cellules inflammatoires (Seitz *et al*, 1991).

4.1.3.3- Récepteurs et activités biologiques

L'IL-8 possède deux récepteurs nommés CXCR-1 et CXCR-2, ou CD181 et 182, ou encore IL-8RA et IL-8RB (Holmes *et al*, 1991). Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G (Moser *et al*, 2002) avec 7 hélices transmembranaires (Murphy, 1997).

La fixation de l'IL-8 sur ses récepteurs induit une rapide internalisation de ces derniers (Pignatti *et al*, 2005). Le CXCR-1 notamment semble jouer un rôle déterminant dans le recrutement des PMNs par l'IL-8 (Chuntharapai *et al*, 1995; Hammond *et al*, 1995).

La fonction principale de l'IL-8 est sans conteste l'attraction de cellules inflammatoires avec, en tête de file, les polynucléaires neutrophiles. Cependant, l'IL-8 attire également les basophiles, les éosinophiles, les lymphocytes T et les cellules NK (Baggiolini, 2001).

L'IL-8 est également un activateur des PMNs notamment par le biais de la dégranulation qu'elle induit (Atta-ur-Rahman, 1999). Ce phénomène intervient à la fois dans la lutte antimicrobienne via les granules azurophiles, mais aussi dans les phénomènes de migration trans-endothéliale via les granules spécifiques (Chakrabarti *et al*, 2005) qui vont permettre de mobiliser les intégrines à la surface des cellules et de dégrader entre autre la lame basale de l'endothélium vasculaire.

Les conséquences moléculaires de la fixation de l'interleukine 8 sur ses récepteurs sont multiples. Après activation des petites protéines G hétérotrimériques liées aux récepteurs dans leur partie cytosolique, le signal IL-8 induit l'activation d'effecteurs primaires tels la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) ou la phospholipase C (PLC) (Richardson *et al*, 1998). Ces enzymes activent à leur tour Akt (Knall *et al*, 1997), les protéines kinases C (PKC) et/ou les cascades de signalisation des MAPKs (Knall *et al*, 1996) et mobilisent le calcium intracellulaire.

Ces signaux peuvent aboutir à une augmentation de la traduction protéique, une régulation de l'activité ou du nombre de facteurs de transcription et à une régulation de l'activité transcriptionnelle globale de la cellule cible, y compris du gène de l'IL-8 (Atta-ur-Rahman, 1999). Des phénomènes d'induction de prolifération et survie de cellules cancéreuses (Brew *et al*, 2000; Kamohara *et al*, 2007), ainsi que des régulations de l'architecture cellulaire, du cytosquelette et de son interaction avec l'environnement cellulaire (Waugh *et al*, 2008) ont également été rapportés (Schéma 31).

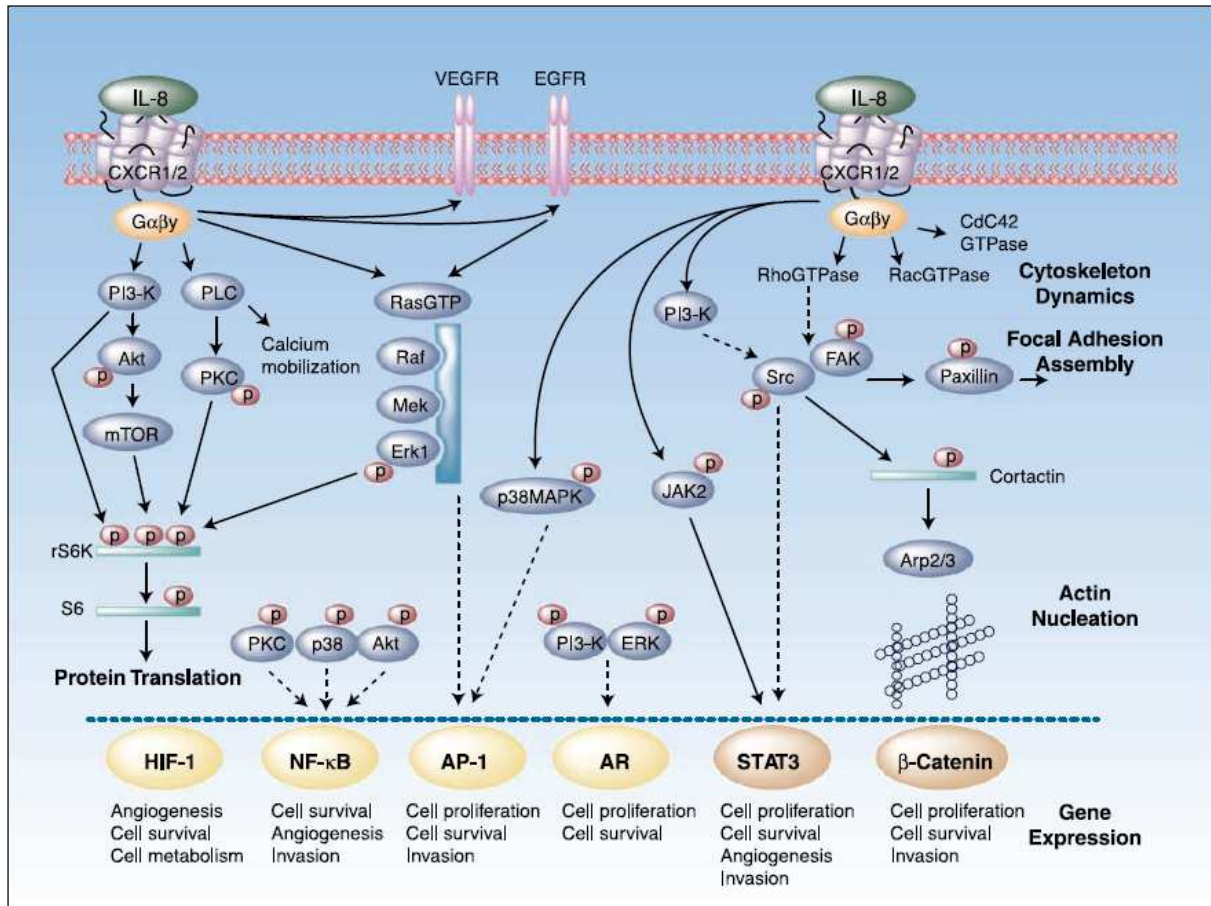


Schéma 31. Voies de transductions du signal IL-8 médié par CXCR1 et/ou CXCR2. (D'après Waugh *et al*, 2008)

La sécrétion d'IL-8 par les PMNs en réponse aux cytokines pro-inflammatoires peut être régulée par différentes voies et, notamment, la voie classique de la résolution inflammatoire. Les cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les monocytes et macrophages ainsi que les lymphocytes T, et particulièrement l'IL-10, induisent une inhibition du système d'amplification de la sécrétion de l'IL-8.

Une diminution de la production d'IL-8 aboutissant à une résolution de l'inflammation peut être médiée par l'IL-10 (Kasama *et al*, 1994). L'IL-10 va supprimer la sécrétion de l'IL-1 et du TNFα et ainsi annuler leur effet paracrine. L'IL-10, par ailleurs, n'intervient pas sur la sécrétion de l'IL-1Ra (Schéma 32).

Il est également décrit que les molécules de la famille des glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la transcription du gène de l'IL-8 et donc sur sa production et sécrétion à venir (Mukaida *et al*, 1994)

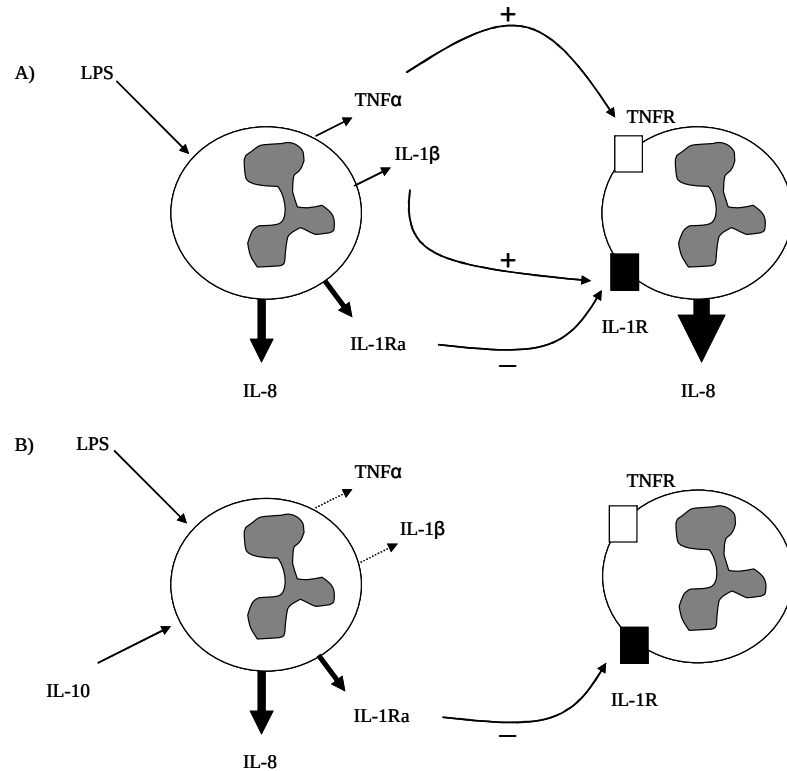


Schéma 32. Régulation du réseau autocrine/paracrine de cytokines stimulant la production d'IL-8 (D'après Cassatella, 1995)

4.1.4- Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1)

4.1.4.1- Structure des gènes et des protéines

Les gènes de MIP-1 α (Nakao *et al*, 1990) et MIP-1 β (Irving *et al*, 1990) sont situés sur le bras court du chromosome 17 chez l'homme. Ils sont constitués de 3 exons et 2 introns (Menten *et al*, 2002) (Schéma 33).



Schéma 33. Structures des gènes MIP-1. (D'après Menten *et al*, 2002)

MIP-1 α et MIP-1 β font tous deux partie de la famille des chimiokines de type CC. Les précurseurs de MIP-1 α et MIP-1 β comptent tous deux 92 acides aminés. Les formes matures en revanche sont constituées de 70 acides aminés pour MIP-1 α et 69 acides aminés pour MIP-1 β (Lodi *et al*, 1994). Les études structurales des protéines montrent que MIP-1 β existe sous forme d'homodimère. Chaque monomère est constitué de trois brins antiparallèles formant un feuillet β au bout duquel se trouve une hélice α (Lodi *et al*, 1994) (Schéma 34). Les structures des protéines dérivant de MIP-1 α sont superposables à celle de MIP-1 β (Czaplewski LG *et al*, 1999).

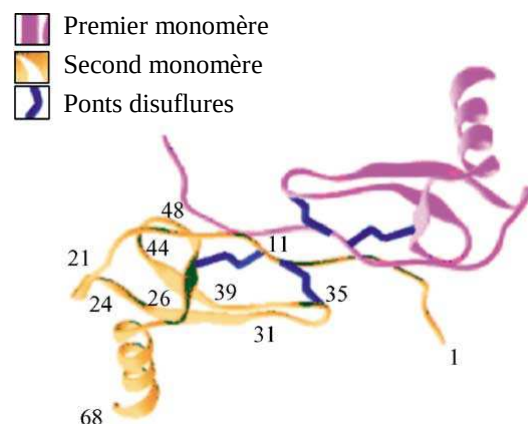


Schéma 34. Structure tertiaire de MIP-1 β humain (D'après Menten *et al*, 2002).

4.1.4.2- Sources et inducteurs

L'expression de MIP-1 α ou MIP-1 β peut être induite dans une grande variété de types cellulaires incluant les PMNs (Kunkel *et al*, 1995; Hatano *et al*, 1999), monocytes (Ziegler *et al*, 1991; Lukacs *et al*, 1994), les mastocytes, les cellules de Langerhans, les fibroblastes, les lymphocytes T et B (Kim *et al*, 1999; Krzysiek *et al*, 1999), les cellules NK (Bluman *et al*, 1996).

L'expression de MIP-1 α est induite principalement par le LPS et par liaison cellulaire à l'endothélium ou à des plaques recouvertes d'ICAM-1 *in-vitro* (Lukacs *et al*, 1994). D'autres inducteurs de l'expression de MIP-1 α ou MIP-1 β sont décrits dans la littérature parmi lesquels l'acide lipoteichoïque (Danforth *et al*, 1995), l'IFN γ , l'IL-1 β , la phytohématagglutinine A (PHA) (Bug *et al*, 1998).

4.1.4.3- Récepteurs et activités biologiques

CCR1 et CCR5 sont les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de MIP-1 α et MIP-1 β par les cellules (Samson *et al*, 1996; Baggiolini, 2001; Menten *et al*, 2002). Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G comme pour la majorité des chimiokines (Neote *et al*, 1993). Par ailleurs, CCR5 a été démontré comme étant une des voies d'entrée du VIH-1 dans les cellules (Murphy *et al*, 2000).

MIP-1 α et MIP-1 β induisent non seulement la migration des monocytes (Uguccioni *et al*, 1995), des lymphocytes T (Roth *et al*, 1995) et des cellules NK (Taub *et al*, 1995), mais permettent également l'activation des cellules immunitaires (Karpus *et al*, 1997). De plus, MIP-1 α semble préférentiellement chimioattractant pour les lymphocytes B et les cellules CD81⁺ activées par les LT, alors que MIP-1 β est chimioattractant pour les LT CD4⁺ activés (Schall *et al*, 1993; Taub *et al*, 1993). MIP-1 α , mais pas MIP-1 β , induit le chimiotactisme des cellules NK (Maghazachi *et al*, 1994). Les neutrophiles, quant à eux, et bien qu'exprimant CCR1 lorsqu'ils sont activés, ne répondent pas aux MIP-1 (McColl *et al*, 1993).

L'activité de MIP-1 α ou MIP-1 β peut être potentialisée par leur fixation aux protéoglycanes matriciels pour lesquels ces chimiokines ont une grande affinité (Ali *et al*, 2000). La régulation de leurs effets a été décrite pour l'IL-4 (Standiford *et al*, 1993), l'IL-10 (Berkman, John *et al*, 1995) et les corticostéroïdes (Berkman, Jose *et al*, 1995).

MIP-1 α et MIP-1 β sont également de puissants inhibiteurs de l'invasion des cellules par le virus du VIH de par leur compétition pour la fixation du CCR5 (Cocchi *et al*, 1995).

4.2- Les protéases

4.2.1- Les différentes familles de protéases

4.2.1.1- Les protéases à sérine

Les protéases et leurs inhibiteurs ont un rôle majeur dans la physiologie des êtres vivants comme en témoigne la part non négligeable du génome qu'ils occupent chez les mammifères (2% à 4%) (Puente *et al*, 2004).

Parmi les 16 familles de protéases recensées, on peut citer les adamalysines, les protéases spécifiques de l'ubiquitine, et les protéases de la famille de la trypsine (Page *et al*, 2008) qui sont les familles majoritaires. Les protéases à sérine représentent quant à elles un tiers des protéases chez l'homme et sont majoritairement des endopeptidases (Di Cera, 2009).

Les protéases à sérine exercent leur activité catalytique via une triade d'acides-aminés; acide aspartique, histidine et sérine (Blow *et al*, 1969). Leur activité est modulée par le biais de la régulation de leur production et par des inhibiteurs spécifiques (Le Magueresse-Battistoni, 2007).

Parmi les protéases à sérine ayant un rôle dans l'inflammation, on peut citer l'élastase du neutrophile, la protéinase 3 et la cathepsine G ainsi que le système activateur du plasminogène (tissulaire ou de type urokinase) comme étant des éléments majeurs. Notamment le système activateur du plasminogène, par son action sur les cascades d'activation des MMPs (métalloprotéases matricielles), joue un grand rôle dans l'homéostasie tissulaire (Page-McCaw *et al*, 2007). Les protéases à sérine du neutrophile sont quant à elles impliquées entre autres dans la régulation de la réponse inflammatoire innée, l'inflammation et la destruction d'agents pathogènes (Belaouaj *et al*, 1998 et 2000; Bank *et al*, 2001; Taggart *et al*, 2005; Wiedow *et al*, 2005).

4.2.1.2- Les protéases à cystéine

Comme toutes les protéases, les protéases à cystéine dénaturent de façon irréversible les liaisons peptidiques (Neurath *et al*, 1976). Les protéases à cystéine peuvent être regroupées en trois familles majeures : les enzymes rattachées à ICE (IL-1 β -converting enzyme), la famille de la calpaïne et celle de la papaïne. Cette dernière famille regroupe le plus grand nombre de protéases à cystéine dont la papaïne, les cathepsines lysosomales et les protéinases végétales (Turk *et al*, 1997).

Elles sont synthétisées et sécrétées sous forme de pro-enzymes nécessitant un clivage du pro-domaine pour être complètement actives. Leurs activateurs principaux sont l'élastase du neutrophile, la pepsine et d'autres protéases à cystéines (Lutgens *et al*, 2007).

Leurs activités sont régulées par des inhibiteurs dont les cystatines sont les représentants les plus abondants (Dubin, 2005).

Les protéases à cystéine sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que le cancer, le remodelage de la matrice osseuse, les pathologies cardio-vasculaires (Liu *et al*, 2004; Sukhova *et al*, 2006).

4.2.1.3- Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéases sont un groupe majeur d'enzymes à même de dégrader la matrice extracellulaire ainsi que des composants non-matriciels. Il existe 26 MMPs humaines différentes identifiées et/ou clonées (Murray, 2001).

Il s'agit d'endopeptidases zinc dépendantes. Elles partagent des éléments structuraux et fonctionnels et sont les produits de différents gènes (Massova *et al*, 1998). Ce sont des enzymes relativement homogènes mais qui diffèrent tout de même par la nature des domaines qu'elles comportent (Twining, 1994).

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

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

Le domaine catalytique comporte, pour toutes ces enzymes, un site de fixation au zinc et une méthionine très conservée. Ce domaine contient également des ions zinc et magnésium nécessaires au maintien de la structure tridimensionnelle des MMPs (Chakraborti *et al*, 2003).

La plupart des cellules synthétisent les MMPs et les sécrètent (Woessner, 1991). Cependant, les cellules inflammatoires et notamment les polynucléaires neutrophiles sont à même de les stocker dans des granules cytoplasmiques (Chertov *et al*, 2000).

Les MMPs sont sécrétées sous forme d'enzymes latentes et nécessitent un clivage de leur pro-domaine pour devenir pleinement actives. Le système du plasminogène (u-PA, t-PA) est ici un régulateur clé de la protéolyse matricielle puisqu'il est un acteur important des cascades d'activation des MMPs (Mignati *et al*, 1993) (Schéma 35)

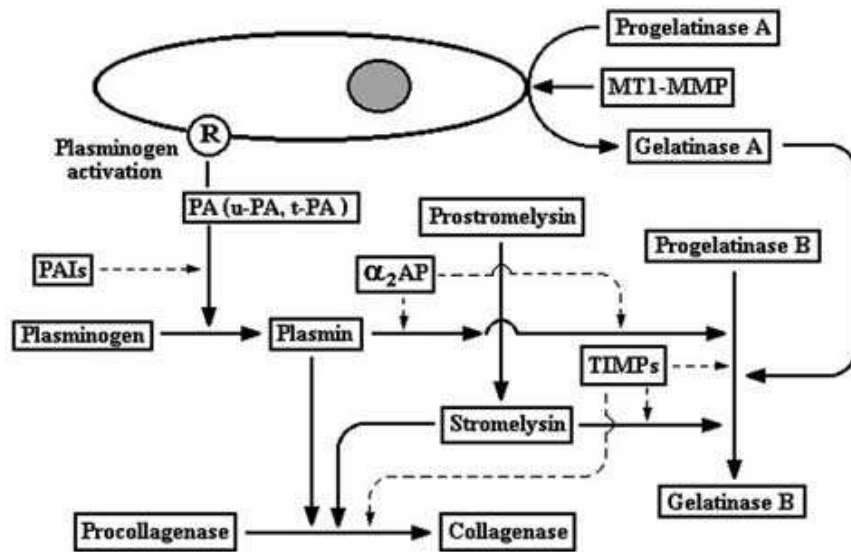


Schéma 35. Exemple de cascades d'activation des MMPs. (D'après Chakraborti *et al*, 2003)

La régulation des systèmes protéolytiques intervenant sur les composants matriciels est essentielle à la conservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'organisme. En effet, une activité MMP-9 exacerbée au voisinage de la paroi artérielle est un facteur majeur dans le développement de pathologies vasculaires (Heron *et al*, 1991), mais, par ailleurs, les MMPs sont absolument essentielles au développement embryologique (Chakraborti *et al*, 2003). Pour réguler cette activité enzymatique, il existe deux types majeurs d'inhibiteurs des MMPs que sont les TIMPs (Tissue inhibitor of MMP) et les IMPs (Inhibitor of MMP) capables d'inhiber les formes enzymatiques actives (Willenbrock *et al*, 1993).

Au cours de nos travaux, seule la MMP-9 a été identifiée comme médiateur inflammatoire dans notre système expérimental. Nous focaliserons donc le chapitre suivant sur cette métalloprotéase matricielle uniquement.

4.2.2. MMP-9

4.2.2.1- Structure du gène et de la protéine

Le gène de la MMP-9 est situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme. Il comporte 13 exons codant une protéine de 92 kDa (Schéma 36).

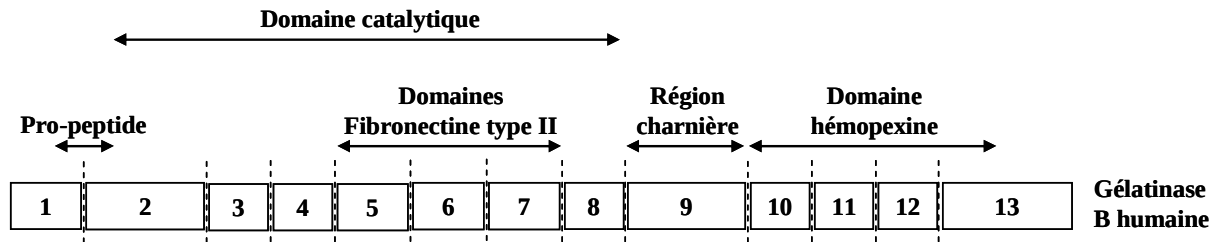


Schéma 36. Structure des exons de la gélatinase B (D'après Chakraborti *et al*, 2003).

La régulation transcriptionnelle du gène de la MMP-9 se fait par le biais de séquences consensus de la région promotrice du gène en amont de la boîte TATA. On y trouve notamment des sites de fixation pour NF- κ B, AP-1 et PEA3 (Schéma 37).

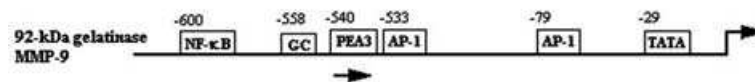


Schéma 37. Eléments régulateurs des régions promotrices du gène de la MMP-9 humaine. (D'après Chakraborti *et al*, 2003)

La protéine synthétisée comporte des domaines communs à toutes les MMPs : le pré-domaine ou peptide signal, le pro-domaine, 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, il est ensuite clivé avant la sécrétion de l'enzyme latente (Nagase *et al*, 1999).

Le pro-domaine 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 (Springman *et al*, 1990).

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 (Gomis-Rüth, 2003).

Enfin le domaine C-terminal de type hémopexine est impliqué dans la spécificité du substrat.

Pour la MMP-9 le domaine catalytique contient en plus trois domaines « fibronectine de type II » qui lui servent à lier le collagène et la gélatine (Allan *et al*,

1995; Steffensen *et al*, 1995). Le domaine hémopexine, quant à lui, est nécessaire au clivage de la triple hélice des collagènes interstitiels (Bode, 1995).

4.2.2.2- Sources et inducteurs

De très nombreux types cellulaires sont à même de synthétiser et sécréter la MMP-9 : les PMNs (dans le cadre inflammatoire) (Chakrabarti *et al*, 2005), les lymphocytes (Weeks *et al*, 1993), les macrophages (Welgus *et al*, 1990), les polynucléaires éosinophiles (Ohno *et al*, 1997), les mastocytes (Kanbe *et al*, 1999), les cellules NK (Albertsson *et al*, 2000), les cellules dendritiques (Bartholome, 2001) et les différents types cellulaires pulmonaires en cas d'activation (Schnaper *et al*, 1993; Kenagy *et al*, 1994). Il est à noter que les PMNs sont une source non-négligeable de MMP-9 puisqu'ils en contiennent environ 3 µg par million de cellules (Atkinson *et al*, 2003).

L'induction de la production et de la sécrétion des MMP-9 se fait majoritairement par le biais de stimuli inflammatoires (stress oxydatif, cytokines, esters de phorbol) (Chakraborti *et al*, 2003). Cependant des éléments physiques tels que les ultra-violets de type B sont également à même d'activer la production de MMP-9 par les fibroblastes (Fisher *et al*, 1996)

4.2.2.3- Activités biologiques

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).

Plus particulièrement, la MMP-9 joue un rôle important dans la migration des PMNs (Reichel *et al*, 2008) de par son activité collagénolytique qu'elle exerce sur le collagène de type IV des membranes basales des vaisseaux sanguins. La MMP-9 est notamment stockée dans les granules tertiaires des PMNs qui la relarguent au moment de la migration transendothéliale (Chakrabarti *et al*, 2006). Dans un cadre pathologique, cette action sur les lames basales des vaisseaux peut s'avérer délétère et induire la formation d'anévrismes (Pearce *et al*, 1996).

Son répertoire de substrats ne se limite pas aux seuls collagènes et gélatine puisque la MMP-9 est également une élastase. Elle est aussi capable de cliver des substrats non matriciels tels que l'IL-1β ou le plasminogène (Chakraborti *et al*, 2003). Elle peut également

cliver l'IL-8 et augmenter ainsi son pouvoir chimioattractant d'un facteur 10 (Chakrabarti *et al*, 2005).

Compte tenu du rôle important de la MMP-9 dans le remodelage tissulaire et dans les processus inflammatoires, l'activité protéolytique de ces enzymes doit être rigoureusement contrôlée.

Physiologiquement, l'activité protéolytique des MMPs, et donc de la MMP-9, est régulée par leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMPs. Parmi les quatre membres de cette famille (TIMP-1 à -4), c'est le TIMP-1 (protéine de 28 kDa) qui forme un complexe à haute affinité avec les MMPs-1, -2 et -3 et se lie également à la proMMP-9, bloquant son activation par les stromélysines. (Shimokawa *et al.*, 2003).

5- L'inflammation liée aux débris de biomatériaux

Le descellement aseptique des prothèses a pour cause majeure une inflammation périprothétique qui conduit à une ostéolyse (Garrigues *et al*, 2005). Les agents causals de cette inflammation sont les débris générés par les articulations elles-mêmes, ou par les zones à l'interface os/implant et non articulées (Harris, 1995; Goldring *et al*, 1993). Ces particules s'accumulent d'autant plus rapidement que l'implant est à même d'effectuer des micromouvements qui recréent et disséminent des particules (Hirakawa *et al*, 2004). La majeure partie de ces particules n'excède pas 5 µm de diamètre et ne présente pas de forme particulière (Abu-Amer *et al*, 2007).

La phagocytose de ces particules par les macrophages augmente la sécrétion d'IL-1, IL-6 et TNF ainsi que de métalloprotéases (Shanbag and Jacobs *et al*, 1994; Gonzalez *et al*, 1996; O'Keefe *et al*, 1998; Laquerrière *et al*, 2004). Cependant, bien que centraux, les macrophages ne sont pas les seules cellules présentes sur ce site inflammatoire. On y trouve notamment des lymphocytes (Boynton *et al*, 1995) et des PMNs (Anderson, 1988). Leur présence fait évoluer les réseaux cytokiniques locaux et peut influencer les cellules résidentes du tissu osseux.

En effet, un profil cytokinique pro-inflammatoire va orienter la balance entre ostéoblastes et ostéoclastes vers la résorption osseuse. La résorption fait partie de la physiologie osseuse et est nécessaire au renouvellement matriciel, mais cette action promotrice de l'ostéoclasie que provoquent les cytokines passe par une forte dérégulation de la balance entre ostéoprotégérine (OPG) et le Receptor Activator of NF-κB (RANK) en

faveur de RANK (Khosla *et al*, 2001), et entraîne une ostéolyse exagérée qui aboutit à terme au descellement prothétique (Schéma 38).

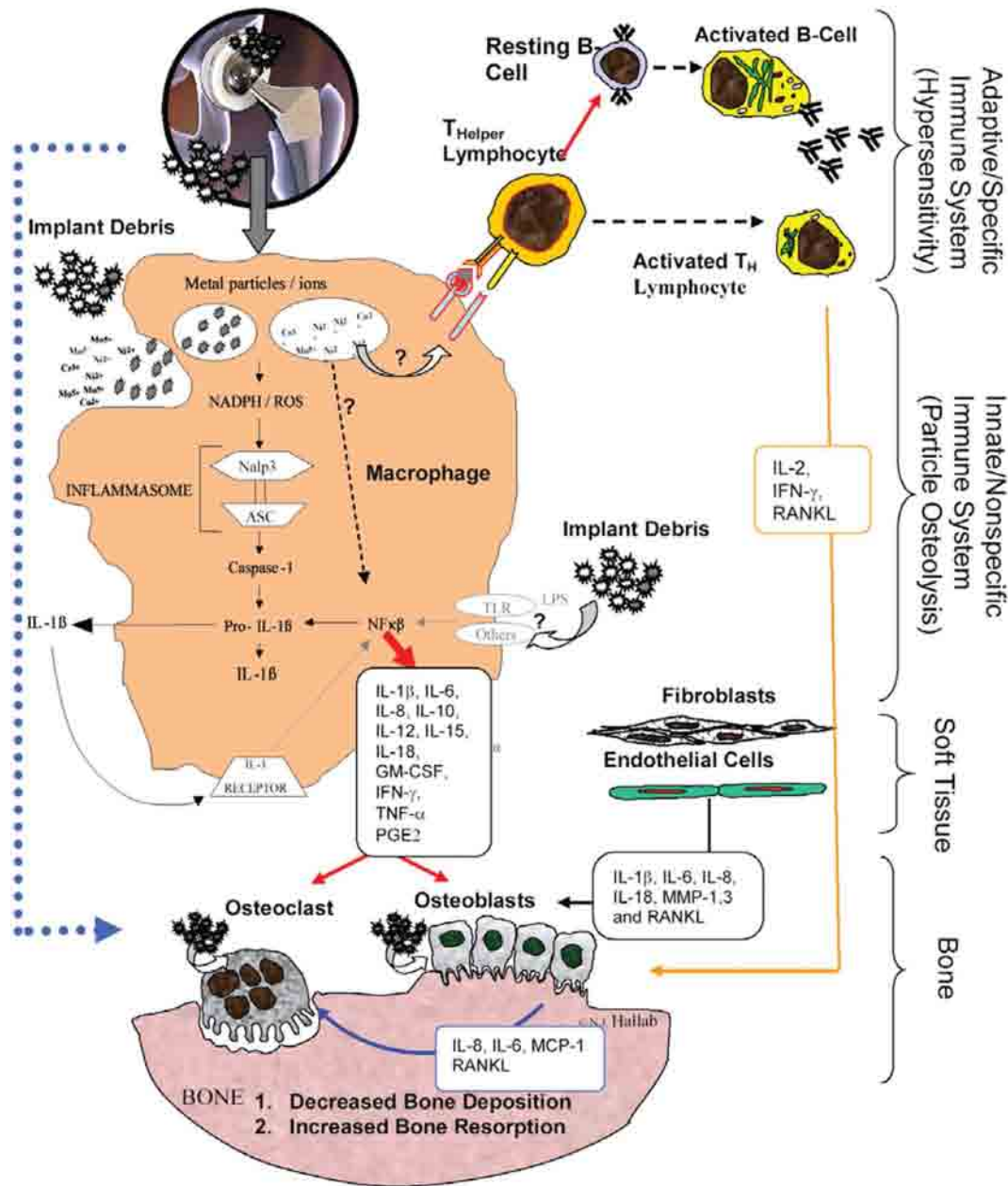


Schéma 38. Inflammation médiée par les macrophages en réponse aux biomatériaux (D'après Hallab *et al*, 2009).

Cette réaction inflammatoire aux particules de biomatériaux doit être contrôlée dès sa phase aiguë afin d'éviter un emballement de la réponse de l'hôte conduisant au cas pathologique du descellement aseptique. Cependant, l'inflammation étant nécessaire au processus de remodelage osseux, il convient de ne pas totalement l'inhiber mais uniquement de la moduler. Le zinc ayant déjà démontré de telles propriétés immuno-

modulatrices sur la réponse inflammatoire liée aux monocytes et macrophages (Grandjean-Laquerriere *et al*, 2006), nous avons, lors de ce travail de thèse, étudié son influence sur la réponse inflammatoire médiée par les polynucléaires neutrophiles.

D- Le zinc

1- Généralités

Le zinc est un cation divalent. Sa concentration plasmatique est de l'ordre de 15 μM avec une majorité d'ions complexés à des protéines (Gless *et al*, 1992). La masse totale de zinc est estimée entre 2 et 4 grammes dans le corps humain (Laggner *et al*, 2006). Seul le zinc non lié, ne représentant qu'entre quelques picomoles et quelques nanomoles, est biologiquement actif (Magneson *et al*, 1987). La quantité de zinc intracellulaire totale est estimée à quelques centaines de micromoles (Arslan *et al*, 1985). Par ailleurs, il n'existe pas de stockage de zinc avéré (Murgia *et al*, 2006). Les mesures, par ICP-AES (Plasma à couplage inductif - spectrométrie d'émission atomique), de la dissolution de l'HA substituée par 5% d'ions zinc (HA5%) utilisée dans nos travaux, ont montré une concentration maximale en zinc relargué par le matériau de 20 μM à 24h.

2- Les rôles du zinc

2.1- Rôle dans le métabolisme osseux

Le zinc est naturellement présent à l'état de traces dans l'os (Yamaguchi *et al*, 1986) et favorise la croissance et la minéralisation osseuse (Yamaguchi *et al*, 1987 et 1988). Il agit directement sur les ostéoblastes (Hashizume *et al*, 1993) et diminue la résorption osseuse due aux ostéoclastes (Kishi *et al*, 1994). De plus le zinc modifie la production de cytokines (Bao *et al*, 2003), y compris quand il est inclus comme substituant dans des bioverres (Day *et al*, 2005), ou des hydroxyapatites (Grandjean-Laquerriere *et al*, 2006) et permet de favoriser ainsi la repousse osseuse consécutive aux traumatismes opératoires subis par le tissu.

2.2- Rôle dans la réponse immunitaire

Le zinc est nécessaire au maintien d'une réponse immune optimale (Mocchegiani *et al*, 2000). S'il se trouve en défaut ou en excès, l'immunité de l'organisme s'en trouve altérée (Chandra, 1984).

Un polynucléaire neutrophile a une concentration moyenne intracellulaire de 2 μM de zinc (Moroni *et al*, 2005) et lorsque les cellules se trouvent dans un environnement déficient ou excédentaire en zinc, l'explosion oxydative est inhibée (Keen *et al*, 1990; Takeyama *et al*, 1995).

Par ailleurs, une carence en zinc inhibe la migration des PMNs alors que de très fortes concentrations (1 mM) peuvent avoir un effet chimiotactique direct (Hujanen *et al*, 1995).

Il a également été démontré qu'une déficience en zinc induisait l'apoptose cellulaire (Jankowski-Hennig *et al*, 2000; Fraker, 2005).

Dans le cadre de ce travail de thèse, qu'il s'agisse des études avec ou sans le zinc, nous nous trouvons systématiquement dans la zone de fonctionnement normal des PMNs puisque les milieux de cultures contiennent environ 15 μM de zinc et que les suppléments que nous effectuons ne nous font pas excéder 35 μM au final (Schéma 39).

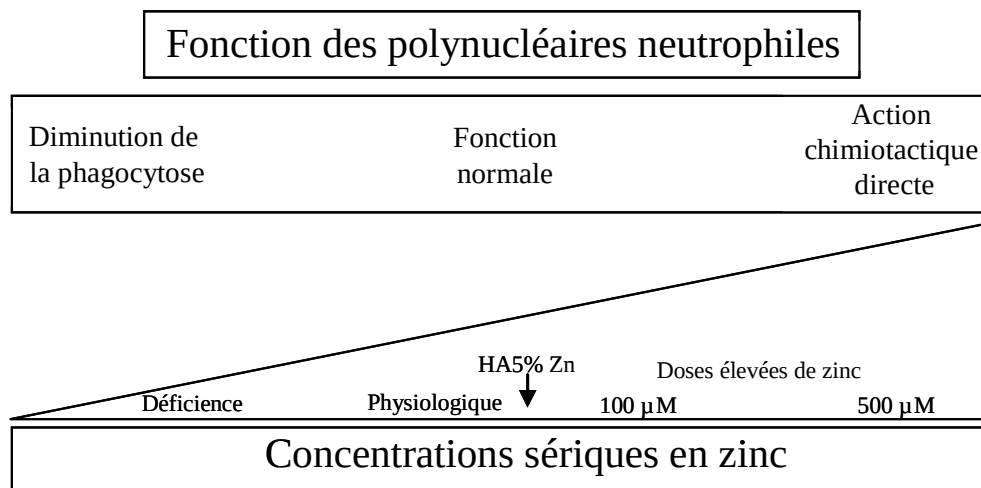


Schéma 39. Influence du zinc sur la fonction des PMNs. (D'après Rink *et al*, 2001)

3- La déficience en zinc

Le plus souvent il s'agit de carences alimentaires. Cliniquement, une faible déficience en zinc est marquée par une dépression immunologique, des troubles du goût (hypoguesie) et de l'odorat (hyposmie), une cécité de nuit (héméralopie), des pertes de mémoire et une diminution de la spermatogenèse chez les patients (Walsh *et al*, 1994; Zalewski, 1996), alors qu'une sévère déficience se caractérise par une forte dépression immunologique, des infections fréquentes, des dermatites bulleuses, des diarrhées, des

alopécies et troubles mentaux (Kay *et al*, 1975; Walsh *et al*, 1994). Il est également possible d'observer des retards de croissance chez l'enfant, et une perte d'appétit (Sansted, 1991; Solomons, 1998). Une supplémentation alimentaire en zinc permet de diminuer la susceptibilité infectieuse des populations carencées (Shankar *et al*, 1998).

La déficience cellulaire en zinc peut cependant être due également à un défaut des transporteurs du zinc comme c'est le cas dans l'acrodermatite entéropathique (Wang *et al*, 2002).

4- Le zinc et la modulation de la réponse inflammatoire

Les effets des variations de concentration en zinc visibles à l'échelle d'un organe ou d'un organisme ont des fondements cellulaires.

Le zinc est cofacteur de plus de 300 enzymes (Coleman, 1992; Vallee *et al*, 1993) de par sa participation à leur intégrité structurale et fonctionnelle (Rink *et al*, 2000). Il participe également à l'interaction des facteurs de réplication et de transcription avec les acides nucléiques (Rink *et al*, 2000) via les structures en doigts de zinc.

Le zinc affecte également la signalisation cellulaire et notamment la voie des tyrosine-kinases, la voie des nucléotides cycliques, celle des MAPKs et de la PKC (Beyersmann *et al*, 2001).

Il a été montré dans des cellules primaires qu'une déficience en zinc pouvait agir sur la régulation des voies AP-1 et NF- κ B (Herbein *et al*, 2006). Notamment le manque de zinc contribue à augmenter la translocation nucléaire de NF- κ B et donc à potentialiser un profil pro-inflammatoire (Hennig *et al*, 1999; Ho *et al*, 2004; Prasad *et al*, 2004).

Ceci peut notamment être observé au niveau de la réponse au LPS bactérien (Driessen *et al*, 1995). Le zinc joue, dans la signalisation liée au TLR-4, le double rôle d'activateur et répresseur.

En tant qu'activateur, il donne au LPS une conformation qui favorise son interaction avec son récepteur (Wellinghausen *et al*, 1996). Il inhibe par ailleurs la « protein tyrosine phosphatase » (PTP) (Brautigan *et al*, 1981; Haase *et al*, 2003) et la « MAPK phosphatase 1 » (MKP-1) (Kim *et al*, 2006) favorisant la transduction du signal en provenance de TLR-4. Enfin il favorise la translocation de PKC à la membrane (Beyersmann *et al*, 2001).

En tant que répresseur, le zinc agit par l'inhibition de IRAK1 (impliquée dans les voies IL-1 et TLRs) (Wellinghausen *et al*, 1997) qui transmet le signal depuis TLR-4. Il agit également par l'inhibition de la phosphodiésterase des nucléotides cycliques (PDE) qui a pour fonction la linéarisation de ces derniers (Donnelly, 1978; Percival *et al*, 1997). Il semblerait que cet effet anti-inflammatoire du zinc sur la PDE soit principalement dû au maintien du GMP cyclique dans les monocytes (VonBülow *et al*, 2005). Enfin, l'inhibition de l' « inhibitor of NFκB kinase » (IKK) par le zinc permet l'action d'IκB qui réprime NFκB (Jeon *et al*, 2000) (Schéma 40).

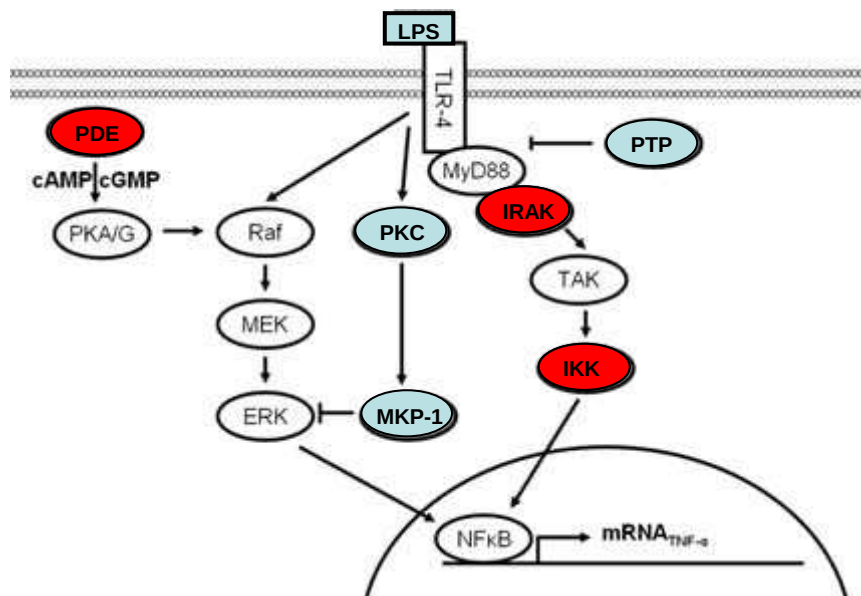


Schéma 40. Effet du zinc sur la signalisation des TLRs. Effet pro-inflammatoire en bleu et immuno-régulateur en rouge. (D'après Haase *et al*, 2007)

Cette régulation fine par le zinc de la transduction du message inflammatoire aboutit à la modulation des profils de production cytokiniques par les cellules du système immunitaire (Grandjean-laquerriere *et al*, 2006), et le système devient encore plus complexe lorsque l'on tient compte de l'effet biphasique de la concentration en zinc sur le relargage des cytokines (Hasse *et al*, 2007) (Schéma 41).

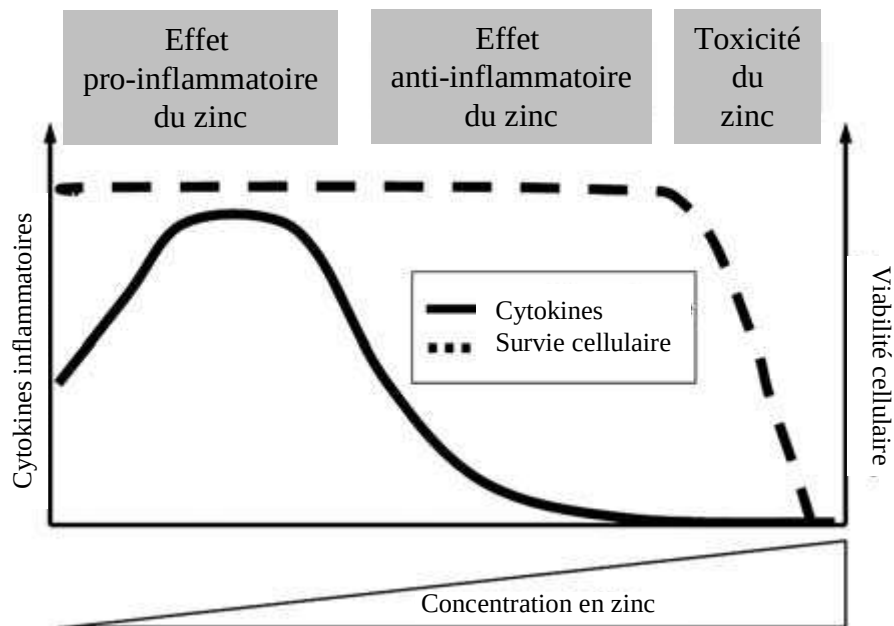


Schéma 41. Effet de la concentration en zinc sur la sécrétion des cytokines. (D'après Haase *et al*, 2007)

L'ensemble des données présentées au cours de cette introduction représente le socle de notre étude. Nous avons en effet travaillé pour la première fois à l'étude de la réponse inflammatoire aiguë aux particules d'HA, médiée par les PMNs. La littérature ne fournit que très peu de données sur la réponse de ce type cellulaire aux phosphates de calcium, bien qu'il semble impliqué dès les premiers stades de la réponse inflammatoire aux biomatériaux. Ceci nous a incités à comprendre quels médiateurs entraînent en jeu dans la réponse des PMNs aux particules d'HA et, dans un second temps, à proposer un biomatériau à même d'enrayer l'emballement de la réponse de l'hôte.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La génération de particules d'hydroxyapatite est due au remodelage de ce biomatériau de recouvrement prothétique par les cellules de l'hôte. Ces débris ont le potentiel d'induire une inflammation qui, si elle n'est pas contrôlée, peut mener au descellement aseptique de l'implant. La littérature, ainsi que des travaux antérieurs du laboratoire, décrivent les monocytes/macrophages comme acteurs majoritaires de cette inflammation. Or, si la réponse des monocytes/macrophages est bien connue dans le cadre de l'inflammation chronique liée au descellement aseptique, les données concernant les polynucléaires neutrophiles et la réponse inflammatoire aiguë sont très peu répandues, bien qu'il ait été décrit que les PMNs soient retrouvés sur le site des échecs de prothèses.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les PMNs pouvaient être activés par les particules d'HA et participaient à l'inflammation périprothétique. C'est pourquoi la première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'évaluation de la réponse des PMNs au contact des débris d'HA, en terme notamment de médiateurs inflammatoires sécrétés, qu'il s'agisse de cytokines, chimiokines ou protéases.

Dans un second temps, en nous basant sur une étude antérieure du laboratoire ayant, qui a montré une régulation de la production cytokinique des monocytes par l'utilisation d'une HA partiellement substituée en zinc, nous avons émis l'hypothèse que ce nouveau biomatériau pourrait, éventuellement, également moduler la réponse des PMNs. Nous avons donc cherché à mettre en évidence le potentiel immunomodulateur de cette HA substituée en zinc sur la réponse des PMNs, et plus précisément sur la production d'IL-8 et de MMP-9. Par ailleurs, en nous appuyant sur nos premiers résultats, nous avons également cherché à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la régulation du signal HA au sein des PMNs, et plus spécifiquement, nous avons proposé l'IL-8 comme élément central de la réponse des PMNs aux particules d'HA.

RESULTATS

1^{ère} Partie : Les particules d'hydroxyapatite ont la capacité d'activer les polynucléaires neutrophiles humains et d'initier une réponse inflammatoire.

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium couramment utilisé en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. L'hydroxyapatite sert majoritairement de matériau de recouvrement des parties métalliques des prothèses, mais est également employée comme matériau de comblement. L'utilisation de ce matériau est justifiée par sa capacité à favoriser la repousse osseuse. Cependant, le remodelage de l'hydroxyapatite, pendant son intégration à la matrice osseuse, induit la formation de débris potentiellement inflammatoires. Cet effet est bien documenté concernant la phase inflammatoire chronique et les cellules qui y sont associées, à savoir les monocytes et macrophages. Ces cellules, au contact de particules de biomatériaux, augmentent leur production de facteurs pro-inflammatoires.

En revanche, bien que les polynucléaires neutrophiles aient été retrouvés sur les sites inflammatoires, très peu d'études se sont penchées sur l'effet des particules d'hydroxyapatite sur ces cellules. Les données disponibles se rapportent pour une majorité à des modèles animaux et traitent préférentiellement de l'explosion respiratoire.

Sur la base de cet état des lieux de la littérature, nous avons décidé d'entreprendre une étude portant sur l'effet des particules d'hydroxyapatite sur les polynucléaires neutrophiles humains, en terme de sécrétion de médiateurs inflammatoires dans le milieu extracellulaire. Nous nous sommes de plus assurés que ces médiateurs possédaient bien une activité biologique à même de fournir des éléments de réponse quant à l'action de l'hydroxyapatite sur la phase inflammatoire aiguë médiée par les polynucléaires neutrophiles.

Avant de procéder à l'évaluation des variations de la production de médiateurs de l'inflammation par les PMNs, nous nous sommes assurés que le contact entre les cellules et les particules d'HA avait bien lieu et n'altérait pas l'intégrité cellulaire. Les études en

microscopie électronique à balayage nous ont de plus permis de mettre en évidence des modifications morphologiques des PMNs caractéristiques d'une activation cellulaire. Notamment, nous avons montré l'émission de prolongements cytoplasmiques de types lamellipodes et filipodes par les cellules.

Nous avons ensuite procédé à un criblage des médiateurs inflammatoires produit par les PMNs en réponse au contact et/ou à la phagocytose de particules d'HA par la technique d'« antibody-arrays ». Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation significative de neuf facteurs parmi les 42 testés (éotaxine, éotaxine-2, I309, IL-1 α , IL-8, IL-2, IL-11, MIP-1 α et MIP-1 β). IL-1 α , IL-8, MIP-1 α et MIP-1 β ont particulièrement retenu notre attention car ils sont à même d'intervenir dans le modèle d'inflammation liée au descellement aseptique.

Ces résultats ont été confirmés par une étude quantitative de la concentration en IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture des PMNs. Ces tests ont montré également une augmentation significative de la concentration en IL-8 dans les surnageants de culture des PMNs humains mis au contact de particules d'HA.

Nous avons ensuite évalué le potentiel chimioattractant des surnageants de culture des PMNs par des tests de migration en chambre de Boyden. Nos résultats sont cohérents avec ceux portant sur les augmentations de facteurs chimioattractants obtenus par « antibody-arrays ». En effet, l'IL-8 est le facteur chimiotactique préférentiel des PMNs et les résultats de la migration de ce type cellulaire montrent une augmentation qui suit celle de la concentration de l'IL-8 dans le milieu extracellulaire. Si les monocytes ne répondent pas spécialement à l'IL-8, en revanche ils sont sensibles aux MIP-1 α et MIP-1 β , et, les expériences de migration des monocytes montrent qu'ils migrent plus en réponse aux surnageants de PMNs ayant été au contact d'HA.

Une composante essentielle de la migration cellulaire *in-vivo* est la dégradation de la matrice extracellulaire permettant la progression des cellules. Par ailleurs, la littérature décrit que la liaison de l'IL-8 à ses récepteurs est un élément déclencheur de la libération de la MMP-9 dans les PMNs. Intégrant ses deux informations et puisque nos PMNs sécrètent abondamment de l'IL-8 en réponse à nos débris de biomatériaux, nous avons

recherché l'activité gélatinolytique de la MMP-9, métalloprotéase abondante dans le neutrophile, dans les surnageants de culture. Nos résultats ont montré que, dans notre système, le contact entre les PMNs et les particules de biomatériaux induisait une augmentation de l'activité enzymatique de la MMP-9.

L'ensemble de nos résultats nous a permis de proposer un modèle expliquant la mise en place de la réponse des PMNs aux particules de biomatériaux.



Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction

Frédéric Velard^{a,*}, Dominique Laurent-Maquin^a, Christine Guillaume^a, Sylvie Bouthors^a,
Edouard Jallot^b, Jean-Marie Nedelec^c, Abderrazzaq Belaaouaj^d, Patrice Laquerriere^{a,e}

^aINSERM, UMR-S 926, CHU de Reims, IFR 53, URCA, 1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, Cedex, France

^bCNRS/IN2P3, UMR 6533, Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France

^cCNRS, UMR 6002, Laboratoire des Matériaux Inorganiques, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France

^dINSERM, Avenir Program, EA 4303, Inflammation et Immunité de l'Épithélium Respiratoire, CHU de Reims, IFR 53, URCA, 45 rue Cognacq Jay, 51092 Reims Cedex, France

^eCNRS, UMR 7178, IPHC, équipe IMABIO, 23 rue Loess, BP 28, 67037 Strasbourg Cedex 02, France

Received 10 September 2008; received in revised form 18 December 2008; accepted 8 January 2009
Available online 21 January 2009

Abstract

Hydroxyapatite (HA) is widely used as a bone substitute or coating biomaterial in bone diseases or prosthesis metal parts. The release of HA particles induces an inflammatory response and, if uncontrolled, could result in implant loss. Among the hallmarks of such inflammatory response is early recruitment of the polymorphonuclear cells (PMNs). The purpose of this work is to investigate the response of PMNs following exposure to HA in terms of secreted mediators. Our study shows that HA particles increase the release of pro-inflammatory mediators such as interleukin-1 α , as well as chemotactic factors such as interleukin-8, macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-1 β . HA also induces an increase in matrix metalloproteinase 9 expression. Taken together, our data demonstrate for the first time that HA is capable of activating PMNs, a phenomenon that could potentially contribute to the onset of implant-associated inflammation.

© 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Inflammation; Hydroxyapatite; Neutrophil; Cytokines

1. Introduction

Hydroxyapatite (HA) is widely used in orthopaedic surgery because of its biocompatibility and bioactivity. It is used to coat the metal parts of prostheses in order to improve their biocompatibility and as a bone substitute in bone diseases. HA increases the integration of the implant; however, one disadvantage of HA coatings is their tendency to fragment and generate HA particles wear debris [1], which activate leukocytes [2,3].

Study of the tissue/biomaterial interface has shown that there is a recruitment of inflammatory cells, including poly-

morphonuclear neutrophils (PMNs), in the early stage followed by monocytic cells [4]. It has been demonstrated that, during the chronic stage of inflammation, HA particles can elicit the production and release of inflammatory mediators by monocytes such as proteases and their inhibitors [5], chemokines and cytokines [6–10]. However, little is known about the acute inflammatory stage and the effect of HA debris on PMNs and their response *in vitro* and/or *in vivo*.

A number of studies have reported that osteoblastic cells can release chemotactic factors, such as monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8) *in vitro* [11] or *in vivo* during inflammatory diseases [12,13] when in contact with particles [14]. Such chemotactic factors could recruit inflammatory cells to the implant site. The interaction

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 80 10; fax: +33 3 26 91 86 43.
E-mail address: frederic.velard@etudiant.univ-reims.fr (F. Velard).

of PMNs with microbial or material particles results in cell activation. PMNs are immune cells whose primary function is to protect the host against invading pathogens and foreign materials. However, when uncontrolled, this physiological response can become pathogenic, leading to tissue injury [15]. Activation of PMNs by biomaterial particles has the potential to “prime” the effect of subsequent activation [16] and to increase inflammation. Regulation of the inflammatory mediators can modulate the immune response and increase the lifespan of the prosthesis and its compatibility with the host tissue. The purpose of this study is to investigate the role of hydroxyapatite particles in PMN recruitment and activation.

2. Materials and methods

2.1. Media and reagents

Polymorphprep, used for PMN separation, was from Axis-shield (Oslo, Norway). Dulbecco’s phosphate-buffered saline (DPBS) 1× and RPMI 1640 + L-glutamine were from Gibco. Penicillin, streptomycin, RPMI 1640 Glutamax and foetal calf serum (FCS) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), gelatin, sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, NaCl and CaCl₂ were from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Glutaraldehyde and hexamethyldisilazane (HMDS) were from VWR (Fontenay sous Bois, France) and Agar Scientific (Stansted, UK) respectively. Quick May–Grünwald–Giemsa staining was realized with RAL 555 kit from Reactifs RAL (Martignac, France). Ca(NO₃)₂·4H₂O and P₂O₅ for the HA powder were from Aldrich, USA, and Avocado Research Chemicals (Heysham, Lancashire, UK).

Cytokines antibody arrays AAH-INF-III were from Raybiotech (Norcross, USA). IL-8 duo-set and recombinant human chemokines IL-8 and RANTES were from R&D systems (Lille, France).

2.2. HA powder

A 2 g quantity of pure sol–gel-derived HA powder was obtained with 4.7 g of Ca(NO₃)₂·4H₂O and 0.84 g of P₂O₅ dissolved in ethanol under stirring and under reflux at 85 °C for 24 h. This solution was then cooled and maintained at 55 °C for 24 h to obtain a consistent white gel, which was further heated at 80 °C for 10 h to obtain a white powder. Finally, the powder was heated at 1100 °C for 15 h. Use of such a high temperature allows the synthesis of pure and well-crystallized HA. The powder was characterized as described previously [17]. HA powder was used with a surface area ratio (specific surface of material/specific surface of cell) of 1 as previously described [18]. The particles ranged from 100 nm to 10 µm as judged by scanning electron microscopy (SEM). Importantly, HA was tested and found to be endotoxin free using the E-toxate kit from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.3. Collection of blood samples, cell isolation and culture

Venous blood was collected on EDTA (BD Vacutainer® K2E, Franklin Lakes, USA) from healthy donors in accordance with the “Etablissement Français du Sang Nord de France” (March 2007) and with the written informed consent of the donors. Neutrophils were purified from whole human blood using the Polymorphprep™ protocol. Residual erythrocytes were removed by a hypotonic shock. Resulting neutrophils were resuspended in DPBS 1× and represented greater than 97% of the cells.

The PMNs were at least 95% viable. They were cultured in RPMI 1640 + L-glutamine with antibiotics (100 IU ml^{−1} penicillin, 100 µg ml^{−1} streptomycin) and 2.5% heat-inactivated autologous human serum.

Five million cells in 1 ml were seeded in 24-well Falcon™ plates (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were cultured for 4 h without stimulation or exposed to hydroxyapatite particles (mixed with culture media before seeding of PMNs) or 1 µM PMA (used as a positive control). Finally, cells were centrifuged at 400g for 10 min, supernatants were collected and frozen at −20 °C and cells were frozen at −80 °C. Cytospin samples were prepared with a cell suspension of 10⁵ cells in 100 µl of DPBS 1×. Centrifugation was performed in a Shandon cytospin 4 (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France) for 10 min at 500g. Then preparations were stained with RAL 555 kit. Differential count was performed based on morphological criteria using a light microscope (Zeiss, Axiovert 200M, Germany).

Monocytes were collected from total blood of healthy volunteers by counter flow elutriation. They were at least 95% viable. Cells were cultured in RPMI 1640 Glutamax with antibiotics (100 IU ml^{−1} penicillin, 100 µg ml^{−1} streptomycin) and 2.5% heat-inactivated FCS.

2.4. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was performed to examine the morphology of PMNs. Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in DPBS 1× for 1 h at room temperature. After ethanol dehydration, samples were immersed in HMDS for 10 min, air-dried at room temperature and sputtered with thin gold–palladium film under a Jeol ion sputter JFC 1100. Cells were viewed using a LaB6 electron microscope (JEOL JSM-5400 LV, France).

2.5. Antibody cytokine arrays

Cytokines antibody arrays (“Human Inflammation III”, Raybiotech) were performed according to the manufacturer’s instructions. Briefly, 10-fold diluted culture supernatants or medium alone were incubated on antibody-coated membranes before detection with a streptavidin–horseradish peroxidase biotinylated-antibody complex and chemiluminescence detection on X-ray film for 30 s.

The integrated optical density (IOD) of each dot was measured on digitalized autoradiograms with ImageJ after subtraction of non-specific signal. Each value corresponds to the ratio between dot of interest and internal positive control (expressed as the mean of six internal control dots).

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay

IL-8 concentration was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit following the manufacturer's instructions. Controls included non-stimulated cells and medium alone. IL-8 was chosen because it is the chemokine most abundantly secreted by PMNs. The amount of this chemokine was measured simultaneously with standards to calculate the IL-8 concentration.

2.7. Gelatin zymography

Total protein concentrations of supernatants were measured using the Qubit system according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and equal amounts were used for zymography experiments. Gelatinolytic activities in supernatants were evaluated in 15% SDS–polyacrylamide gels containing 1 mg ml^{−1} gelatin. After electrophoresis, SDS was removed from the gel by two incubations in 2.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Then gels were incubated 20 h at 37 °C in 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl and 5 mM CaCl₂ (TCS buffer). The gels were stained for 30 min with Coomassie blue and then destained for 60 min in 10% methanol/20% acetic acid. Proteolytic activities were detected as clear bands against the blue background of stained gelatin and quantified as IOD by Gelpro software analysis.

2.8. Boyden chamber chemotaxis assay

Migration assays were performed in a 48-well microchemotaxis Boyden chamber (Neuroprobe, Gaithersburg, USA). Polycarbonate membranes with 5 µm pores were used (Nucleopore Track-etch membrane, Whatman). Bottom wells were loaded with 27 µl of PMNs supernatants exposed or not to HA particles, medium alone (negative control) or 100 ng ml^{−1} IL-8 or 100 ng ml^{−1} RANTES (positive controls for PMNs and monocytes respectively). A 50 µl volume of cells suspension was added to the upper well at a final concentration of 10⁶ cells ml^{−1}. The Boyden chamber was incubated for 1 h at 37 °C and the membrane was removed and stained with RAL 555 kit. The number of cells that migrated underneath the membrane was determined by counting four randomly chosen microscope fields (magnification 400×).

2.9. Statistical analysis

All experiments were performed in duplicate with six donors; the chemotaxis assay was performed in triplicate with six donors. The significance of the results was assessed

using an exact non-parametric and stratified permutation test (StatXact 7.0, Cytel Inc, Cambridge, MA, USA). We used non-parametric statistics because of the small numbers of donors, and the stratification allowed us to minimize the impact of the variability in the donors. Results are presented as the relative variation between the negative control and the stimulated cells for each donor (antibody arrays, gelatin zymography and chemotaxis assay). The ELISA test results of each donor are presented as the concentration in µg ml^{−1}.

3. Results

3.1. Changes in the morphology of PMNs in contact with HA

Light microscope analysis showed that PMNs cultured for 4 h either alone (Fig. 1A) or with HA particles (Fig. 1B) exhibit a round shape and an eosin-pink-stained delimited cytoplasm containing a blue nucleus, as shown by cytospin micrographs.

However, analysis of SEM micrographs indicated that, while cells alone exhibit a round morphology (Fig. 1C), HA particle-exposed cells spread, and filipodia could be observed in contact with biomaterial particles (Fig. 1D and E). Both phagocytosis (Fig. 1D) and frustrated phagocytosis (cell spreading on non-phagocytosable particles) (Fig. 1E) of HA particles could be observed.

3.2. Modulation of pro-inflammatory and chemotactic factors release by HA-stimulated PMNs

We measured the levels of 40 cytokines and chemokines by antibody arrays following exposure of PMNs to HA. We observed that human PMNs exhibited basal secretion of many types of cytokines and chemokines when cultured alone (control). In contrast, incubation of cells with PMA, a phorbol ester which is a potent activator of PMNs (positive control), induced a significant increase in cytokines and chemokines secretion by comparison to non-stimulated cells (from 1.06-fold to 3.75-fold). The IOD of each dot was measured on digitalized autoradiograms and HA-mediated modulation of cytokines secretion was expressed as HA-treated PMNs secretion/control secretion. Statistical analysis of the results highlighted a significant increase in nine cytokines and chemokines (IL-1α, IL-8, macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α), MIP-1β, eotaxin, eotaxin-2, I-309, IL-2 and IL-11) (**p* < 0.05) when freshly isolated PMNs were cultured with HA particles in comparison with non-stimulated cells (Table 1). Fig. 2 shows the levels of IL-1α, IL-8, MIP-1α and MIP-1β, which are known to be associated with PMNs-mediated inflammation. These results are similar to those obtained with PMA-treated cells for IL-1α, MIP-1α and MIP-1β (*p* > 0.05). IL-8 secretion peaked at 3.75-fold in comparison with non-stimulated cells and it is statistically different from the HA-stimulated cells condition (*p* < 0.05). PMA-

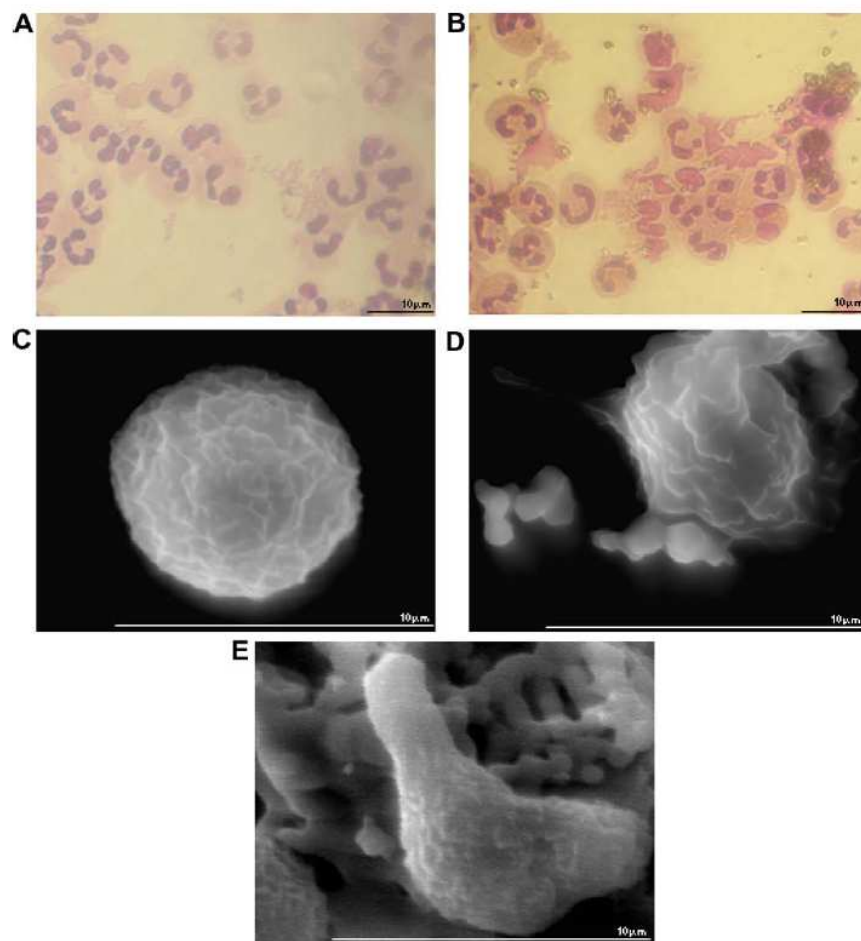


Fig. 1. Representative micrographs showing cytopsin of PMNs after 4 h of culture, alone (A) or with HA particles (B). SEM micrographs showing the morphology of PMNs alone (C) or with small (D) and large (E) HA particles.

Table 1

Variations of cytokines levels measured by antibody arrays: median of non-stimulated cells' IOD/HA stimulated cells' IOD of six donors (each donor in duplicate) flanked by first (Q1) and third (Q3) quartiles for each cytokine or chemokine evaluated.

	Q1	Median	Q3		Q1	Median	Q3		Q1	Median	Q3
Eotax	0.78	1.30*	2.05	IL-7	0.76	1.08	1.61	MIG	0.74	1.17	1.47
Eotax2	1.07	1.20*	1.56	IL-8	1.06	1.31*	1.53	MIP-1a	0.98	1.26*	1.97
G-CSF	1.11	1.67	2.25	IL-10	0.95	1.00	1.29	MIP-1b	1.15	1.22*	1.67
GM-CSF	0.72	1.04	1.36	IL-11	1.67	1.87*	2.51	MIP-1d	1.15	1.19	1.87
ICAM-1	0.69	0.96	2.10	IL-12p40	0.95	1.12	1.29	RANTES	0.81	1.25	1.37
IFNG	1.06	1.24	1.29	IL-12p70	0.92	1.01	1.62	TGF-b1	1.03	1.10	1.44
I-309	0.96	1.28*	1.62	IL-13	0.58	1.17	2.15	TNF-a	0.75	0.93	1.47
IL-1a	1.07	1.28*	1.71	IL-15	0.71	0.92	1.18	TNF-b	0.99	1.18	1.74
IL-1b	0.84	0.96	1.17	IL-16	0.85	1.12	1.41	sTNF RI	0.96	1.02	1.85
IL-2	0.99	1.39*	2.18	IL-17	0.85	1.17	1.61	sTNF RII	0.87	1.03	1.74
IL-3	0.67	1.20	1.71	IP-10	0.96	1.09	1.57	PDGF-BB	0.85	1.06	1.52
IL-4	0.72	1.05	1.36	MCP-1	0.91	1.01	1.31	TIMP-2	0.94	1.16	1.36
IL-6	0.87	1.50	1.59	MCP-2	0.69	1.03	1.41				
IL-6sR	1.03	1.22	1.48	M-CSF	0.65	1.00	1.31				

* A significant increase in stimulated cells vs. non-stimulated cells ($p < 0.05$).

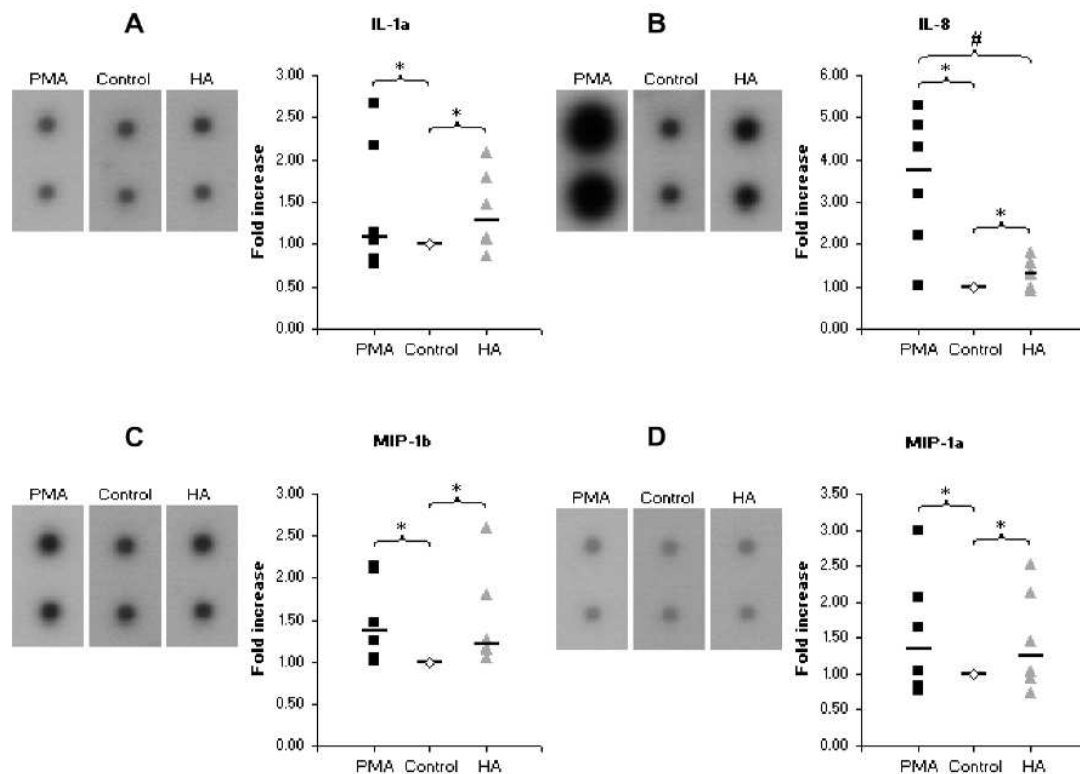


Fig. 2. Effect of HA particles on cytokines production by PMNs. (A–D) IL-1 α , IL-8, MIP-1 β and MIP-1 α arrays, respectively, treated with supernatants of PMA-stimulated cells (PMA), cells alone (Control) and HA-stimulated cells (HA). Shown are ratios of cytokine levels of stimulated over non-stimulated cells for six donors. Black bar represents median value. * $p < 0.05$ when compared with non-stimulated cells; # $p < 0.05$ when HA was compared to the PMA condition.

stimulated cell secretion of eotaxin and IL-2 was not statistically different from non-stimulated cell secretion ($p > 0.05$). Eotaxin-2, I-309 and IL-11 were secreted in the same range as in the HA-stimulated cells condition ($p > 0.05$) when PMNs were treated with PMA 1 μ M (data not shown).

To further confirm the increased levels of the mediators of interest in the presence of HA particles, we performed an ELISA for IL-8 on conditioned media of the six donors. In non-stimulated cell supernatants, the median IL-8 concentration was 11.6 μ g ml $^{-1}$, whereas in HA-stimulated cell supernatants the median concentration peaked at 17.6 μ g ml $^{-1}$. The PMA-stimulated cells supernatants contained approximately 8-fold more IL-8 than the HA stimulated cells supernatants ($p < 0.05$) (Fig. 3).

3.3. Modulation of matrix metalloproteinase 9 activity in HA-stimulated PMNs

Since it is well known that IL-8-activated human PMNs exhibit an increase in matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) release [19], we investigated the gelatinolytic potential of PMNs culture supernatants with gelatin zymography. We observed that PMNs released pro- and mature MMP-9 in

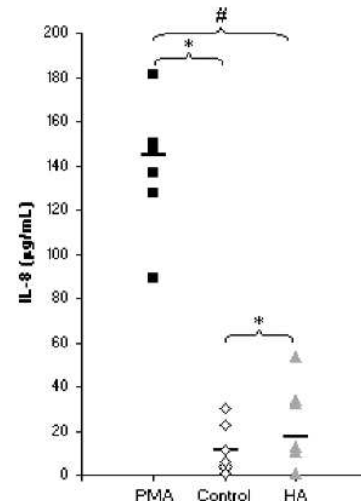


Fig. 3. Effect of HA particles on IL-8 secretion. ELISA was performed on cell culture supernatants. Shown are IL-8 values of six donors. * $p < 0.05$ when compared with non-stimulated cells; # $p < 0.05$ when HA was compared to the PMA condition.

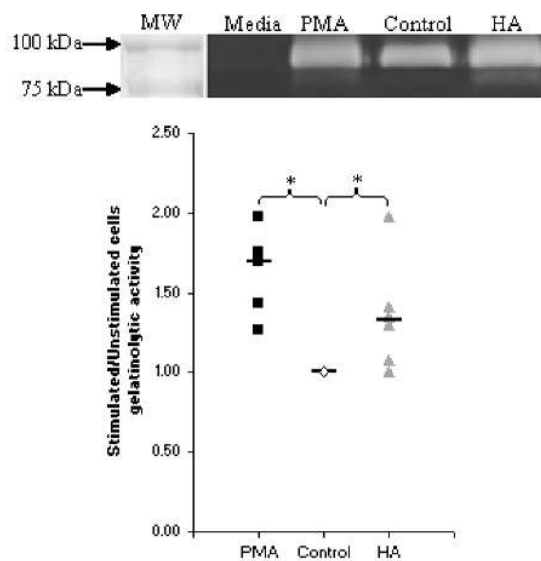


Fig. 4. Effect of HA particles on MMP-9 gelatinolytic activity. Cell culture supernatants were analysed by zymography. Molecular standards are on the left. Shown are ratios of IOD values of stimulated over non-stimulated cells of six donors. The black bar represents the median value. * $p < 0.05$ when compared with non-stimulated cells.

both the non-stimulated and stimulated conditions. Moreover, gelatinolytic activity increased about 1.3-fold in HA-exposed cells, similar to PMA-stimulated cells ($p > 0.05$). Medium with 2.5% autologous heat-inactivated serum alone was tested but did not exhibit any detectable proteolytic activity (Fig. 4).

3.4. Chemotactic properties of HA-stimulated neutrophil supernatants

To assess the ability of HA-stimulated neutrophil-secreted mediators to recruit circulating inflammatory cells, we performed a Boyden chamber chemotaxis assay. The classic chemoattractants for monocytes (100 ng ml^{-1} RANTES) and neutrophils (100 ng ml^{-1} IL-8) were used as positive controls (data not shown). We observed an approximately 41% increase in neutrophil chemotaxis in response to HA-stimulated neutrophil supernatants in comparison to non-stimulated neutrophils supernatants (Fig. 5A). Using similar experimental conditions, we observed an approximately 50% increase in monocyte migration (Fig. 5B). These results were similar to those obtained with PMA-stimulated cells supernatants on both cell types ($p > 0.05$).

4. Discussion

In this study, we provide for the first time compelling evidence that HA particles have the capacity to activate PMNs. Such activation is translated by the release of

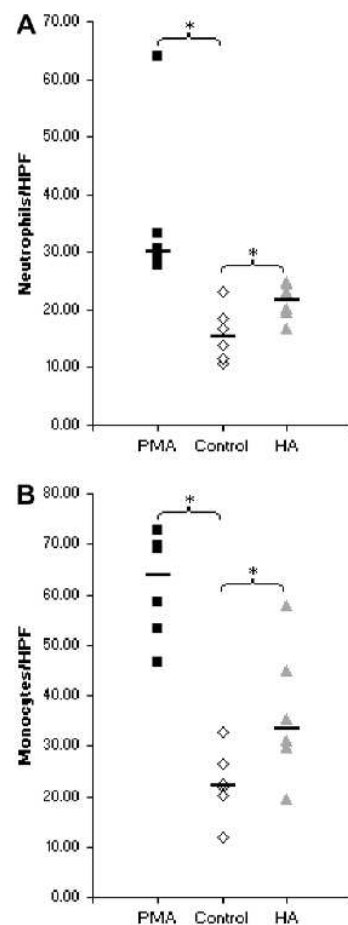


Fig. 5. Chemotactic effect of HA-stimulated PMN supernatants on PMNs (A) and monocytes (B). Cells were seeded at 10^6 ml^{-1} in the upper wells and migrate during 1 h vs. conditioned media. Migrating cells through the membrane were counted after staining. Shown are mean values of counted cells under a high-power field (4 HPF) of six donors. The black bar represents the median value. *A significant increase in stimulated vs. non-stimulated cells ($p < 0.05$).

various inflammatory mediators, known to recruit/activate and/or facilitate the passage of PMNs themselves, as well as other inflammatory cells. PMNs activation lead to cell adhesion and filopodia extension as assessed by SEM micrographs, showing adherent cells and cytoplasmic extension.

Whether PMNs are activated following normal or frustrated phagocytosis of HA particles remains to be determined. In any event, we demonstrated that HA particles are able to increase the production of cytokines and chemokines such as IL-1 α and IL-8. IL-1 α is a powerful activator of many types of cells, including PMNs and macrophages [20]. IL-1 α , a member of the IL-1 cytokine family, is involved in the acute phase of inflammation. This cytokine activates PMNs by inducing the degranulation and/or extracellular release of many mediators of inflam-

mation, IL-8 being the most abundant. Indeed, we found that increased levels of IL-1 α are associated with increased levels of IL-8. Interestingly, during the acute phase of the inflammatory response, IL-8 works in concert with IL-1 to stimulate phagocytic and secretory abilities of PMNs [21]. IL-8 also has a chemotactic effect on PMNs. It induces the influx of circulating leukocytes by creating a concentration gradient from the inflamed tissue to the blood vessels. A series of studies have shown that biomaterials particles (calcium carbonate or nano HA/collagen particles) induce the production of TNF- α [22] or an increase in the oxidative burst [23,24] by human PMNs. However, we were unable to confirm these observations when PMNs were exposed to sol-gel HA particles. In addition to IL-8, the production of the chemokines MIP-1 α and MIP-1 β is also increased in HA particle-treated PMNs. Our chemotaxis data using conditioned media of HA-exposed PMNs strongly suggest that together these chemokines contribute to the recruitment of inflammatory cells. In this regard, our findings corroborate previously published *in vivo* observations [25].

To reach inflamed sites, inflammatory cells including PMNs must traverse various barriers, such as the endothelial lining and its extracellular matrix [26]. This transmigration of cells could be facilitated by proteases [27]. In our study, increased levels of MMP-9 were observed upon exposure of PMNs to HA particles. MMP-9, also called gelatinase B, is a protease that increases the permeability of the endothelium and degrades extracellular matrix components [27,28], all of which potentially facilitate leukocyte transmigration. Of note, MMP-9 production is mediated by IL-8 fixation on CXCR2 [19].

Based on our findings, the following scenario could be envisioned regarding HA particle-mediated PMNs activa-

tion and inflammation. Following biomaterial implantation, released HA particles activate neutrophils by inducing the production of IL-1 α and IL-8 (Fig. 6). These latter mediate the release of chemokines (e.g. IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β) and proteinases (e.g. MMP-9), both of which contribute to the attraction of leukocytes and transmigration to the inflamed site. Studies are underway to determine the molecular mechanisms of HA-induced PMNs activation, namely the increased production of inflammatory mediators.

5. Conclusions

In conclusion, our findings are of importance. By analogy to other inflammatory diseases, unchecked PMNs activation could amplify HA-associated inflammation, leading in severe cases to implant loss.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, Avenir program and Région CHAMPAGNE-ARDENNE.

References

- [1] Bloebaum RD, Zou L, Bachus KN, Shea KG, Hofmann AA, Dunn HK. Analysis of particles in acetabular components from patients with osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 1997;338:109–18.
- [2] Prystowsky JB, Huprikar JS, Rademaker AW, Rege RV. Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro. *Dig Dis Sci* 1995;40(2):412–8.
- [3] Cheung HS, Devine TR, Hubbard W. Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5(3):145–51.
- [4] Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984;5(1):5–10.
- [5] Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, Jallot E, Laurent-Maquin D, Frayssinet P, Guenounou M. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2004;25(13):2515–24.
- [6] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2005;26(15):2361–9.
- [7] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec JM, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 2006;27(17):3195–200.
- [8] Meng ZH, Hudson AP, Schumacher Jr HR, Baker JF, Baker DG. Monosodium urate, hydroxyapatite, and calcium pyrophosphate crystals induce tumor necrosis factor- α expression in a mononuclear cell line. *J Rheumatol* 1997;24(12):2385–8.
- [9] Marques AP, Reis RL, Hunt JA. Cytokine secretion from mononuclear cells cultured in vitro with starch-based polymers and poly-L-lactide. *J Biomed Mater Res A* 2004;71(3):419–29.
- [10] Grandjean-Laquerriere A et al. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2007;28(3):400–4.
- [11] Penolazzi L, Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Vesce F, Gambari R, Piva R. Evaluation of chemokine and cytokine profiles in

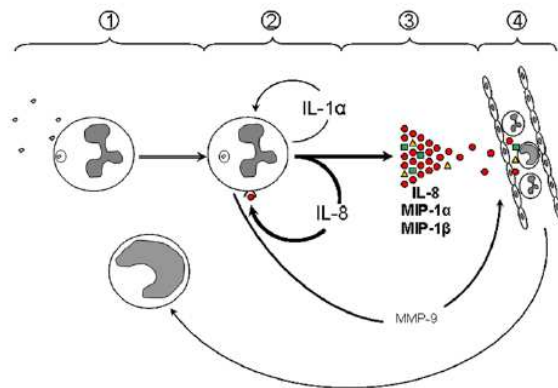


Fig. 6. Proposed model of HA-mediated stimulation of human neutrophils. Interaction of HA particles (●) with human PMNs (⊗) leads to cell activation and degranulation. This induces an increase in IL-1 α , IL-8 (●), MIP-1 α (●) and MIP-1 β (●) concentration. IL-8 recognition by CXCR-2 specific receptor induces an increase in MMP-9 release by PMNs and facilitates recruitment of circulating PMNs and monocytes (■) by chemokines.

- osteoblast progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-
PLEX technology. *Cell Biol Int* 2008;32:320–5.
- [12] Lisignoli G et al. Proinflammatory cytokines and chemokine
production and expression by human osteoblasts isolated from
patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol*
1999;26(4):791–9.
- [13] Lisignoli G et al. Different chemokines are expressed in human
arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate
IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts. *Cytokine*
2002;20(5):231–8.
- [14] Fritz EA, Glant TT, Vermes C, Jacobs JJ, Roebuck KA. Chemokine
gene activation in human bone marrow-derived osteoblasts following
exposure to particulate waste debris. *J Biomed Mater Res A*
2006;77(1):192–201.
- [15] Hirche TO et al. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant
protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohy-
drate recognition domain. *J Biol Chem* 2004;279(26):27688–98.
- [16] Nagase M, Nishiya H, Noda M. Priming effect of hydroxyapatite on
the chemiluminescence response in human polymorphonuclear leu-
kocytes. *FEBS Lett* 1994;349(1):13–6.
- [17] Jallot E, Nedelec JM, Grimault AS, Chassot E, Grandjean-Laquerriere
A, Laquerriere P, Laurent-Maquin D. STEM and EDXS character-
ization of physico-chemical reactions at the periphery of sol–gel derived
Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological
fluids. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;42(3–4):205–10.
- [18] Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macro-
phage/particle interactions: effect of size, composition and surface
area. *J Biomed Mater Res* 1994;28(1):81–90.
- [19] Chakrabarti S, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9
release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol*
2005;78(1):279–88.
- [20] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*
1996;87(6):2095–147.
- [21] Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and
inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307(1):97–101.
- [22] Liao S et al. Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-
hydroxyapatite/collagen and nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-
lactic acid) composites. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(4):820–5.
- [23] Burt HM, Jackson JK, Taylor DR, Crowther RS. Activation of
human neutrophils by calcium carbonate polymorphs. *Dig Dis Sci*
1997;42(6):1283–9.
- [24] Patel JD, Krupka T, Anderson JM. iNOS-mediated generation of
reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neu-
trophils. *J Biomed Mater Res A* 2006;80(2):381–90.
- [25] Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory
protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(6):455–81.
- [26] Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an
emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*
2000;52(3):349–74.
- [27] Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Moser CM, Linder S, Khandoga
A, Krombach F. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo:
evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV
remodeling. *J Leukoc Biol* 2008;83(4):864–74.
- [28] Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T.
Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell
Biochem* 2003;253:269–85.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants:

- Les polynucléaires neutrophiles interagissent physiquement avec les particules d'hydroxyapatite en émettant des prolongements cytoplasmiques qui favorisent l'adhésion cellulaire au biomatériau.
- Les particules d'hydroxyapatite induisent des variations de sécrétions d'un nombre restreint de cytokines et chimiokines par les PMNs parmi lesquelles l'IL-1 α , l'IL-8 et les MIP-1 α et MIP-1 β .
- Les PMNs, en réponse aux particules d'HA, accroissent l'activité gélatinolytique liée à la sécrétion de la métalloprotéase matricielle 9.
- Le pouvoir chimioattractant du milieu extracellulaire envers les cellules inflammatoires est accru lorsque les PMNs sont au contact de particules d'hydroxyapatite.

Notre travail fournit pour la première fois des arguments en faveur du potentiel activateur des particules d'hydroxyapatite sur les polynucléaires neutrophiles en terme de sécrétion de cytokines, chimiokines et protéases. Ces résultats sont très importants pour la compréhension des mécanismes précoces conduisant, à terme, à l'infiltration de cellules inflammatoires, responsables des échecs opératoires dus au descellement aseptique des prothèses. En effet, nous avons montré une augmentation à la fois d'IL-1 α et d'IL-8, à effet activateur sur les polynucléaires neutrophiles, l'IL-8 étant également un puissant chimioattractant de ces mêmes cellules. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation de la concentration en MIP-1 α et MIP-1 β qui sont chimioattractants pour les monocytes. Ces sécrétions augmentées de chimiokines rendent compte des observations histologiques montrant depuis plusieurs décennies à la fois des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages sur les sites périprothétiques.

Il est également à noter que ce phénomène de recrutement cellulaire à partir du sang circulant est facilité par l'augmentation de la protéolyse matricielle et notamment de la lame basale des vaisseaux sanguins, qui favorise l'influx des cellules immunitaires.

2^{ème} Partie : Modulation de la réponse des polynucléaires neutrophiles à l'hydroxyapatite par l'utilisation d'une hydroxyapatite substituée en zinc.

Les interventions chirurgicales liées aux pathologies de la hanche sont un problème de santé publique majeur, qui s'accroît avec le vieillissement de la population. La restauration de la fonction de la hanche se fait majoritairement par la pose de prothèses orthopédiques. La complication principale de ce type d'intervention survient après quelques années et concerne le descellement aseptique des implants. Or, les débris d'HA, générés à partir de la surface prothétique, possèdent des capacités inflammatoires abondamment décrites dans la littérature sur les monocytes/macrophages. Nous avons récemment démontré que ce potentiel inflammatoire était également retrouvé avec les PMNs. Des travaux antérieurs de l'équipe ont permis de démontrer que ce potentiel inflammatoire des particules d'hydroxyapatite, sur les monocytes macrophages, pouvait être modulé si le matériau avait une partie de ses ions calcium substituée par des ions zinc.

Dans le cadre des problèmes posés par l'inflammation liée aux particules d'hydroxyapatite en clinique, la régulation des réponses inflammatoires, aiguë comme chronique, semble être une piste envisageable pour augmenter la durée de vie des implants. Nous avons donc entrepris d'étudier pour la première fois le potentiel immunomodulateur de l'hydroxyapatite substituée par 5% de zinc (HA5%) sur la réponse inflammatoire aiguë due aux PMNs. Plus particulièrement, faisant suite à nos travaux précédents, ces études ont été focalisées majoritairement sur l'IL-8, médiateur sécrété abondamment par les neutrophiles, pour son implication en tant qu'activateur et chimioattractant des PMNs dans la réponse inflammatoire précoce.

Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord mesuré par ELISA les variations de la concentration en IL-8 dans les surnageants de culture de PMNs au contact d'HA ou HA5%. Nos résultats ont mis en évidence une diminution de la concentration de ce médiateur inflammatoire lorsque les cellules sont au contact de l'HA5%.

Afin de définir si ces variations étaient dues à des modifications de la quantité de transcrits de l'IL-8, nous avons réalisé des expériences de PCR en temps réel qui nous ont

permis de mettre en avant une diminution de la production des ARNm de l'IL-8 par les PMNs au contact d'HA5% comparativement à ceux au contact d'HA.

Nous avons par la suite vérifié que la décroissance de concentration en IL-8 s'accompagnait d'une diminution du potentiel chimiotactique des surnageants de culture des PMNs. Les résultats de migration en chambre de Boyden montrent que les PMNs migrent moins en réponse aux surnageants de cellules ayant été au contact d'HA5%, confirmant que l'IL-8 est majoritairement responsable de la migration des PMNs dans notre système expérimental.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les protéases sont à la fois nécessaires à la progression cellulaire dans les tissus mais également signe de l'activation des PMNs par l'IL-8 dans notre système. Nous avons donc voulu nous assurer que l'HA5% induisait effectivement une diminution de l'activité gélatinolytique des surnageants de culture des PMNs en accord avec les diminutions de concentration en IL-8. Les expériences en zymographie nous ont permis de confirmer que l'HA5% induisait une diminution de l'activité enzymatique de la MMP-9. Nous avons recherché par PCR en temps réel si cette variation d'activité enzymatique pouvait être expliquée par une variation de la transcription du gène de la MMP-9, mais nos résultats ne montrent pas de différence significative quelles que soient les conditions étudiées. Nous avons alors envisagé de vérifier l'hypothèse selon laquelle la libération de la MMP-9 est liée à l'interaction entre IL-8 et ses récepteurs. Ainsi, une diminution de ces derniers à la surface cellulaire pourrait être responsable de la diminution de l'activité gélatinolytique que nous observons.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons effectué une étude en cytométrie en flux de la présence des récepteurs CXCR-1 et CXCR-2 à la surface des PMNs. Nous avons ainsi démontré que le récepteur CXCR-1 était moins présent à la surface des PMNs stimulés par HA et HA5% par comparaison aux conditions basales de culture, ce qui n'est pas le cas de CXCR-2. Une étude en PCR en temps réel nous a permis de démontrer que ces variations de la présence des récepteurs n'étaient pas liées à des variations des ARNm de ces protéines membranaires. Il semble donc que la seule régulation des récepteurs de l'IL-8 ne puisse pas rendre compte des variations de l'activité de la MMP-9.

Considérant ces résultats dans leur ensemble, il nous est apparu que l'IL-8 jouait un rôle primordial au sein de notre système expérimental dans la réponse des PMNs aux particules d'HA et que ses récepteurs semblaient également impliqués dans la régulation des processus inflammatoires. Afin de vérifier ceci, nous avons proposé de bloquer ces récepteurs à l'aide d'anticorps spécifiques avant d'exposer les PMNs aux particules HA.

Les résultats obtenus dans ce cadre en ELISA nous ont permis de démontrer que le blocage simultané ou individuel des récepteurs bloquait toute variation de la concentration en IL-8 dans les surnageants de culture des PMNs et que le blocage simultané permet d'abolir également toute variation au niveau des ARNm. Cependant, l'expression des ARNm varie de façon identique que l'on ne bloque le CXCR-2 seul ou que l'on n'utilise pas d'anticorps. Le blocage de CXCR-1 seul, en revanche, aboutit à une abolition des variations des ARNm de l'IL-8 sous l'effet des particules d'HA alors que l'HA5% permet de diminuer la production des messagers de l'IL-8 sous le niveau d'expression basale.

Les études en zymographie de l'activité gélatinolytique de la MMP-9 ainsi que de la présence de ses transcrits en PCR en temps réel montre que le blocage des récepteurs aboutit à une abolition de toute variation quelle que soit la stimulation.

Nos résultats indiquent donc que l'HA5% est à même de réguler l'inflammation liée aux biomatériaux et peut être envisagé comme matériau de recouvrement prothétique susceptible d'allonger la durée de vie des implants. Par ailleurs, cette étude nous permet d'affiner notre modèle de la réponse des PMNs aux particules de biomatériaux.

Effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils: potential modulatory role in bone implant-associated acute inflammation.

VELARD Frédéric^{a, d*}, LAURENT-MAQUIN Dominique^a, BRAUX Julien^a, GUILLAUME Christine^a, BOUTHORS Sylvie^a, JALLOT Edouard^b, NEDELEC Jean-Marie^c, BELAAOUAJ Abderrazzaq^d, and LAQUERRIERE Patrice^{a,e}

a. INSERM, UMR-S 926, CHU de Reims, IFR 53, URCA - 1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, Cedex, France.

b. CNRS/IN2P3, UMR 6533, Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal - 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France.

c. CNRS, UMR 6002, Laboratoire des Matériaux Inorganiques, Université Blaise Pascal - 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France.

d. EA 4303, Inflammation et Immunité de l'Épithélium Respiratoire, CHU de Reims, IFR 53, URCA – 45 rue Cognacq Jay, 51092 Reims Cedex, France.

e. CNRS, UMR 7178, IPHC, équipe IMABIO - 23 rue Loess, BP 28, 67037 Strasbourg Cedex 02, France.

* Corresponding author : VELARD Frédéric, INSERM UMR-S 926, 1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, Cedex, France

Tel : (33) 3 26 91 80 10 Fax : (33) 3 26 91 86 43

e-mail : frederic.velard@univ-reims.fr

ABSTRACT

The restoration of bone function after diseases (e.g. Hip fractures, cancer...) is a worldwide public health problem. Hydroxyapatite (HA) is widely used as coating biomaterial for prosthesis metal parts and as bone substitute. The release of HA particles induces an inflammatory response and, if uncontrolled, could result in implant loss. At the inflamed site, the polymorphonuclear cells (PMNs) represent the earliest phagocytic cells that predominate the cellular infiltrate. We have recently proposed that HA wear debris activate polymorphonuclear cells (PMNs) initiating and/or amplifying thereby the acute inflammatory response. Previous studies have shown that activation of monocytes by HA could be modulated by supplementing this latter with the divalent cation, Zinc. The purpose of this work was to investigate the modulation of PMNs activation following exposure to zinc-substituted HA. Our study demonstrate that addition of zinc to HA particles resulted in decreased levels of the pro-inflammatory mediator interleukin-8 (IL-8) and the matrix metalloproteinase 9. We also show that these changes involve IL-8 receptors (CXCR-1 and CXCR-2). To our knowledge, this study reports for the first time the modulation of PMN activation by zinc-substituted hydroxyapatite suggesting a potential alternative to control the bone implant-associated inflammation at its early stage.

Keywords: Inflammation, Neutrophil, Interleukin-8, Hydroxyapatite, Zinc

INTRODUCTION

Approximately, 1.7 million hip fractures occurred annually worldwide, a number that is expected to triple in the next 50 years [1]. In the USA, the annual cost of interventions in hip-related problems has been estimated to reach 10 billion dollars [2] and it is expected to exceed 15 billion dollars within a few years due to population aging [3]. The functional restoration of a femoral neck damage is obtained by the implantation of hip prosthesis. Hydroxyapatite (HA) is widely used because of biocompatibility and bioactivity. HA is also used as bone substitute following tumour resection [4, 5]. To fill this bone defect, HA is used as a cement increasing bone growth [6, 7]. Other applications of HA include its use in fixation of implants [8] and coating of the metal parts of prosthesis (e.g. total hip arthroplasty) [9].

The outcomes of artificial hip replacement are overall satisfactory (mean lifespan is 14 years [10]). However, the concern with this intervention is the implant loosening over time [11]. Part of this concern is the tendency of HA coating/implant to fragment and generate particles wear debris [12, 13]. These particles, foreign to the host, trigger an unchecked inflammatory response characterized by unopposed recruitment and activation of immune cells [14, 15]. The earliest phagocytic cells that accumulate in the setting of inflammation (for instance at the bone-implant interface) are polymorphonuclear cells (PMNs) followed subsequently by monocytes [16, 17]. Recently, we have demonstrated that HA particles have the capacity to activate human PMNs [18]. Indeed, we have shown that HA particles induce the production and release of inflammatory mediators such as proteases and cytokines/chemokines

It is documented that the divalent cation Zinc acts at low concentration as pro-inflammatory molecule and at high concentration as an anti-inflammatory molecule [19-21]. In recent years, studies from our laboratory reported the immunomodulatory effect of a zinc-substituted hydroxyapatite on monocytes [22]. Whether Zinc modulates PMN's response to HA has not been yet described. To address this question, we focused in this study on the expression and secretion of two major PMN inflammatory mediators namely the immune cell chemotactic cytokine interleukin-8 (IL-8) and the matrix metalloproteinase-9, also called gelatinase B [23, 24]. We have found that IL-8 was down-regulated both at the mRNA and protein level when PMNs were in contact with zinc-substituted hydroxyapatite whereas matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity only was modulated.

MATERIALS AND METHODS

Media and reagents. Polymorphprep used for PMNs separation was from Axis-shield. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1X was from Gibco. RPMI 1640 Glutamax was purchased from Invitrogen. Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), gelatin, sodium-dodecyl-sulfate (SDS), TritonX100, NaCl and CaCl₂ were from Sigma-Aldrich. ZnCl₂ was from VWR. Quick May Grünwald Giemsa staining was performed with RAL 555 kit from Reactifs RAL. Ca(NO₃)₂.4H₂O and P₂O₅ for HA powder were from Aldrich and Avocado Research Chemicals. Zn(NO₃)₂.6H₂O used for zinc-substituted HA preparation was from Acros Organics. IL-8 ELISA duo-set, recombinant human chemokine IL-8, Anti-Human CXCR1 monoclonal antibody, Anti-Human CXCR2 monoclonal antibody and Mouse IgG_{2A} Isotype Control were from R&D systems. FITC Annexin V, Propidium Iodide Staining Solution (PI), FITC Mouse Anti-Human CXCR1 antibody, PE Mouse Anti-Human CXCR2 antibody, FITC Mouse IgG_{2b}κ Isotype Control and PE Mouse IgG₁κ Isotype Control were purchased from BD Pharmingen.

Sol-gel preparation of HA and Zn-substituted HA. Two g of pure sol-gel derived HA powder were obtained with 4.7 g of Ca(NO₃)₂.4H₂O and 0.84 g of P₂O₅ dissolved in ethanol under stirring and under reflux at 85°C for 24 h. Then, this solution was cooled and maintained at 55°C for 24 h to obtain a white consistent gel, which was further heated at 80°C for 10 h to obtain a white powder. Finally, the powder was heated at 1100°C for 15 h. Use of such a high temperature allows the synthesis of pure and well crystallized hydroxyapatite. Powder was characterised as previously described [25]. To prepare Zn-substituted HA, Zn(NO₃)₂.6H₂O was added to the solution. Zn substituted HA was prepared with a 5% Zn-substitution of calcium ions (HA5%). HA and HA5% powders were used with a surface area ratio (Specific surface of material/Specific surface of cell) of 1 as previously described [26]. The particles ranged from hundred nanometers to ten micrometers. Of importance, HA and HA5% were tested and were found to be endotoxin free using the E-toxate kit from Sigma-Aldrich.

Collection of blood samples, cell isolation and culture. Venous blood was collected on EDTA (BD Vacutainer® K2E) from healthy donors with accordance of the "Etablissement Français du Sang Nord de France" and after written informed consent of donors. Neutrophils were purified from whole human blood using PolymorphprepTM

protocol. Residual erythrocytes were removed by a hypotonic shock. Resulting neutrophils were resuspended in DPBS 1X and represented greater than 97% of the cells. PMNs were at least 97% viable. Five million cells were cultured in 1 mL of RPMI 1640 Glutamax and 2.5% heat-inactivated autologous human serum for 4 h in 24-well falcon plates (Becton Dickinson) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. The culture media consisted of medium alone or medium containing HA, HA5%, ZnCl₂ 20 µM (Zn) or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 1 µM (used as a positive control). Medium alone was tested for IL-8 concentration and MMP-9 activity and results demonstrate both proteins were under the detection thresholds (data not shown). At the end of the culture time, cells were centrifuged at 400 g for 10 min, supernatants were collected and frozen at -20°C and cells were frozen at -80°C. PMA was used to ensure that isolated PMNs are responsive. Indeed, all subsequent experiments (ELISA, RT-PCR, Chemotaxis assay) demonstrate a statistical difference ($p < 0.05$) between PMA-treated cells and untreated cells (data not shown).

Blocking of IL-8 receptors. Isolated PMNs were pre-incubated for 30 minutes with 15 µg/ml of IgG_{2A} isotypes control, 5 µg/ml of anti-human-CXCR-1, 10 µg/ml of anti-human CXCR-2 or a mix containing both 5 µg/ml of anti-human-CXCR-1 and 10 µg/ml of anti-human-CXCR-2. Next, the cells were treated and cultured under the same conditions as described above.

IL-8 ELISA. IL-8 concentration in PMNs conditioned supernatants was measured by ELISA kit following manufacturer's instructions. Controls included non-stimulated cells and medium alone. Levels of IL-8 were estimated using human recombinant IL-8 standard curve. The detection limit for the kit was 5 pg/ml.

Real Time PCR analysis. Total RNA was extracted from $5 \cdot 10^6$ PMNs using MasterPureTM RNA Purification Kit Epicentre[®] Biotechnologies in accordance with the manufacturer technical data sheets. RNA purity was assessed by measuring the absorbance ratio at 260nm/280nm. All measured samples were comprised between 1.9 and 2. RNA was reverse transcribed into cDNA with a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) following manufacturer instructions. After reverse transcription, the cDNA product was amplified by real-time PCR. Using this approach, the mRNA levels for IL-8, MMP-9, CXCR-1, CXCR-2 and 18S were determined using the double strand-

specific Power SYBR[®] Green dye system (Applied Biosystems). All reactions were performed according to the following thermal profile: the first step, corresponds to 50 C for 2 minutes followed by denaturation at 95 C for 10 minutes. The second step corresponds to forty cycles of denaturation at 95 C for 15 s, annealing and extension at 60 C for 1 min (data collection was performed at the end of each annealing/extension step) (ABI Prism 7000). The third step is a dissociation process to ensure the specificity of the amplicons by measuring their melting temperature (T_m). Primer sequences for IL-8, MMP-9, CXCR-1 and CXCR-2 and the internal control 18S were determined with the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Applied Science). Primers efficiency was also measured (Table 1). Data analysis was performed with the SDS software (Applied Biosystems). Results were calculated in accordance with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Table I. Nucleotides sequence of primers used for RT-PCR and reaction efficiency for each primers couple.

mRNA	Sense primer	Antisense primer	Efficiency
IL-8	5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3'	5'-GTGCAGTTTTGCCAAGGAG-3'	1.99
MMP-9	5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3'	5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'	1.99
CXCR-1	5'-GAAGCACCGAGCCATGAG-3'	5'-CAGCAGGACCAGGTTGTAGG-3'	1.98
CXCR-2	5'-ATGCCCTGGTATTCCTGCT-3'	5'-GCCGACCCTGCTGTATAAGA-3'	2.00
18S	5'-TGCGAGTACTCAACACCAACA-3'	5'-TGTGGGCCGAAGATATGC-3'	1.98

Gelatin zymography. Total protein concentrations of supernatants were measured using Qubit system according to manufacturer's instructions (Invitrogen) and equal amounts (1 g) were used for zymography experiments. Gelatinolytic activities in supernatants were evaluated in 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg.mL⁻¹ gelatin. After electrophoresis, SDS was removed from the gel by two incubations in 2.5% Triton X100 for 30 min at room temperature. Then, gels were incubated 20 h at 37 C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl and 5 mM CaCl₂ (TCS buffer). The gels were stained for 30 min with Coomassie Blue and then destained for 60 min in 10% methanol, 20% acetic acid. Proteolytic activities were detected as clear bands against the blue background of stained gelatin and quantified as integrated optical density (IOD) by Gelpro software analysis.

Boyden chamber chemotaxis assay. Migration assays were performed in 48-well microchemotaxis Boyden chamber (Neuroprobe). Polycarbonate membranes with 5 μm pores were used (Nucleopore Track-etch membrane, Whatman). Bottom wells were loaded with 27 μL of PMNs supernatants [derived from cells that were exposed to HA, HA5%, PMA 1 μM , ZnCl_2 20 μM , medium alone (negative control)] or IL-8 100 ng.mL^{-1} (positive control for PMNs, data not shown). Fifty microliters of cell suspension were filled in upper wells at final concentration of 10^6 cells per mL. Boyden chamber was incubated 1h at 37°C and the membrane was removed and stained with RAL 555 kit. The number of cells that migrated underneath the membrane was determined by counting four randomly chosen fields of microscope (Zeiss, Axiovert 200M, magnification x400).

Flow Cytometric Analysis. PMNs were centrifuged and stained according to the manufacturer's specifications for analysis by flow cytometry. CXCR-1 and CXCR-2 antibodies staining were performed in D-PBS 1X.

All data were obtained on FACS Aria and analyzed with FACS Diva software (Becton Dickinson) and FlowJo 7.5.3 (Demo mode). At least 10,000 events were recorded for each condition. Appropriate mAb isotypic controls were included in each analysis, with acquisition and analysis gates set accordingly.

Statistical analysis. All experiments were performed with 6 donors in duplicate. Chemotaxis assay and RT-PCR were performed in triplicate. The significance of results was assessed using an exact non-parametric and stratified permutation test (StatXact 7.0, Cytel Inc). We used non parametric statistics because of the few numbers of donors we had, and the stratification allowed to take into account the impact of donors variability.

RESULTS

Exposure of PMNs to zinc-substituted hydroxyapatite results in decreased IL-8 expression.

We measured IL-8 levels in conditioned media of stimulated and non stimulated human PMNs. As shown in Figure 1.A, ELISA data demonstrate increased IL-8 concentration in HA-stimulated PMNs' supernatants. These results are in accordance with our previously published work [18]. Substitution of HA with zinc (HA5%) decreased the levels of released IL-8 significantly by comparison to HA alone. Interestingly, IL-8 levels in supernatants of untreated and HA5%-treated cells were not significantly different. Of note, statistical analyses showed that use of zinc chloride alone did not induce a significant variation in IL-8 concentration by comparison to control condition.

Next, to determine whether these changes are associated with changes in mRNA expression levels, we performed real-time PCR analysis (RT-PCR) (Fig. 1.B). Data analyses found that the levels of IL-8 mRNA followed the same trend as for IL-8 protein. Specifically, HA particles induced an increase of IL-8 mRNA production in stimulated PMNs. HA5%-stimulated PMNs exhibited lower levels of mRNA IL-8 by comparison to HA-stimulated cells, but did not show any differences when compared to control cells. There is no variation in IL-8 mRNA production in Zn-stimulated PMNs.

Together, our results suggest strongly a modulatory role for the zinc in the expression of IL-8 by HA-activated PMNs.

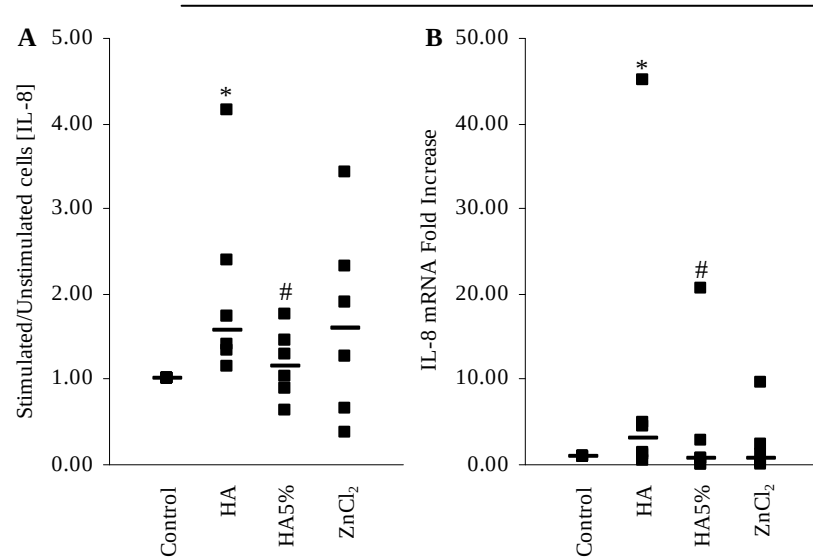


Figure 1. A. Effect of Zn on HA-mediated IL-8 secretion. ELISA was performed on cell culture supernatants. Shown are IL-8 values of 6 donors (Stimulated over non-stimulated cells ratio). **B.** Effect of Zn on HA-mediated mRNA IL-8 production. RT-PCR analysis was performed as described in materials and methods and data were shown as specific variation of IL-8 mRNA using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (18S was used as internal control). Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells, # means $p < 0.05$ when compared to HA condition.

Decreased chemotactic properties of zinc-substituted hydroxyapatite PMN-derived conditioned media

Culture media of untreated and treated cells were next tested for their ability to attract inflammatory cells. We performed Boyden chamber chemotaxis assay. In concert with the purpose of this study, we focused on PMNs. Consistent with our previous work, we have observed significant increase of neutrophils chemotaxis in response to HA-exposed neutrophils conditioned media (Fig. 2). Contrary to HA treatment, HA5%-stimulated cell derived culture supernatants attracted very poorly PMNs and behaved nearly similarly to control conditioned media. Of note, culture supernatants of zinc alone-stimulated cells demonstrated no chemotaxis properties by comparison to control.

Our data indicate that zinc substitution in hydroxyapatite contributes substantially in decreasing the chemotactic activity of neutrophil-derived mediators including IL-8.

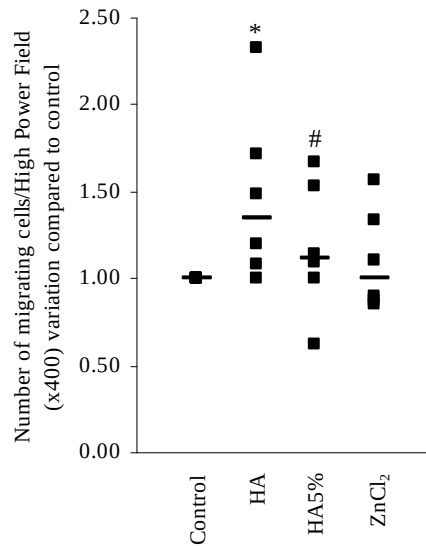


Figure 2. Boyden chamber chemotaxis assay. Cells were seeded at 10^6 per mL in the upper wells and allowed to migrate for 1h against conditioned media (lower wells). Migrated cells through the membrane were counted after staining.

Shown are triplicates mean values of counted cells under high power field (4 HPF) of 6 donors. Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells, # means $p < 0.05$ when compared to HA condition.

Exposure of PMNs to zinc-substituted hydroxyapatite results in decreased gelatinolytic activity, but not mRNA expression, of MMP-9.

It was previously described that IL-8-exposed human PMNs exhibit an increased gelatinase B (MMP-9) release [27]. We then assessed the gelatinolytic activity in our PMN culture supernatants by zymography using gelatin as a substrate (Fig. 3.A). In accordance with our previous study, HA induces significantly increased PMN's release of gelatinolytic activity in culture media. In contrast, HA5% has opposing effect in that the gelatinolytic activity of cells decreased to level similar to that in control condition. Of note, Zinc alone-stimulated cells conditioned media showed considerable decrease in gelatinolytic activity when compared to basal condition (Fig. 3.B).

Next, to determine whether these changes are associated with changes in mRNA expression levels, we performed real-time PCR analysis (RT-PCR). Data analyses found no apparent changes in mRNA levels in all treatment conditions (Fig. 3.C).

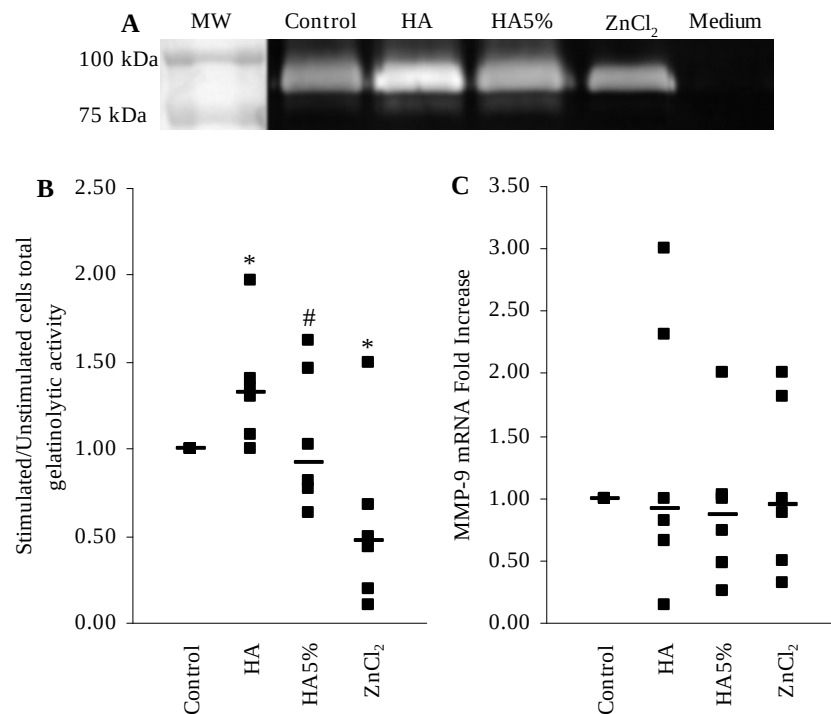


Figure 3. A. Representative gel image of six independent experiments of gelatin zymography. Transparent bands correspond to MMP-9 gelatinolytic activity **B.** Effect of Zn on PMNs supernatants total MMP-9 gelatinolytic activity. Cell culture supernatants were analysed by gelatin zymography. Molecular standards are on the left. Shown are ratios of IOD values of stimulated over non-stimulated cells of 6 donors. **C.** Effect of Zn on HA-mediated mRNA MMP-9 production. RT-PCR data were shown as specific variation of MMP-9 mRNA using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (18S was used as internal control). Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells, # means $p < 0.05$ when compared to HA condition.

Determination of CXCR-1 and CXCR-2 levels in HA particles-exposed PMNs.

Next, we sought to determine the levels of IL-8 receptors, CXCR-1 and CXCR-2, localized on the cell surface of treated PMNs. Both CXCR-1 and CXCR-2 were present on the cell surfaces (Fig 4.A and B) in both control and stimulated conditions. Data analyses revealed that HA, HA5% and zinc chloride alone decrease the level of CXCR-1 related mean fluorescence intensity (MFI) by comparison to control. Of importance, the CXCR-1 related MFI was not different between HA- and HA5%-stimulated cells (Fig. 4.C). CXCR-2 related MFI decreased only when cells were stimulated with zinc chloride alone by comparison to control (mean 50% decrease) (Fig. 4.D).

To determine whether these changes are linked to changes in transcript expression, we performed RT-PCR. Results found that the expression degrees of the receptors were not altered in any treatment conditions (Figures 4.E and F).

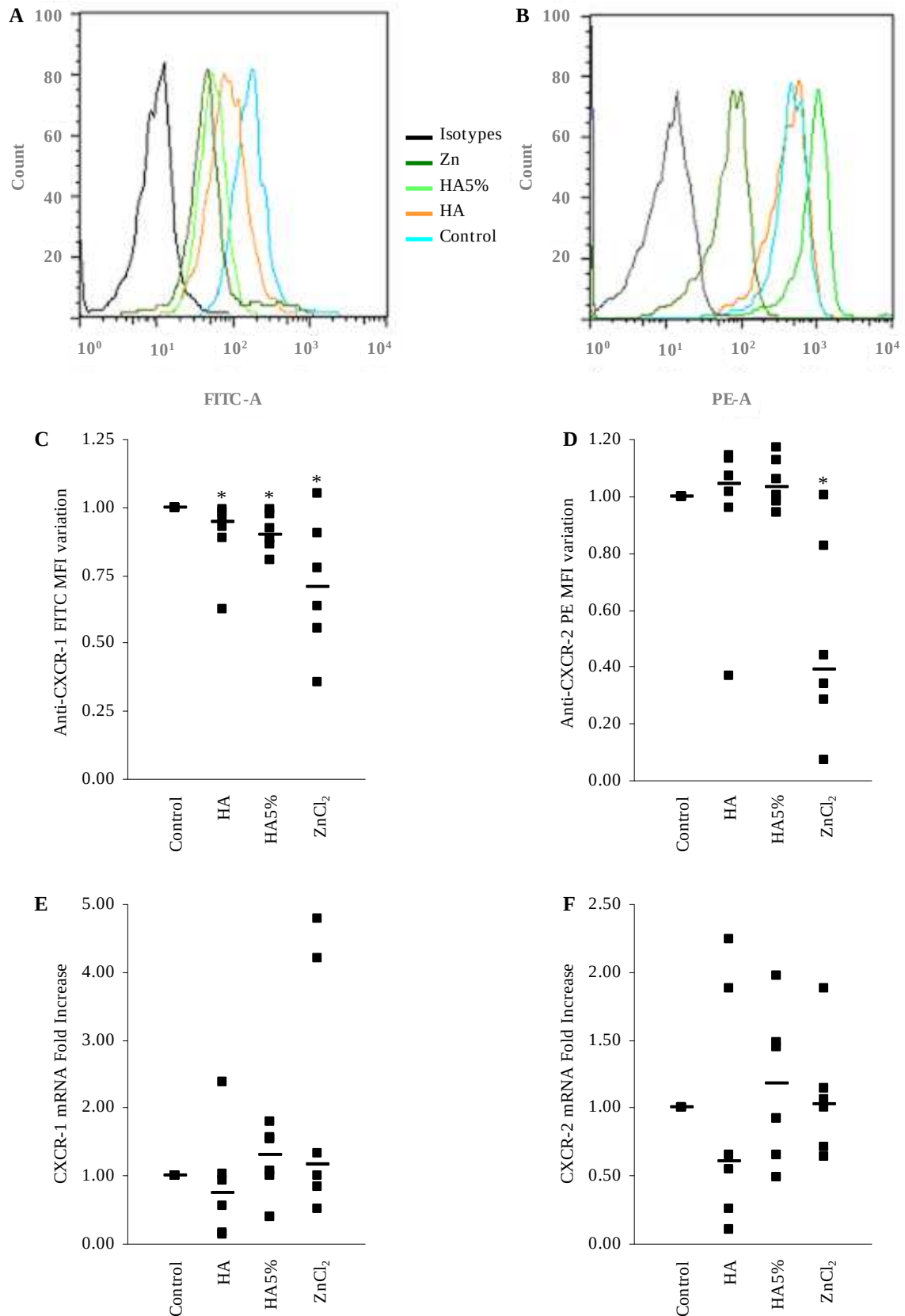


Figure 4. A and B. Expression levels of CXCR1 and CXCR2 on PMN surfaces were determined by flow cytometry analysis. Data are representative of six independent experiments. **C and D.** Variation of CXCR-1 and CXCR2 levels on PMN surfaces were measured by the mean fluorescence intensity variation compared

to control condition. **E and F.** Evaluation of CXCR-1 and CXCR2 mRNA production by RT-PCR. RT-PCR results were expressed as specific variation of CXCR-1 and CXCR-2 mRNA using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (18S was used as internal control). Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells.

Blocking of IL-8 receptors results in changes of IL-8 levels.

To evaluate the involvement of IL-8 receptors in particles-induced PMN response, we blocked CXCR-1, CXCR-2 either individually or simultaneously prior to cell treatment. We then determined IL-8 protein and transcript levels as described above. First, when cells were treated with isotypes antibodies, there was no changes in IL-8 levels both at the protein and mRNA transcript levels (data not shown). As shown in Figure 5, in all treatment conditions simultaneous or individual receptor blocking with anti-human-CXCR-1 and anti-human-CXCR-2 did not point out to any significant differences in IL-8 concentration by comparison to control (Fig. 5A, B, and C). Also, there were no appreciable differences in mRNA transcripts with simultaneous blocking (Fig. 5D). Interestingly, while pre-incubation of cells with anti-human-CXCR-1 prior to treatment with HA did not elicit any IL-8 mRNA variation, a decrease in this chemokine mRNA level by comparison to control was observed in HA5% treatment condition (Fig. 5E). RT-PCR results indicated that despite the pre-treatment with anti-human-CXCR-2 there was an increased IL-8 mRNA expression in HA stimulated cells, which was decreased to control level with HA5% (Fig. 5F).

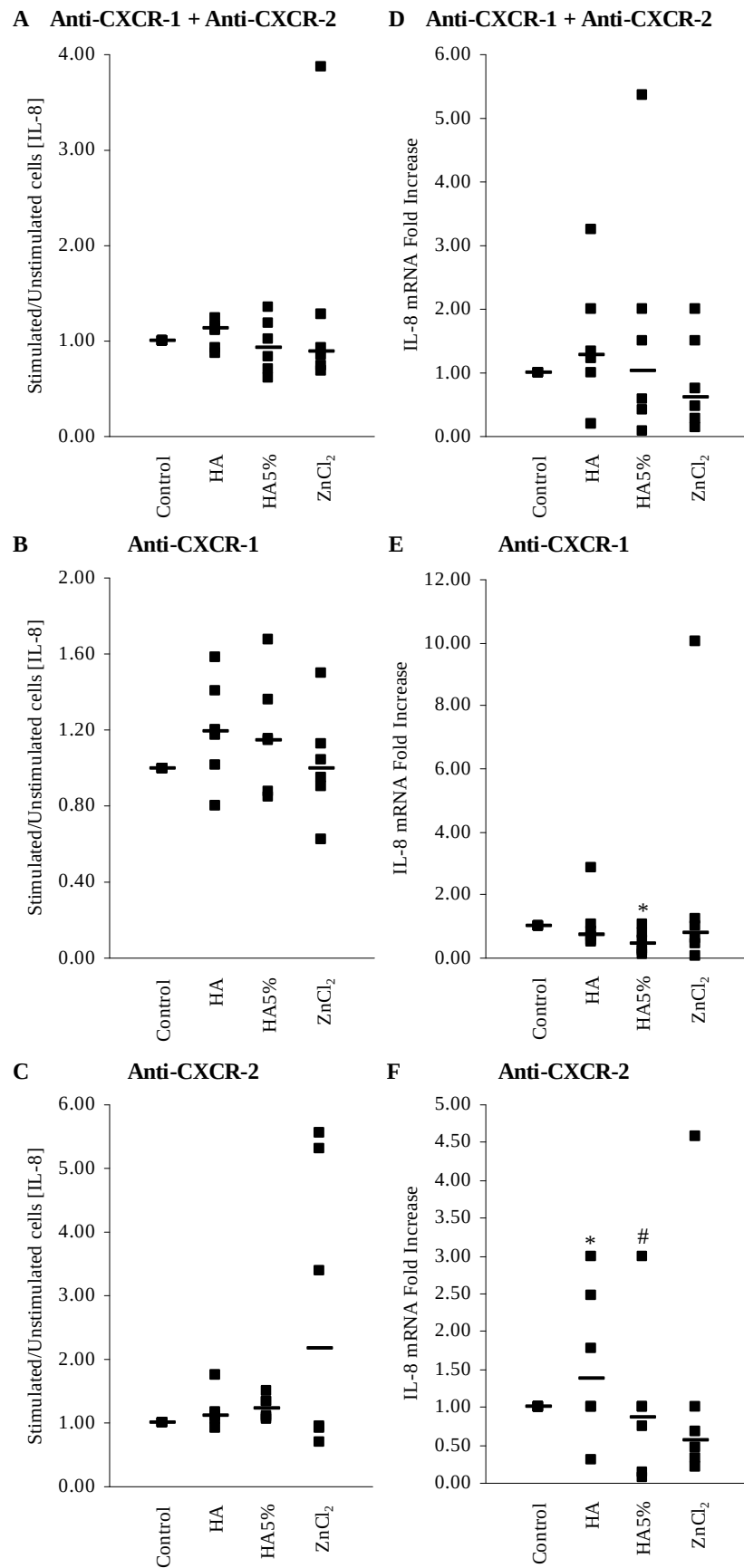


Figure 5. Effect of blocking CXCR1 and 2 on IL-8 secretion and mRNA expression by human PMNs. **A, B** and **C** show respectively effect data of the mix Anti-human-CXCR1 and Anti-Human-CXCR2 antibodies,

Anti-human-CXCR-1 and Anti-human-CXCR-2 on IL-8 concentration in PMN conditioned media. ELISA was performed on cell culture supernatants. Shown are IL-8 values of 6 donors (Stimulated over non-stimulated cells ratio). Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells. **D, E and F** show respectively effect data of the mix Anti-human-CXCR1 and Anti-Human-CXCR2 antibodies, Anti-human-CXCR-1 and Anti-human-CXCR-2 on IL-8 mRNA synthesis in stimulated and non-stimulated cells. RT-PCR data are shown as specific variation of IL-8 mRNA using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (18S was used as internal control). Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells, # means $p < 0.05$ when compared to HA condition.

Blocking of IL-8 receptors results in decreased MMP-9 gelatinolytic activity.

As shown in Figure 6, pre-incubation of cells with anti-human-CXCR-1 and/or anti-human-CXCR-2 antibodies did not lead to any significant variations of MMP-9 gelatinolytic activity by comparison to control independently of the treatment type (Fig. 6.A, B and C). Also, analyses of the RT-PCR results demonstrate no variations in MMP-9 mRNA expression. Of note, pre-incubation of cells with isotypes antibodies did not change the gelatinolytic activity of all treated cells.

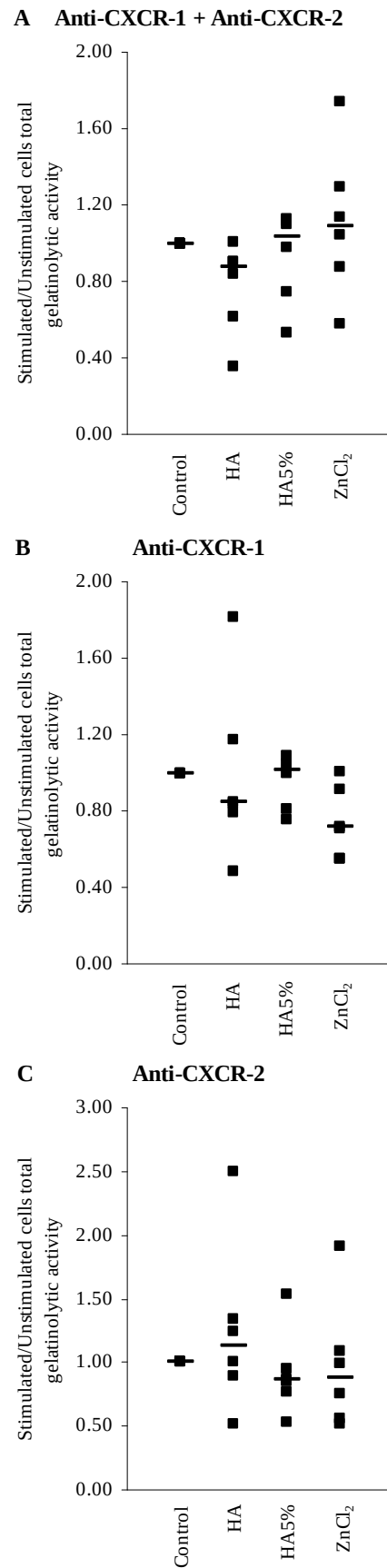


Figure 6. Effect of blocking IL-8 receptors on MMP-9 total gelatinolytic activity of human PMNs. **A, B and C** show respectively the effect of combined Anti-human-CXCR1 and Anti-Human-CXCR2 antibodies, Anti-

human-CXCR-1 and Anti-human-CXCR-2 on gelatinolytic activity of PMNs conditioned media. Shown are ratios of IOD values of stimulated over non-stimulated cells of 6 donors. Each black square corresponds to one donor value. Black bar represents median value. * means $p < 0.05$ when compared with non stimulated cells, # means $p < 0.05$ when compared to HA condition.

DISCUSSION

In this study, we provided compelling evidence for the first time that a 5% substitution of HA with zinc (HA5%) has an opposing effect on PMN responsiveness by comparison to HA alone. While HA stimulation of PMNs resulted in increased levels of IL-8, HA5% restored this response to basal level. In fact, these changes in protein levels are due to changes in mRNA levels of IL-8. A direct consequence of the decreased levels of IL-8 was the considerable reduction of migrating PMNs in response to this chemotactic factor. A series of studies have reported the ability of zinc to modulate the cell response to stimuli involving interactions of this ion with signal transduction molecules [28] and/or implication of cell receptors for instance toll-like receptor 4 [29]. To our knowledge, this is the first study that addresses the capacity of zinc to modulate the activation of human PMNs. The underlying mechanism of zinc-substituted HA-mediated activation of PMNs remains to be determined.

Analyses of zymography data found that HA5% decreased considerably MMP-9 gelatinolytic activity of PMNs, which was induced by HA alone. Of relevance, similar or more pronounced effect was observed with zinc alone. Interestingly, HA5% had no obvious impact on MMP-9 mRNA expression. Taken together, these data suggest that zinc-substituted HA influences MMP-9 activity rather than its mRNA expression. In support of this hypothesis, zinc ions have been reported to interact with PKC [28, 30] modulating thereby the secretion of MMP-9 stored in tertiary granules [31]. The possibility that HA5% inhibits MMP-9 activity extracellularly may not be ruled out.

Since it was documented that IL-8 mediates secretion of MMP-9 [27, 31] and in light of our findings, we sought to determine the relative contribution of IL-8 receptors CXCR-1 and 2 in such response. Our findings correlate with previous reports in that levels of CXCR1 are altered when cells are activated [32-34]. The unresponsiveness of CXCR2 was unexpected. With respect to treatment with zinc alone, both receptors appear to be sensitive to this ion as judged by their weak detection on cell surfaces. In our hands, CXCR-1 and CXCR-2 mRNA levels were not altered under our experimental conditions. We next postulated that the implication of IL-8 receptors is limited to signalling degranulation and release of MMP-9. To address this hypothesis, we carried out blocking experiments of IL-8 receptors.

Using anti-CXCR 1 and 2, individually or combined, we observed that HA-mediated increase of gelatinolytic activity was considerably diminished whereas HA5%-

associated gelatinolytic activity remained at its basal level suggesting the involvement of IL-8 receptors in biomaterial particles-mediated MMP-9 release. Importantly, blocking CXCR 1 and 2 did not affect the enzyme's mRNA expression. Our receptor blocking approach revealed also that IL-8 receptors contribute relatively to IL-8 secretion (autocrin stimulation) and point to CXCR-1 as the key player. In support of our findings, published studies reported that IL-8 receptor pathway leads to NFκB activation followed by IL-8 gene activation [35] [36].

CONCLUSIONS

In this work, we show for the first time the anti-inflammatory potential of zinc-substituted hydroxyapatite on human PMN-associated acute inflammation. Interaction of HA particles with PMNs leads to cell activation and signalling pathways resulting in IL-8 expression and secretion (Figure 7.A.). In one hand, increased IL-8 levels in the extracellular space (e.g., bone-implant interface) leads to an influx of cells amplifying thereby the inflammatory response. On the other hand, binding of IL-8 to induces an increased MMP-9 gelatinolytic activity contributing perhaps to matrix degradation. Substitution of 5% of HA with zinc (HA5%) has an opposing effect of HA alone in that the resulting product acts at different levels to diminish the inflammatory process (Figure 7.B.). It appears that IL-8 pathway plays an important role in biomaterial particles-induced PMN activation and amplification of inflammation as judged by receptor blocking experiments (figures 7.C and 7.D). Our studies propose zinc-substituted hydroxyapatite as a novel biomaterial for therapeutic interventions such as increasing the implant lifespan and/or limiting its aseptic loosening.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM, French “Agence Nationale pour la Recherche”, and Région CHAMPAGNE-ARDENNE.

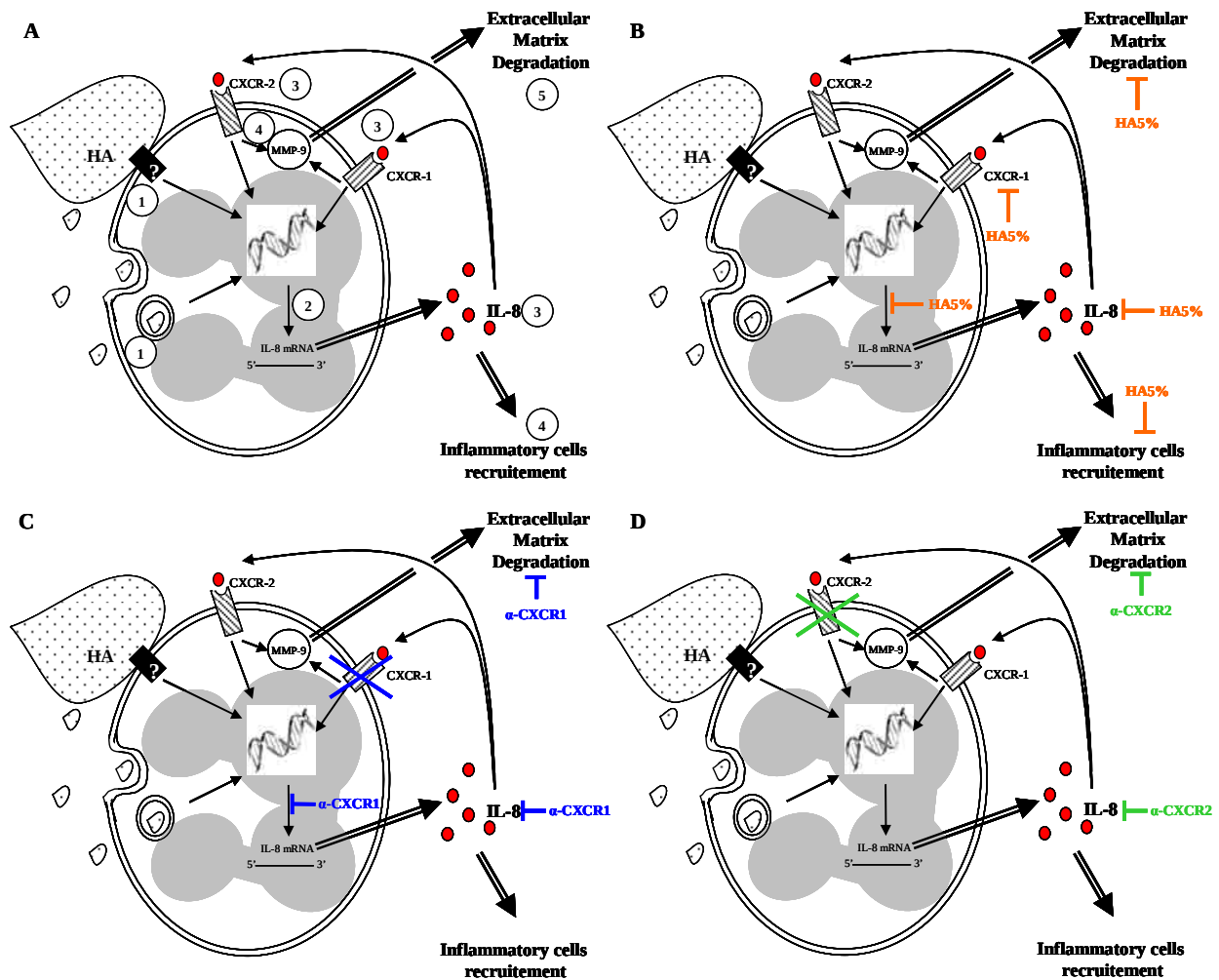


Figure 7. Proposed model for PMNs inflammatory response to biomaterial particles with or without zinc. **A.**

(-1-) Interaction of PMNs with HA particles  elicits PMN's response including increase IL-8 gene expression (-2-) and secretion (-3-) of chemotactic and pro-inflammatory IL-8  which have an autocrine (-3-) and paracrine effect. This lead to an increase of inflammatory cell recruitment (-4-) and to MMP-9 release which enhance ECM degradation (-5-). **B.** HA5% modulate PMNs response at several levels  : IL-8 mRNA gene transcription, secretion and chemotactic activity and CXCR1 down cell surface expression inducing a decreased MMP-9 activity. **C.** and **D.** Blocking of CXCR1  lead to decreased IL-8 mRNA transcription and production and MMP-9 activity, whereas blocking of CXCR2  leads to decreased IL-8 concentration and MMP-9 activity.

REFERENCES

- [1] Miyamoto RG, Kaplan KM, Levine BR, Egol KA, Zuckerman JD. Surgical management of hip fractures: an evidence-based review of the literature. I: femoral neck fractures. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008 Oct;16(10):596-607.
- [2] Raaymakers EL. Fractures of the femoral neck: a review and personal statement. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2006;73(1):45-59.
- [3] Macaulay W, Pagnotto MR, Iorio R, Mont MA, Saleh KJ. Displaced femoral neck fractures in the elderly: hemiarthroplasty versus total hip arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2006 May;14(5):287-93.
- [4] Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res.* 1998 Winter;43(4):428-32.
- [5] Abe T, Anan M, Kamida T, Fujiki M. Surgical technique for anterior skull base reconstruction using hydroxyapatite cement and titanium mesh. *Acta Neurochir (Wien).* 2009 May 15.
- [6] Voor MJ, Arts JJ, Klein SA, Walschot LH, Verdonchot N, Buma P. Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Nov 15;71(2):398-407.
- [7] Oonishi H, Ohashi H, Oonishi H Jr, Kim SC. THA with hydroxyapatite granules at cement-bone interface: 15- to 20-year results. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Feb;466(2):373-9.
- [8] Morita S, Furuya K, Ishihara K, Nakabayashi N. Performance of adhesive bone cement containing hydroxyapatite particles. *Biomaterials.* 1998 Sep;19(17):1601-6.
- [9] Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70(1):17-22.
- [10] Shetty AA, Slack R, Tindall A, James KD, Rand C. Results of a hydroxyapatite-coated (Furlong) total hip replacement: a 13- to 15-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Aug;87(8):1050-4.
- [11] Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Toni A. Cellular events in the mechanisms of prosthesis loosening. *Clin Mater.* 1991;7(1):51-81.
- [12] Bloebaum RD, Zou L, Bachus KN, Shea KG, Hofmann AA, Dunn HK. Analysis of particles in acetabular components from patients with osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 1997;338:109–18.

-
- [13] Benhayoune H, Jallot E, Laquerriere P, Balossier G, Bonhomme P, Frayssinet P. Integration of dense HA rods into cortical bone. *Biomaterials*. 2000 Feb;21(3):235-42.
 - [14] Prystowsky JB, Huprikar JS, Rademaker AW, Rege RV. Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro. *Dig Dis Sci* 1995;40(2):412-8.
 - [15] Cheung HS, Devine TR, Hubbard W. Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5(3):145-51.
 - [16] Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2009;67(2):182-8.
 - [17] Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984;5(1):5-10.
 - [18] Velard F, Laurent-Maquin D, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, et al. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomater*. 2009; 5 (5): 1708-15.
 - [19] Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998 Aug;68(2 Suppl):447S-463S.
 - [20] Laggner H, Phillipp K, Goldenberg H. Free zinc inhibits transport of vitamin C in differentiated HL-60 cells during respiratory burst. *Free Radic Biol Med*. 2006 Feb 1;40(3):436-43.
 - [21] Von Bülow V, Dubben S, Engelhardt G, Hebel S, Plümäkers B, Heine H, et al. Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):4180-6.
 - [22] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec JM, Guenounou M, Laurent-Maquin D, et al. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3195-200.
 - [23] Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307(1):97-101.
 - [24] Juhász A, Sziklai I, Rákossy Z, Ecsedi S, Adány R, Balázs M. Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas. *Otol Neurotol*. 2009 Jun;30(4):559-65.

-
- [25] Jallot E, Nedelec JM, Grimault AS, Chassot E, Grandjean-Laquerriere, Laquerriere P, et al. STEM and EDXS characterization of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;42(3-4):205-10.
- [26] Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res* 1994;28(1):81-90.
- [27] Chakrabarti S, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005;78(1):279-88.
- [28] Haase H, Rink L. Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions. *Biometals*. 2007 Jun;20(3-4):579-85.
- [29] Grandjean-Laquerrière A, Tabary O, Jacquot J, Richard D, Frayssinet P, Guenounou M, et al. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2007;28(3):400-4.
- [30] Murgia C, Lang CJ, Truong-Tran AQ, Grosser D, Jayaram L, Ruffin RE, et al. Zinc and its specific transporters as potential targets in airway disease. *Curr Drug Targets*. 2006 May;7(5):607-627.
- [31] Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J.Leukoc.Biol.* 2006; 79 (1): 214-22.
- [32] Nasser MW, Raghuwanshi SK, Malloy KM, Gangavarapu P, Shim JY, Rajarathnam K, et al. CXCR1 and CXCR2 activation and regulation. Role of aspartate 199 of the second extracellular loop of CXCR2 in CXCL8-mediated rapid receptor internalization. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):6906-15.
- [33] Tikhonov I, Doroshenko T, Chaly Y, Smolnikova V, Pauza CD, Voitenok N. Down-regulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils upon activation of whole blood by *S. aureus* is mediated by TNF-alpha. *Clin Exp Immunol*. 2001 Sep;125(3):414-22.
- [34] Feniger-Barish R, Ran M, Zaslaver A, Ben-Baruch A. Differential modes of regulation of cxc chemokine-induced internalization and recycling of human CXCR1 and CXCR2. *Cytokine*. 1999 Dec;11(12):996-1009.
- [35] Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6735-41.

[36] Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol. 1994 Nov;56(5):554-8.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- La substitution en zinc de l'HA permet de diminuer la production d'ARN messagers de l'IL-8 et leur traduction/sécrétion par les PMNs humains.
- La substitution en zinc de l'HA permet de diminuer le chimiotactisme du microenvironnement cellulaire des PMNs.
- La substitution en zinc de l'HA permet de diminuer l'activité gélatinolytique médiée par la métalloprotéase matricielle 9 dans les surnageants de culture des PMNs, et ce, en l'absence d'une modulation des ARN messagers de la MMP-9. Par ailleurs, le chlorure de zinc seul suffit à diminuer l'activité gélatinolytique des surnageants de culture.
- La stimulation des PMNs par de l'HA, substituée ou non par du zinc, ainsi que ZnCl_2 seul, diminue la présence du récepteur CXCR-1 à la surface des cellules en dépit d'une variation de ses ARNm. La présence du récepteur CXCR-2 à la surface des PMNs n'est régulée négativement qu'en présence de chlorure de zinc seul, bien qu'une fois encore, ses ARNm ne varient pas.
- Le blocage des récepteurs CXCR-1 et CXCR-2 a permis la mise en évidence de la voie de l'IL-8 comme étant déterminante dans la réponse aux biomatériaux. En effet le blocage de ses récepteurs CXCR-1 et CXCR-2 induit une abolition des variations de concentrations d'IL-8 et de l'activité gélatinolytique.

Nos résultats montrent pour la première fois qu'il est possible de moduler la réponse inflammatoire des PMNs aux particules de biomatériaux en utilisant la substitution ionique en zinc, et que cette réponse inflammatoire est majoritairement médiée par le biais de l'IL-8 sécrétée par les PMNs eux-mêmes.

DISCUSSION GENERALE

Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement. L'équilibre entre synthèse et dégradation osseuse est le résultat de la communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes (Erlebacher *et al*, 1995; Reddi, 1997). A l'état physiologique, les ostéoblastes sont capables d'induire la maturation des ostéoclastes, permettant ainsi une lyse matricielle dirigée et contrôlée (Yoshida *et al*, 1990). Cependant, dans le cadre d'un processus inflammatoire, les médiateurs de l'inflammation tels que IL-1, TNF α , IL-6 et RANK, synthétisés par les cellules immunitaires, perturbent le système classique de régulation en favorisant la voie de l'ostéoclasie (Georges *et al*, 2009). De plus, les cellules de l'inflammation telles que les PMNs et les monocytes/macrophages, peuvent non seulement activer les ostéoclastes, mais vont également pouvoir, par le biais de leurs propres protéases et systèmes oxydatifs, agir sur la résorption de la matrice osseuse (Voloshin *et al*, 2005). Ce dérèglement de la balance entre synthèse et dégradation osseuse est à la base du problème du descellement aseptique des prothèses (Khosla, 2001; Abu-Amer, 2005). En effet, la réaction inflammatoire due aux débris de biomatériaux issus de la prothèse ou de son revêtement a été identifiée comme cause majeure des échecs de prothèses (Hallab *et al*, 2009).

Les acteurs majoritairement décrits comme responsables de cette pathologie sont les monocytes macrophages (Neale *et al*, 1999; Purdue *et al*, 2007). Ces cellules sont retrouvées en grand nombre sur les sites d'échec d'implants. Leur présence est expliquée par le fait que le processus inflammatoire menant au descellement prothétique est un phénomène étendu dans le temps et, de fait, dû à une réaction inflammatoire chronique.

Cependant, depuis longtemps, les PMNs ont également été décrits comme étant les premières cellules à migrer sur le site périprothétique (Anderson, 1988), bien que leur implication dans les processus de dégradation osseuse soit restée très peu étudiée. Ceci est la raison pour laquelle nous avons proposé d'étudier la réponse des polynucléaires neutrophiles humains aux particules d'hydroxyapatite.

Parmi les quelques données disponibles, il a été montré que le contact entre les PMNs et les particules d'HA induisait une explosion oxydative (Nagase *et al*, 1993 et

1994) et potentiellement une sécrétion accrue de $\text{TNF}\alpha$ (Liao *et al*, 2006). Aucune donnée en revanche n'est disponible quant au panel de médiateurs susceptibles d'être sécrétés en réponse au contact et/ou à la phagocytose de particules de biomatériaux. Nous avons donc effectué un criblage de quarante cytokines et chimiokines potentiellement produites par les PMNs en réponse à l'HA. Nous avons pu montrer qu'un nombre limité de médiateurs (neuf) étaient impliqués dans cette réponse et que quatre d'entre eux jouaient un rôle actif dans l'inflammation médiée par les PMNs dans le cadre du descellement prothétique. Il s'agit de l'IL-1 α , l'IL-8 et les MIP-1 α et MIP-1 β .

L'IL-1 α , cytokine pro-inflammatoire, est considérée comme initiatrice de la réponse inflammatoire aiguë et activatrice de nombreuses cellules parmi lesquelles les PMNs, les monocytes, les macrophages (Dinarello, 1996) et les ostéoclastes (Kyung *et al*, 2008 ; Kim *et al*, 2009). Sur le plan pathologique, l'IL-1 α est retrouvée dans les cartilages de patients présentant des signes d'ostéoarthrite (Towle *et al*, 1997) ou d'arthrite juvénile (Cavaillon, 1996), mais aussi dans la pathologie de la goutte. Dans ce cas précis, les PMNs ont été montrés comme de puissants inducteurs inflammatoires *via* la sécrétion d'IL-1 (Roberge *et al*, 1994). Il a de plus été démontré que les neutrophiles phagocytent les cristaux d'urate monosodique de la goutte, tout comme ceux de pyrophosphate de calcium dans le cas de la chondrocalcinose (Seegmiller *et al*, 1962; Agudelo *et al*, 1973). L'interaction entre les PMNs et les cristaux semble par ailleurs essentielle à la continuité de la réponse inflammatoire dans ces pathologies (Gallin *et al*, 1988). Parmi les rôles pro-inflammatoires de l'IL-1 α , l'induction de la dégranulation des PMNs et la libération des médiateurs de types cytokines, chimiokines et protéases sont sans doute celles qui ont la plus grande importance dans notre système (Dinarello, 1996).

En effet, parmi les médiateurs ainsi sécrétés dans le milieu extracellulaire se trouve l'IL-8. Cette chimiokine est le médiateur le plus abondamment sécrété par les PMNs, à la fois dans notre système expérimental et physiologiquement (Cassatela, 1995). De façon intéressante, l'IL-8 est à la fois chimioattractant et activateur pour les PMNs, notamment en potentialisant les capacités phagocytaires et sécrétoires des cellules, en parallèle de l'action de l'IL-1 α (Baggiolini *et al*, 1992). A proximité du lit vasculaire, l'IL-8 va, en plus de jouer son rôle de chimioattractant, favoriser l'adhésion des PMNs aux cellules endothéliales (Leirisalo-Repo, 1994). Ce processus, couplé à l'établissement du gradient

de concentration de la chimiokine, induit une augmentation de l'influx cellulaire sur le site inflammatoire. La concentration en IL-8 a été démontrée comme étant augmentée dans les cas de descellements aseptiques au niveau sérique, et au niveau synovial autour des implants descellés (Sabokbar *et al*, 1995). Il semble ainsi que l'IL-8 puisse être considérée comme un marqueur de l'avancée de l'ostéolyse dans les pathologies mettant en jeu une résorption osseuse accrue (Tanaka *et al*, 2005; Hundric-Haspl *et al*, 2006).

En plus de l'IL-8, nous avons démontré la sécrétion d'autres facteurs chimioattractants lors de la mise en contact des PMNs avec les particules d'HA, et notamment des MIP-1 α et MIP-1 β . Ces deux facteurs sont principalement chimioattractants pour les monocytes/macrophages (Baggiolini, 2001). Ils sont également retrouvés *in-vivo* dans les pseudomembranes présentes autour des implants descellés (Greenfield *et al*, 2002). Considérant le fait que les ostéoclastes sont des cellules dérivant de la lignée macrophagique (Suda *et al*, 1992), il devient évident que la régulation du profil chimiokinique tissulaire aux abords des implants est un facteur clé de la résorption osseuse observée dans les cas de descellements aseptiques.

Cependant, les chimiokines sont nécessaires mais pas forcément suffisantes à la migration des cellules inflammatoires des vaisseaux sanguins vers les tissus. En effet les PMNs, tout comme les monocytes et autres cellules du système immunitaire, doivent franchir la lame basale de l'endothélium avant de pouvoir progresser dans le tissu sous-jacent (Wagner *et al*, 2000). Ce processus est notamment facilité par la production d'enzymes protéolytiques capables de dégrader les protéines matricielles telles que le collagène IV des lames basales (Reichel *et al*, 2008) ou encore le collagène I de la matrice osseuse. Nous avons montré que l'activation des PMNs, par les particules d'HA, induisait une augmentation de l'activité gélatinolytique du microenvironnement tissulaire, due à la MMP-9. Cette gélatinase compte également les collagènes I et IV parmi ses substrats (Chakraborti *et al*, 2003). Un certain nombre de substrats non matriciels peuvent être également clivés par la MMP-9 et, notamment l'IL-8. Le clivage de l'IL-8 par la MMP-9 potentialise son effet chimioattractant (Chakrabarti *et al*, 2005). Il est de plus intéressant de souligner que la sécrétion de la MMP-9 par les PMNs est liée à la fixation de l'IL-8 sur ses récepteurs (Chakrabarti *et al*, 2005).

L'ensemble de ces données concourt à éclaircir les mécanismes de la mise en place de l'inflammation liée aux biomatériaux et dont les PMNs semblent être les acteurs initiaux.

En résumé, nous avons démontré que le contact entre les PMNs et les particules de biomatériaux, mimétiques des débris d'usure des revêtements prothétiques, induisait une activation des neutrophiles, se soldant par une dégranulation des médiateurs pro-inflammatoires que sont l'IL-1 α , l'IL-8, les MIP-1 α et MIP-1 β , et la MMP-9. L'IL-1 α maintient le caractère inflammatoire de la réaction avec le concours de l'IL-8, ce dernier participant également avec les MIP-1 α et MIP-1 β , par le biais de la formation de gradients de concentration, au recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sur site à partir du sang circulant, et notamment des monocytes/macrophages. Cette action principalement due à l'action des MIP-1 α et MIP-1 β , permet d'émettre l'hypothèse que les PMNs participent à la mise en place de la réaction inflammatoire chronique classiquement décrite comme impliquée dans le descellement prothétique. Ce processus est d'autant facilité que les vaisseaux sanguins sont proches du site d'activation des PMNs, puisque l'IL-1 α va permettre d'activer les cellules endothéliales et augmenter ainsi la perméabilité vasculaire, alors que la MMP-9 va à la fois dégrader la matrice extracellulaire, y compris la lame basale, pour faciliter le recrutement cellulaire, mais également intervenir sur l'action de l'IL-8 en potentialisant son effet biologique. Ce système s'autoalimente et conduit irrémédiablement à un emballement de la réponse de l'hôte étant entendu que l'hydroxyapatite, minérale, n'est que peu altérée par sa phagocytose par les PMNs.

Le contrôle de la réponse inflammatoire précoce semble donc être un élément clé de l'augmentation de la durée de vie des implants. De précédentes études effectuées au sein du laboratoire ont démontré que la réponse des monocytes/macrophages aux biomatériaux pouvait être modulée en utilisant une hydroxyapatite dont des ions calcium sont substitués à 5% par des ions zinc (HA5%) (Grandjean-Laquerrière *et al*, 2006). Des études en ICP-AES (non publiées), menées sur les surnageants de dissolution de nos biomatériaux, ont montré que la quantité de zinc sous forme ionique relarguée pour les quantités de particules que nous utilisons était de l'ordre de 20 μ M. Un effet immuno-régulateur du zinc sur la génération de radicaux libres oxygénés a déjà été démontré pour

des concentrations similaires en zinc sur une lignée cellulaire de type PMN (Laggner *et al*, 2006).

Sur la base de ces résultats et de ceux récemment publiés (Velard *et al*, 2009) nous avons entrepris d'étudier le potentiel immunomodulateur de cette HA5% élaborée par sol-gel (Jallot *et al*, 2005), sur la réponse des PMNs aux particules d'HA. Nous avons focalisé notre travail sur l'IL-8 et la MMP-9 car ces médiateurs étaient ceux présentant les plus fortes amplitudes de variation dans notre précédente étude.

Nous avons mis en évidence une diminution de la production et de l'action chimioattractante de l'IL-8 lors de l'utilisation de l'HA5%. IRAK-1 est une protéine impliquée dans la transduction du signal des voies de l'IL-1 (Burns *et al*, 2000) et de TLR-4 (Turvey *et al*, 2006). Ces deux voies, à profil pro-inflammatoire, peuvent être inhibées par le zinc par le biais de son action sur IRAK-1 dans les monocytes/macrophages (Haase *et al*, 2007). Or nous avons démontré dans notre première étude que l'IL-1 α semblait intervenir dans les processus inflammatoires liés aux particules de biomatériaux, et en particulier un mécanisme possible était que l'IL-1 α favorise la sécrétion de l'IL-8 par les PMNs. Par ailleurs, des études menées par notre laboratoire sur des souris invalidées pour TLR-4 ont montré une diminution de la réponse des monocytes/macrophages aux particules d'HA (Grandjean-Laquerrière *et al*, 2007). L'ensemble de ces données concourt à considérer TLR-4 comme un récepteur potentiel à l'HA et IRAK-1 comme une cible intracellulaire privilégiée pour le zinc.

Nos résultats ont également démontré une diminution de l'activité gélatinolytique des surnageants de culture des PMNs lors de l'utilisation de l'HA5% et du chlorure de zinc seul. Cependant ces variations d'activité enzymatique ne sont pas accompagnées de variation de la transcription des gènes de la MMP-9. Il semble donc que le niveau de régulation de l'activité MMP-9 par le zinc soit principalement enzymatique. Cependant, il a été démontré que l'IL-8, par son interaction avec ses récepteurs, provoquait la libération de MMP-9 par les PMNs (Chakrabarti *et al*, 2005) et que ceci se faisait via l'activation de la PKC. Or la PKC est également une enzyme intracellulaire dont le zinc régule négativement l'activité (Murgia *et al*, 2006). Ces données, considérées dans leur globalité, permettent de comprendre comment, au travers de la régulation *i*) du signal IL-8 par la diminution de sa concentration extracellulaire, *ii*) de l'activité de la PKC et *iii*) de l'activité enzymatique de la MMP-9, le zinc permet de diminuer l'activité gélatinolytique

globale des surnageants de culture des PMNs, y compris comparativement aux conditions basales de culture.

Considérant ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-8 était un facteur activateur majoritaire de l'inflammation aiguë induite par les particules de biomatériaux et que son action était principalement autocrine et paracrine via ses récepteurs CXCR-1 et CXCR-2. Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation de la présence des récepteurs à la surface des PMNs, et les résultats obtenus nous ont permis de mettre en exergue une régulation négative de la présence de CXCR-1 consécutivement au contact des PMNs avec les particules de biomatériaux. Ces résultats sont concordants avec des données de la littérature montrant une internalisation des récepteurs de l'IL-8 consécutivement à un stimulus inflammatoire (Feniger-Barish *et al*, 1999; Tikhonov *et al*, 2001; Nasser *et al*, 2007). Cependant et de façon surprenante, les particules d'HA, qu'elles soient ou non substituées en zinc, ne provoquent pas de diminution de la présence de CXCR-2 à la surface des PMNs. Par ailleurs nous avons pu démontrer que le chlorure de zinc seul induisait une forte diminution de la présence des deux récepteurs à l'IL-8. Enfin nos résultats ont démontré que ces modulations d'expression des récepteurs à la surface cellulaire n'étaient pas liées à une régulation au niveau transcriptionnel. Ces données semblent concourir, avec celles concernant l'activité de la MMP-9 et la sécrétion d'IL-8, à imposer ce dernier médiateur comme central dans notre système d'étude puisque tous ses niveaux d'actions semblent impliqués dans la réponse aux particules de biomatériaux.

En vue de valider notre hypothèse, nous avons étudié la réponse des PMNs aux particules d'HA lorsque les récepteurs CXCR-1 et CXCR-2 ont été préalablement bloqués par des anticorps, individuellement ou simultanément. Nos résultats ont corroboré notre hypothèse concernant l'implication de l'interaction entre l'IL-8 et ses récepteurs. En effet, nous avons démontré que le blocage des récepteurs, ensemble, ou séparément, permettait de garder un niveau basal d'activité gélatinolytique lors d'une stimulation des cellules par les particules d'HA ou HA5%. Par ailleurs, les ARNm de l'IL-8 ne varient pas quelle que soit la stimulation des PMNs éliminant de fait les récepteurs à l'IL-8 comme promoteurs potentiels d'un signal régulant la transcription génique de la MMP-9.

Cette étude nous a finalement permis de montrer que le blocage des récepteurs de l'IL-8 induisait un arrêt de l'accroissement de la concentration en l'IL-8 dans le milieu extracellulaire. L'étude de la régulation des gènes a permis de mettre en évidence un effet prédominant de CXCR-1 dans notre système. En effet, nous avons montré que le blocage de CXCR-1 ou des récepteurs simultanément permettait d'annihiler la réponse des PMNs aux particules d'HA, mais ceci n'est pas vrai lors du blocage de CXCR-2 seul. Dans ce cas, le profil de réponse est celui observé jusque-là, à savoir une augmentation de la présence des ARNm de l'IL-8 lorsque les cellules sont au contact d'HA et une diminution jusqu'à un retour au niveau basal lorsque les cellules sont au contact des particules d'HA5%. Cette implication des CXCR-1 et 2 dans la régulation de l'activation des PMNs est soutenue par différentes publications montrant que ces récepteurs transduisent un signal aboutissant à l'activation du facteur de transcription κ B (NF κ B) (Waugh *et al*, 2008) et que NF κ B est un facteur nécessaire à la transcription du gène de l'IL-8 dans les PMNs (Mukaida *et al*, 1994).

L'ensemble de nos résultats nous laisse envisager un usage de l'HA5% en tant que revêtement prothétique avec, pour objectif, d'allonger la durée de vie des implants et éviter au patient de subir une nouvelle intervention dans les cas de descellements aseptiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'étudier l'activation des polynucléaires neutrophiles humains en réponse aux particules d'hydroxyapatite et sa modulation par le zinc. Notre étude a mis en évidence un mécanisme inflammatoire lié aux biomatériaux dont les PMNs sont la « pierre angulaire » et nous avons également pu démontrer qu'il était possible, *in-vitro*, de moduler ce système inflammatoire.

Cependant, il reste à montrer précisément quel est le niveau d'action de la substitution en zinc dans notre modèle cellulaire. Différentes pistes sont à explorer, notamment la voie de signalisation du TLR-4 qui semble être impliqué dans la reconnaissance des particules d'HA par les cellules immunitaires (Grandjean-Laquerriere *et al*, 2007). Une autre voie intéressante est celle des récepteurs à l'IL-8 dont l'engagement dans la réponse des PMNs a été clairement démontré dans ces travaux de thèse. Enfin la voie de l'IL-1 pourrait également être impliquée, comme le suggère la littérature, démontrant que le zinc régule négativement l'action d'IRAK-1 (Haase *et al*, 2007) impliquée à la fois dans la voie de l'IL-1 et du TLR-4.

Plus précisément, nous proposons d'étudier la voie des MAPKs (Erk, p38 et Jnk) puisque son activation aboutit au relargage de cytokines par les PMNs (Cloutier *et al*, 2006) et qu'elle intervient à la fois dans les voies des TLRs (Nick *et al*, 1999) de l'IL-1 (Dinarello, 1996) et de l'IL-8 (Waugh *et al*, 2008). Le blocage différentiel de ces acteurs de la transduction par des inhibiteurs chimiques nous permettra d'identifier plus spécifiquement le niveau d'action du zinc sur la réponse inflammatoire. De plus, les ions zinc agissant sur l'activation de NFκB et AP-1 (Herbein *et al*, 2006), nous étudierons leurs effets sur l'activation de ces facteurs de transcription.

En vue de poursuivre nos études de modulation des processus inflammatoires, nous envisageons d'étudier l'effet d'HA substituées par d'autres cations divalents sur les cellules inflammatoires. Notamment, le strontium nous semble particulièrement intéressant grâce à sa capacité à favoriser la repousse osseuse. Des études sont d'ores et déjà en cours au sein du laboratoire concernant les effets de tels biomatériaux sur *i)* la production de matrice osseuse par les ostéoblastes *ii)* le profil protéasique des

monocytes/macrophages. A notre connaissance, aucune donnée concernant les PMNs n'est à ce jour disponible.

Nous avons démontré que l'IL-1 α , facteur pro-inflammatoire pléiotrope, était plus abondamment sécrétée lors d'un contact entre PMNs et particules d'HA. La littérature décrivant l'IL-1 comme un facteur permettant la différenciation des ostéoclastes (Kyung *et al*, 2008 ; Kim *et al*, 2009), nous envisageons de mettre au point un système *in-vitro* de co-culture d'ostéoblastes et monocytes/macrophages. En présence et absence de PMNs stimulés ou non par des particules d'HA, l'étude morphologique et phénotypique des cultures nous permettra de déterminer l'implication des PMNs dans les phénomènes d'induction de la résorption osseuse par les cellules professionnelles du remodelage tissulaire osseux.

Les ostéoblastes nécessaires à ces études nous sont gracieusement fournis par le service de Chirurgie Orthopédique du Pr. DEHOUX de l'hôpital Maison Blanche de Reims. Ces cellules sont obtenues à partir d'explants réalisés à l'occasion de la pose de prothèses totales de hanche. Dans le cadre de l'établissement des co-cultures, il s'agira de récupérer des leucocytes à partir du sang circulant des mêmes donneurs, afin d'éviter toute réaction inflammatoire croisée due à la reconnaissance du non-soi. De plus, à cette occasion, nous envisageons d'effectuer un suivi longitudinal des patients avec des prélèvements préopératoires, une semaine postopératoire et un an postopératoire afin d'étudier la susceptibilité des cellules inflammatoires à être « pré-stimulées » par la pose d'un implant chirurgical. Sur du long terme, nous profiterons des révisions ou échecs de prothèses pour étudier le comportement des cellules contenues dans les liquides synoviaux périprothétiques.

Nos travaux ont démontré l'influence des particules de biomatériaux sur l'activation des PMNs par contact et/ou phagocytose. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas de données accessibles concernant la réponse de ces cellules sur une surface d'HA *in-vitro*. Nous répondrons à cette question en utilisant des plots de titane revêtus d'HA afin de nous rapprocher autant que possible des conditions réelles de la mise en place des phénomènes inflammatoires menant au descellement aseptique.

Afin d'évaluer réellement le potentiel immunomodulateur de l'HA substituée en zinc en tant que matériau de recouvrement prothétique, nous envisageons de mettre en place des modèles d'études *in-vivo*. Notamment, le modèle ovin semble être le plus indiqué pour envisager la pose de prothèses revêtues de notre matériau et effectuer un suivi histologique de la zone péri-prothétique (Doria *et al*, 2003; Coathup *et al*, 2005).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABE T, ANAN M, KAMIDA T, FUJIKI M.

Surgical technique for anterior skull base reconstruction using hydroxyapatite cement and titanium mesh.

Acta Neurochir.(Wien). 2009 May 15 [Epub ahead of print].

ABU-AMER Y.

Advances in osteoclast differentiation and function.

Curr.Drug Targets Immune Endocr.Metabol.Disord. 2005; 5: 347-55.

ABU-AMER Y, DARWECH I, CLOHISY JC.

Aseptic loosening of total joint replacement: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies.

Arthritis Res.Ther. 2007; 9 (Suppl 1): S6

AGUDELO C, SCHUMACHER HR.

The synovitis of acute gouty arthritis: a light and electron microscopy study.

Hum.Pathol. 1973; 4: 265.

AKAO M, AOKI H, KATO K.

Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications .

J.Mater.Sci. 1981; 16 (3): 809-12.

ALBERTSSON P, KIM MH, JONGES LE, KITSON RP, KUPPEN PJ, JOHANSSON BR, et al.

Matrix metalloproteinases of human NK cells.

In Vivo 2000; 14: 269–276.

ALI S, PALMER AC, BANERJEE B, FRITCHLEY SJ, KIRBY JA.

Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans.

J.Biol.Chem. 2000; 275 (16): 11721-7.

ALLAN JA, DOCHERTY AJP, BARKER PJ, HUSKISSON NS, REYNOLDS JJ, MURPHY G.

Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components.

Biochem.J. 1995; 309 (Pt 1): 299–306.

ANDERSON JM, MILLER KM.

Biomaterial biocompatibility and the macrophage.

Biomaterials 1984; 5 (1): 5-10.

ANDERSON JM.

Inflammatory response to implants.

ASAIO Trans. 1988; 34 (2): 101-7.

ARSLAN P, DI VIRGILIO F, BELTRAME M, TSIEN RY, POZZAN T.

Cytosolic Ca²⁺ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas.

J.Biol.Chem. 1985 ; 260: 2719–2727.

ATKINSON JJ, SENIOR RM.

Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling.

Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol. 2003; 28 (1): 12-24.

- ATTA-UR-RAHMAN, HARVEY K, SIDDIQUI RA.
Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator.
Curr.Pharm.Des. 1999; 5 (4): 241-53.
- ATZENI F, SCHENA M, ONGARI AM, CARRABBA M, BONARA P, MINONZIO F, et al.
Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha.
Cell Immunol. 2002; 220 (1): 20-9.
- AURON PE, WEBB AC, ROSENWASSER LJ, MUCCI SF, RICH A, WOLFF SM, et al.
Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1984; 81(24): 7907-11.
- BAGGIOLINI M, WALZ A, KUNKEL SL.
Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.
J.Clin.Invest. 1989; 84 (4): 1045-9.
- BAGGIOLINI M, CLARCK-LEWIS I.
Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.
FEBS Lett. 1992; 307 (1): 97-101.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B.
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines.
Adv.Immunol. 1994; 55: 97-179.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B.
Human chemokines: an update.
Annu.Rev.Immunol. 1997; 15: 675-705.
- BAGGIOLINI M.
Chemokines in pathology and medicine.
J.Intern.Med. 2001; 250 (2): 91-104.
- BALDWIN ET, WEBER IT, ST CHARLES R, XUAN JC, APPELLA E, YAMADA M, et al.
Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1991; 88 (2): 502-6.
- BANK U, ANSORGE S.
More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control.
J.Leukoc.Biol. 2001; 69 (2): 197-206.
- BAO B, PRASAD AS, BECK FW, GODMERE M.
Zinc modulates mRNA levels of cytokines.
Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab. 2003; 285 (5): 1095-102.
- BARNES S, SALEMI C, FITHIAN D, AKIYAMA L, BARRON D, ECK E, HOARE K.
An enhanced benchmark for prosthetic joint replacement infection rates.
Am.J.Infect.Control 2006; 34 (10): 669-72.
- BARNES CL, BERRY DJ, SLEDGE CB.
Dislocation after bipolar hemiarthroplasty of the hip.
J.Arthroplasty. 1995; 10 (5): 667-9.

- BARTHOLOME EJ, VAN AELST I, KOYEN E, KISS R, WILLEMS F, GOLDMAN M, et al.
Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta.
J.Interferon.Cytokine.Res. 2001; 21: 495–501.
- BARRACK RL.
Neurovascular injury: avoiding catastrophe.
J Arthroplasty. 2004; 19 (4 Suppl 1): 104-7.
- BAZZONI F, CASSATELLA MA, ROSSI F, CESKA M, DEWALD B, BAGGIOLINI M.
Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8.
J.Exp.Med. 1991; 173 (3): 771-4.
- BELAAOUAJ A, MCCARTHY R, BAUMANN M, GAO Z, LEY TJ, ABRAHAM SN, et al.
Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis.
Nat.Med. 1998; 4 (5): 615-8.
- BELAAOUAJ A, KIM KS, SHAPIRO SD.
Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase.
Science 2000; 289 (5482): 1185-8.
- BENHAYOUNE H, JALLOT E, LAQUERRIERE P, BALOSSIER G, BONHOMME P, FRAYSSINET P.
Integration of dense HA rods into cortical bone.
Biomaterials 2000; 21 (3): 235-42.
- BENHAYOUNE H, LAQUERRIERE P, JALLOT E, PERCHET A, KILIAN L, BALOSSIER G, et al.
Micrometer level structural and chemical evaluation of electrodeposited calcium phosphate coatings on TA6V substrate by STEM-EDXS.
J.Mater.Sci.Mater.Med. 2002; 13 (11): 1057-63.
- BENOIST C, MATHIS D.
Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?
Nat.Immunol. 2001; 2 (9): 797-801.
- BERKMAN N, JOHN M, ROESEMS G, JOSE PJ, BARNES PJ, CHUNG KF.
Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages.
J.Immunol. 1995; 155: 4412–4418.
- BERKMAN N, JOSE PJ, WILLIAMS TJ, SCHALL TJ, BARNES PJ, CHUNG KF.
Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages.
Am.J.Physiol. 1995; 269: L443–L452.
- BERREBI W.
Diagnostics et thérapeutique : guide pratique du symptôme à la prescription . 3e éd.
Paris : Estem; 2003
- BERTON G, LOWELL CA.
Integrin signalling in neutrophils and macrophages.
Cell Signal. 1999; 11 (9): 621-35.

BEYERSMANN D, HAASE H.

Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 2001; 14: 331–341.

BEZZI G, CELOTTI G, LANDI E, LA TORRETTA TMG, SOPYAN I, TAMPIERI A.

A novel sol–gel technique for hydroxyapatite preparation. *Mater.Chem.Phys.* 2003; 78 (3): 816-24.

BIANT LC, BRUCE WJ, VAN DER WALL H, WALSH WR.

Infection or Allergy in the Painful Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty? *J.Arthroplasty* 2009 Feb 23 [Epub ahead of print].

BLOEBAUM RD, ZOU L, BACHUS KN, SHEA KG, HOFMANN AA, DUNN HK.

Analysis of particles in acetabular components from patients with osteolysis. *Clin.Orthop.Relat.Res.* 1997; 338: 109–18.

BLOW DM, BIRKTOFT JJ, HARTLEY BS.

Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 1969; 221: 337–340.

BLUMAN EM, BARTYNSKI KJ, AVALOS BR, CALIGIURI MA.

Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 α in response to monocyte-derived cytokines. *J.Clin.Invest.* 1996; 97: 2722–2727.

BOBYN JD, PILLIAR RM, CAMERON HU, WEATHERLY GC.

The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin.Orthop.Relat.Res.* 1980; (150): 263-70.

BODE W.

A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure* 1995; 3: 527–530.

BORREGAARD N, COWLAND JB.

Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89 (10): 3503-21.

BOYCE T, EDWARDS J, SCARBOROUGH N.

Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop.Clin.North Am.* 1999; 30 (4): 571-81.

BOYNTON EL, HENRY M, MORTON J, WADDELL JP.

The inflammatory response to particulate wear debris in total hip arthroplasty. *Can.J.Surg.* 1995; 38 (6): 507-15.

BRAUTIGAN DL, BORNSTEIN P, GALLIS B.

Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J.Biol.Chem* 1981; 256: 6519–6522.

BREW R, ERIKSON JS, WEST DC, KINSELLA AR, SLAVIN J, CHRISTMAS SE.

Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000; 12: 78-85.

- BUG G, AMAN MJ, TRETTER T, HUBER C, PESCHEL C.
Induction of macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) by interferon-alpha.
Exp.Hematol. 1998; 26: 117-123.
- BURNS K, CLATWORTHY J, MARTIN L, MARTINON F, PLUMPTON C, MASCHERA B, et al.
A new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor.
Nat.Cell.Biol. 2000; 2: 346-51.
- BURT HM, JACKSON JK, TAYLOR DR, CROWTHER RS.
Activation of human neutrophils by calcium carbonate polymorphs.
Dig.Dis.Sci. 1997; 42 (6): 1283-9.
- CASSATELLA MA.
The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.
Immunol.Today 1995; 16 (1): 21-6.
- CASSATELLA MA, MCDONALD PP.
Interleukin-15 and its impact on neutrophil function.
Curr.Opin.Hematol. 2000; 7 (3): 174-7.
- CAVAILLON JM, HAEFFNER-CAVAILLON N.
Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages.
Cytokine 1990; 2 (5): 313-29.
- CAVAILLON JM.
Les cytokines. 2^{ème} éd.
Paris: Masson; 1996.
- CHAKRABARTI S, PATEL KD.
Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils.
J.Leukoc.Biol. 2005; 78 (1): 279-88.
- CHAKRABARTI S, ZEE JM, PATEL KD.
Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release.
J.Leukoc.Biol. 2006; 79 (1): 214-22.
- CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.
Mol.Cell.Biochem. 2003; 253 (1-2): 269-85.
- CHANDRA RK.
Excessive intake of zinc impairs immune responses.
JAMA 1984; 252 (21): 1443-1446.
- CHERTOV O, YANG D, HOWARD OM, OPPENHEIM JJ.
Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses.
Immunol.Rev. 2000; 177: 68-78.

CHEUNG HS, DEVINE TR, HUBBARD W.

Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes.

Osteoarthritis Cartilage 1997; 5 (3): 145-51.

CHRISTIANSEN T.

A new prosthesis with trunion-bearing.

Acta Chir.Scand. 1969; 135: 43-46.

CHRISTIE MJ, DEBOER DK, TRICK LW, BROTHERS JC, JONES RE, VISE GT, et al.

Primary Total Hip Arthroplasty with Use of the Modular S-ROM Prosthesis. Four to Seven-Year Clinical and Radiographic Results

J.Bone Joint Surg.Am. 1999; 81: 1707-16.

CHRISTIE MJ, DEBOER DK, TINGSTAD EM, CAPPS M, BRINSON MF, TRICK LW.

Clinical experience with a modular noncemented femoral component in revision total hip arthroplasty: 4- to 7-year results.

J.Arthroplasty 2000; 15 (7): 840-8.

CHUNTHARAPAI A, KIM KJ.

Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor.

J.Immunol. 1995; 155 (5): 2587-94.

CLOUTIER A, EAR T, BLAIS-CHARRON E, DUBOIS CM, MCDONALD PP.

Differential involvement of NF- κ B and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils.

J.Leukoc.Biol. 2007; 81 (2): 567-77.

COATHUP MJ, BLACKBURN J, GOODSHIP AE, CUNNINGHAM JL, SMITH T, BLUNN GW.

Role of hydroxyapatite coating in resisting wear particle migration and osteolysis around acetabular components.

Biomaterials 2005; 26 (19): 4161-9.

COCCHI F, DE VICO AL, GARZINO-DEMO A, ARYA SK, GALLO RC, LUSSO P.

Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺T cells.

Science 1995; 270: 1811–1815.

COLEMAN JE.

Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins.

Annu.Rev.Biochem. 1992 ; 16 : 897–946.

CZAPLEWSKI LG, MCKEATING J, CRAVEN CJ, HIGGINS LD, APPAY V, BROWN A, et al.

Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , and RANTES.

J.Biol.Chem. 1999; 274: 16077–16084.

DANFORTH JM, STRIETER RM, KUNKEL SL, ARENBERG DA, VANOTTEREN GM, STANDIFORD TJ.

Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid.

Clin.Immunol.Immunopathol. 1995; 74: 77–83.

DANIEL J, PYNSENT PB, MCMINN DJ.

Metal-on-metal resurfacing of the hip in patients under the age of 55 years with osteoarthritis.
J.Bone.Joint Surg.Br. 2004; 86 (2): 177-84.

DAY RM, BOCCACCINI AR.

Effect of particulate bioactive glasses on human macrophages and monocytes in vitro.
J.Biomed.Mater.Res.A 2005; 73A (1): 73-79.

DE GROOT K.

Clinical applications of calcium phosphate biomaterials : a review.
Ceramics Int 1993; 19 (5): 363-6.

DE GROOT K, WOLKE JGC, JANSEN JA.

State of the art : hydroxylapatite coatings for dental implants.
J.Oral Implant 1994; 20: 232-4.

DETMERS PA, ZHOU D, POLIZZI E, THIERINGER R, HANLON WA, VAIDYA S, et al.

Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst.
J.Immunol. 1998;161 (4): 1921-9.

DI CERA E.

Serine proteases.
IUBMB Life 2009; 61 (5): 510-5.

DINARELLO CA, CANNON JG, MIER JW, BERNHEIM HA, LOPRESTE G, LYNN DL et al.

Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1.
J.Clin.Invest. 1986; 77: 1734-1739.

DINARELLO CA.

Biology of interleukin 1.
FASEB J. 1988; 2: 108-115.

DINARELLO CA.

The biological properties of interleukin-1.
Eur.Cytokine Netw. 1994 ; 5 :517-531.

DINARELLO CA.

Biologic basis for interleukin-1 in disease.
Blood 1996; 87 (6): 2095-147.

DINH-XUAN AT, NGUYEN TV.

Mechanisms of inflammation of the respiratory mucosa.
Presse Med. 2002; 31 (Spec No 1): HS3-6.

DOHERTY DE, DOWNEY GP, WORTHEN GS, HASLETT C, HENSON PM.

Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils.
Lab.Invest. 1988; 59 (2): 200-13.

DONNELLY TE.

Effects of zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the activator-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart.
Biochim.Biophys.Acta 1978; 22: 151-160.

- DORIA C, DE SANTIS V, FALCONE G, PROIETTI L, DE SANTIS E.
Osseointegration in hip prostheses: experimental study in sheep.
Int.Orthop. 2003; 27 (5): 272-7.
- DOWER SK, FANSLOW W, JACOBS C, WAUGH S, SIMS JE, WIDMER MB.
Interleukin-I antagonists.
Ther.Immunol. 1994; 1 (2): 113-22.
- DRAMIS A, DESAI AS, BOARD TN, HEKAL WE, PANEZAI JR.
Periprosthetic osteolysis due to metastatic renal cell carcinoma: a case report.
Cases J. 2008; 1 (1): 297.
- DRIESSEN C, HIRY K, KIRCHNER H, RINK L.
Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide.
Immunology 1995; 84 (2): 272-7.
- DRISCOLL KE.
TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress.
Toxicol.Lett. 2000; 112-113: 177-83.
- DUBIN G.
Proteinaceous cysteine protease inhibitors.
Cell Mol.Life.Sci. 2005; 62: 653-669.
- DUMELIE N, BENAHYOUNE H, RICHARD D, LAURENT-MAQUIN D, BALOSSIER G.
In vitro precipitation of electrodeposited calcium-deficient hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrate.
Mat.Charact. 2008; 59 (2): 129-33.
- DUNNE JL, BALLANTYNE CM, BEAUDET AL, LEY K.
Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1.
Blood 2002; 99: 336-341.
- DURHAM SR, MCCOMB JG, LEVY ML.
Correction of large (>25 cm(2)) cranial defects with "reinforced" hydroxyapatite cement: technique and complications.
Neurosurgery 2003; 52 (4): 842-5.
- EID AJ, BERBARI EF, SIA IG, WENGENACK NL, OSMON DR, RAZONABLE RR.
Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature.
Clin.Infect.Dis. 2007; 45 (6): 687-94.
- ERLEBACHER A, FILVAROFF EH, GITELMAN SE, DERYNCK R.
Toward a molecular understanding of skeletal development.
Cell 1995; 80: 371-8.
- FADOK VA, BRATTON DL, KONOWAL A, FREED PW, WESTCOTT JY, HENSON PM.
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.
J.Clin.Invest. 1998; 101 (4): 890-8.

- FAUCHIAS P, COUDERT JF, VARDELLE M, VARDELLE A, DENOIRJEAN A.
Diagnostics of thermal spray plasma jets.
J.Thermal Spray Technol. 1992; 1: 117–12.
- FAURSCHOU M, BORREGAARD N.
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.
Microbes Infect. 2003; 5 (14): 1317-27.
- FENIGER-BARISH R, RAN M, ZASLAVER A, BEN-BARUCH A.
Differential modes of regulation of cxc chemokine-induced internalization and recycling of human CXCR1 and CXCR2.
Cytokine 1999; 11 (12): 996-1009.
- FILIAGGI MJ, COOMBS NA, PILLIAR RM.
Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-6Al-4V implant system.
J.Biomed.Mater.Res. 1991; 25: 1211–30.
- FINKEMEIER CG.
Bone-grafting and bone-graft substitutes.
J.Bone Joint Surg.Am. 2002; 84-A (3): 454-64.
- FISHER G J, DATTA SC, TALWAR HS, WANG ZQ, VARANI J, KANG S, et al.
Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism.
Nature 1996 ; 379 : 335–339.
- FRAKER PJ.
Roles for cell death in zinc deficiency.
J.Nutr. 2005; 135: 359–362.
- FRIEDMAN CD, COSTANTINO PD, TAKAGI S, CHOW LC.
BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction.
J.Biomed.Mater.Res. 1998; 43 (4): 428-32.
- FRITZ EA, GLANT TT, VERMES C, JACOBS JJ, ROEBUCK KA.
Chemokine gene activation in human bone marrow-derived osteoblasts following exposure to particulate wear debris.
J.Biomed.Mater.Res.A 2006; 77 (1): 192-201.
- FURLONG RJ, OSBORN JF.
Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings.
J.Bone.Joint Surg. 1991; 73B: 741–745.
- GABRILOVICH DI.
The neutrophils : new outlook for old cells. 2nd ed.
London: Imperial College Press; 2005.
- GAINE WJ, SANVILLE PR, BAMFORD DJ.
The Charnley-Hastings bipolar prosthesis in femoral neck fractures - a study of dynamic motion.
Injury 2000; 31 (4): 257-63.
- GALLIN JJ, GOLDSTEIN M, SNYDERMAN R.
Inflammation : basic principles and clinical correlates.
New-York; Raven Press: 1988.

- GARRIGUES GE, CHO DR, RUBASH HE, GOLDRING SR, HERNDON JH, SHANBAG AS.
Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials.
Biomaterials 2005; 26 (16): 2933-45.
- GARZÓN R, SORIANO SF, RODRÍGUEZ-FRADE JM, GÓMEZ L, MARTÍN DE ANA A, SÁNCHEZ-GÓMEZ M, et al.
CXCR4-mediated suppressor of cytokine signaling up-regulation inactivates growth hormone function.
J.Biol.Chem. 2004; 279 (43): 44460-6.
- GEESINK RG, DE GROOT K, KLEIN CP.
Bonding of bone to apatite-coated implants.
J.Bone Joint Surg Br.1988; 70 (1): 17-22.
- GEESINK RGT.
Experimental and clinical experience with hydroxyapatite-coated hip implants.
Orthopedics 1989; 12: 1239-42.
- GEORGES S, RUIZ VELASCO C, TRICHET V, FORTUN Y, HEYMAN D, PADRINES M.
Proteases and bone remodelling.
Cytok.Growth Fact. 2009; 20: 29-41.
- GIANNOUDIS PV, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E.
Bone substitutes: an update.
Injury 2005; 36 Suppl 3: S20-7.
- GLESS U, SCHMITT Y, ZIEGLER S, KRUSE-JARRES JD.
Chromatographic separation of serum proteins and estimation of their zinc and copper content.
J.Trace Elem.Electrolytes Health Dis. 1992; 6: 245- 250.
- GOLDRING SR, CLARK CR, WRIGHT TM.
The problem in total joint arthroplasty: aseptic loosening.
J.Bone Joint Surg. 1993; 75A:799-801.
- GOMIS-RÜTH FX.
Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases.
Mol.Biotechnol. 2003; 24 (2): 157-202.
- GONLUGUR U, EFEOGLU T.
Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes.
Cell Tissue Res. 2004; 318 (3): 473-82.
- GONZALEZ O, SMITH RL, GOODMAN SB.
Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro.
J.Biomed.Mater.Res. 1996; 30: 463-473.
- GOUGEROT-POCIDALO MA, EL BENNA J, ELBIM C, CHOLLET-MARTIN S, DANG MC.
Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines
J.Soc.Biol. 2002; 196 (1): 37-46.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, LAQUERRIERE P, GUENOUNOU M, LAURENT-MAQUIN D, PHILLIPS TM.

Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles.

Biomaterials 2005; 26 (15): 2361-9.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, LAQUERRIERE P, JALLOT E, NEDELEC JM, GUENOUNOU M, LAURENT-MAQUIN D, et al.

Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro.

Biomaterials 2006; 27 (17): 3195-200.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, TABARY O, JACQUOT J, RICHARD D, FRAYSSINET P, GUENOUNOU M, et al.

Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles.

Biomaterials 2007; 28 (3): 400-4.

GROSS KA, BERNDT CC, HERMAN H.

Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings.

J.Biomed.Mater.Res. 1998; 39 (3): 407-14.

GSCHWIND R, BUFFARD E, MASSET H, DAVID C, MAKOVICKA L.

Dosimetric influence of hip prosthesis during radiotherapeutic treatment

Cancer Radiother. 2008; 12 (2): 102-9.

GREENFIELD EM, BI Y, RAGAB AA, GOLDBERG VM, VAN DE MOTTER RR.

The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening.

J.Orthop.Res. 2002; 20 (1): 1-8.

HAASE H, MARET W.

Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling.

Exp.Cell Res. 2003; 291: 289-298.

HAASE H, RINK L.

Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions.

Biometals 2007; 20 (3-4): 579-85.

HALLAB NJ, JACOBS JJ.

Biologic effects of implant debris.

Bull.NYU.Hosp.Jt.Dis. 2009; 67 (2): 182-8.

HAMMOND ME, LAPOINTE GR, FEUCHT PH, HILT S, GALLEGOS CA, GORDON CA, et al.

IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors.

J.Immunol. 1995; 155 (3): 1428-33.

HAN Y, XU K, LU J.

Dissolution response of hydroxyapatite coatings to residual stresses.

J.Biomed.Mater.Res. 2001; 55 (4): 596-602.

HAN Y, XU K, LU J, WU Z.

The structural characteristics and mechanical behaviors of nonstoichiometric apatite coatings sintered in air atmosphere.

J.Biomed.Mater.Res. 1999; 45 (3): 198-203.

HANADA T, YOSHIMURA A.

Regulation of cytokine signaling and inflammation.

Cytokine Growth Factor Rev. 2002; 13:413-421.

HARRIS WH.

The problem is osteolysis.

Clin.Orthop.Rel.Res. 1995; 311: 46-53.

HASHIZUME M, YAMAGUCHI M.

Stimulatory effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells.

Mol.Cell.Biochem 1993; 122 (1): 59-64.

HATADA EN, KRAPPMANN D, SCHEIDEREIT C.

NF-kappaB and the innate immune response.

Curr.Opin.Immunol. 2000; 12 (1): 52-8.

HATANO Y, KASAMA T, IWABUCHI H, HANAOKA R, TAKEUCHI HT, JING L, et al.

Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis.

Ann.Rheum.Dis. 1999; 58 (5): 297-302.

HAYDEN MS, WEST AP, GHOSH S.

NF-kappaB and the immune response.

Oncogene 2006; 25 (51): 6758-80.

HEISEL C, SILVA M, SCHMALZRIED TP.

In vivo wear of bilateral total hip replacements: conventional versus crosslinked polyethylene.

Arch.Orthop.Trauma.Surg. 2005; 125 (8): 555-7.

HENNIG B, MEERARANI P, TOBOREK M, MCCLAIN CJ.

Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells.

J.Am.Coll.Nutr. 1999; 18: 152-158.

HERBEIN G, VARIN A, FULOP T.

NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging.

Biogerontology 2006; 7 (5-6): 409-19.

HERON GS, UNEMORI E, WONG M, RAPP JH, HIBBS MH, STONEY RJ.

Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms.

Arterioscler.Thromb. 1991; 11: 1667-1677.

HEYWOOD-WADDINGTON MB

Use of the Austin Moore prosthesis for advanced osteoarthritis of the hip.

J.Bone.Joint.Surg.Br. 1966; 48 (2): 236-44.

HIRAKAWA K, JACOBS JJ, URBAN R, SAITO T.

Mechanisms of failure of total hip replacements: lessons learned from retrieval studies.

Clin.Orthop.Relat.Res. 2004; 420: 10-17.

HIRCHE TO, CROUCH EC, ESPINOLA M, BROKELMAN TJ, MECHAM RP, DESILVA N, et al.
Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain.
J.Biol.Chem. 2004; 279 (26): 27688-98.

HISCOTT J, MAROIS J, GAROUFALIS J, D'ADDARIO M, ROULSTON A, KWAN I et al.
Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop.
Mol.Cell Biol. 1993; 13: 6231-6240.

HO LH, RUFFIN RE, MURGIA C, LI L, KRILIS SA, ZALEWSKI PD.
Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF-kappaB translocation.
J.Immunol 2004; 172: 7750-7760.

HOLMES WE, LEE J, KUANG WJ, RICE GC, WOOD WI.
Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.
Science 1991; 253: 1278-80.

HOSALKAR H, DORMANS J.
Surgical management of pelvic sarcomas in children.
Pediatr.Blood Cancer. 2005; 44 (4): 305-17.

HUJANEN ES, SEPPÄ ST, VIRTANEN K.
Polymorphnuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel *in vitro*.
Biochim.Biophys.Acta 1995; 1245: 145-152.

HUKKANEN M, CORBETT SA, BATTEN J, KONTTINEN YT, MCCARTHY ID, MACLOUF J, et al.
Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure.
J.Bone Joint Surg.Br. 1997; 79 (3): 467-74.

HUNDRIC-HASPL Z, PECINA M, HASPL M, TOMICIC M, JUKIC I.
Plasma cytokines as markers of aseptic prosthesis loosening.
Clin.Orthop.Relat.Res. 2006; 453: 299-304.

HUNNINGHAKE GW, MONKS BG, GEIST LJ, MONICK MM, MONROY MA, STINSKI MF et al.
The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation.
Mol.Cell Biol. 1992; 12: 3439-3448.

IRVING SG, ZIPFEL PF, BALKE J, MCBRIDE OW, MORTON CC, BURD PR, et al.
Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q.
Nucleic Acids Res. 1990; 18 (11): 3261-70.

ITAYEM R, ARNDT A, MCMINN DJ, DANIEL J, LUNDBERG A.
A five-year radiostereometric follow-up of the Birmingham Hip Resurfacing arthroplasty.
J.Bone.Joint.Surg.Br. 2007; 89 (9): 1140-3.

JALLOT E, NEDELEC JM, GRIMAUULT AS, CHASSOT E, GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, LAQUERRIERE P, et al.
STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids.
Colloids Surf.B Biointerfaces 2005; 42 (3-4): 205-10.

JANKOWSKI-HENNIG MA, CLEGG MS, DASTON GP, ROGERS JM, KEEN CL.
Zinc-deficient rat embryos have increased caspase 3-like activity and apoptosis.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 2000; 271 (1): 250-6.

JARCHO M.
Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics.
Clin.Orthop.Relat.Res. 1981; (157): 259-78.

JEON KI, JEONG JY, JUE DM.
Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappa B activation by blocking I kappa B kinase.
J.Immunol 2000; 164: 5981–5989.

JOHNSON DP.
Total Hip Arthroplasty - Indications / Contra-indications + Orthopaedics.co.uk [consulté le 22/09/2009].
Disponible à partir de l'URL:
http://www.orthopaedics.co.uk/boc/patients/total_hip_indications.htm

JOHNSSON MSA, NANCOLLAS GH.
The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation.
Crit.Rev.Oral Biol.Med. 1992; 3 (1/2): 61-82.

JUHÁSZ A, SZIKLAI I, RÁKOSY Z, ECSEDI S, ADÁNY R, BALÁZS M.
Elevated level of tenascin and matrix metalloproteinase 9 correlates with the bone destruction capacity of cholesteatomas.
Otol.Neurotol. 2009; 30 (4): 559-65.

KAMOHARA H, TAKAHASHI M, ISHIKOT, OGAWA M, BABA H.
Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- α and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor.
Int.J.Oncol. 2007; 31: 627-32.

KANBE N, TANAKA A, KANBE M, ITAKURA A, KUROSAWA M, MATSUDA H.
Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9.
Eur.J.Immunol. 1999; 29: 2645–2649.

KANSAS GS.
Selectins and their ligands: current concepts and controversies.
Blood 1996; 88: 3259–3287.

KAPLAN G, PRIER A, VINCENEUX P.
Rhumatologie pour le praticien.
Paris: SIMEP; 1990.

KARPUS WJ, LUKACS NW, KENNEDY KJ, SMITH WS, HURST SD, BARRETT TA.
Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production.
J.Immunol. 1997; 158: 4129–4136.

- KASAMA T, STRIETER RM, LUKACS NW, BURDICK MD, KUNKEL SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10.
J.Immunol. 1994; 152 (7): 3559-69.
- KAWAMURA H, DUNBAR MJ, MURRAY P, BOURNE RB, RORABECK CH.
The porous coated anatomic total hip replacement. A ten to fourteen-year follow-up study of a cementless total hip arthroplasty.
J.Bone Joint Surg.Am. 2001; 83-A (9): 1333-8.
- KAY M.I, YOUNG R.A, POSNER A.S.
Crystal structure of hydroxyapatite.
Nature 1964; 204; 1050-1052.
- KAY RG, TASMAN-JONES C.
Acute zinc deficiency in man during intravenous alimentation.
Aust.N.Z.J.Surg. 1975; 45: 325–30.
- KEEN CL, GERSHWIN ME.
Zinc deficiency and immune function.
Annu.Rev.Nutr. 1990; 10: 415–431.
- KENAGY RD, CLOWES AW.
A possible role for MMP-2 and MMP-9 in the migration of primate arterial smooth muscle cells through native matrix.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1994; 732: 462–465.
- KENT JN, ZIDE MF, KAY JF, JARCHO M.
Hydroxylapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognathic and reconstructive surgery.
J.Oral Maxillofac.Surg. 1986;44 (8): 597-605.
- KHOSLA S.
Minireview: the OPG/RANKL/RANK system.
Endocrinology 2001; 142: 5050-5.
- KIM JH, JIN HM, KIM K, SONG I, YOUN BU, MATSUO K, et al.
The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1.
J.Immunol. 2009; 183 (3): 1862-70.
- KIM JJ, TSAI A, NOTTINGHAM LK, MORRISON L, CUNING DM, OH J ET AL.
Intracellular adhesion molecule-1 modulates β -chemokines and directly costimulates T cells in vivo.
J.Clin.Invest. 1999; 103: 869–877.
- KIM Y, LEGEROS J, LEGEROS RZ.
Characterization of commercial HA-coated implants.
J.Dent.Res. 1994; 73: 137.
- KIM YM, REED W, WU W, BROMBERG PA, GRAVES LM, SAMET JM.
Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells.
Am.J.Physiol. 2006; 290: L1028–L1035.

KISHI S, YAMAGUCHI M.

Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures.
Biochem.Pharmacol 1994; 48 (6): 1225–1230.

KNALL C, YOUNG S, NICK JA, BUHL AM, WORTHEN GS, JOHNSON GL.

Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils.

J.Biol.Chem 1996; 271: 2832-8.

KNALL C, WORTHEN GS, JOHNSON GL.

Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1997; 94: 3052-7.

KOBAYASHI Y, YAMAMOTO K, SAIDO T, KAWASAKI H, OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA K.

Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1990; 87 (14): 5548-52.

KRZYSIEK R, LEFEVRE EA, ZOU W, FOUSSAT A, BERNARD J, PORTIER A, et al.

Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokine production in human B cells.

J.Immunol. 1999; 162: 4455–4463.

KUNKEL SL, LUKACS N, STRIETER RM.

Expression and biology of neutrophil and endothelial cell-derived chemokines.

Semin.Cell.Biol. 1995; 6 (6): 327-36.

KURT-JONES EA, MANDELL L, WHITNEY C, PADGETT A, GOSSELIN K, NEWBURGER PE, et al.

Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils.

Blood. 2002; 100 (5): 1860-8.

KYUNG TW, LEE JE, SHIN HH, CHOI HS.

Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF-alpha by inhibiting activation of NF-kappaB.

Exp.Mol.Med. 2008; 40 (1): 52-8.

LACHIEWICZ PF, MESSICK P.

Precoated femoral component in primary hybrid total hip arthroplasty: results at a mean 10-year follow-up.

J.Arthroplasty. 2003; 18 (1): 1-5.

LAGGNER H, PHILLIPP K, GOLDENBERG H.

Free zinc inhibits transport of vitamin C in differentiated HL-60 cells during respiratory burst.

Free.Radic.Biol.Med. 2006; 40 (3): 436-43.

- LAQUERRIERE P, GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, ADDADI-REBBAH S, JALLOT E, LAURENT-MAQUIN D, FRAYSSINET P, et al.
MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles.
Biomaterials 2004; 25 (13): 2515-24.
- LASKAY T, VAN ZANDBERGEN G, SOLBACH W.
Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor.
Immunobiology 2008; 213 (3-4): 183-91.
- LAUDANNA C, ALON R.
Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes.
Thromb.Haemost. 2006; 95 (1): 5-11.
- LE MAGUERESSE-BATTISTONI B.
Serine proteases and serine protease inhibitors in testicular physiology: the plasminogen activation system.
Reproduction. 2007; 134 (6): 721-9.
- LEE HH, LO YC, LIN LC, WU SS.
Disassembly and dislocation of a bipolar hip prosthesis.
J.Formos.Med.Assoc. 2008; 107 (1): 84-8.
- LEIRISALO-REPO M.
The present knowledge of the inflammatory process and the inflammatory mediators.
Pharmacol.Toxicol. 1994; 75 Suppl 2: 1-3.
- LEONARD EJ, YOSHIMURA T.
Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]).
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1990; 2 (6): 479-86.
- LEWIECKI EM.
Managing osteoporosis: challenges and strategies.
Cleve.Clin.J.Med. 2009; 76 (8): 457-66.
- LEY K, ZARBOCK A.
Hold on to your endothelium: postarrest steps of the leukocyte adhesion cascade.
Immunity 2006; 25 (2): 185-7.
- LI Z, YUBAO L, YI Z, LAN W, JANSEN JA.
In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement.
J.Biomed.Mater.Res.A. 2009 Jun 26 [Epub ahead of print].
- LIAO S, TAMURA K, ZHU Y, WANG W, UO M, AKASAKA T, et al.
Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-hydroxyapatite/collagen and nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) composites.
J.Biomed.Mater.Res.A 2006; 76 (4): 820-5.
- LIDINGTON EA, MCCORMACK AM, YACOUN MH, ROSE ML.
The effects of monocytes on the transendothelial migration of T lymphocytes.
Immunology 1998; 94: 221-227.

- LISIGNOLI G, TONEGUZZI S, POZZI C, PIACENTINI A, RICCIO M, FERRUZZI A, et al.
Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.
J.Rheumatol. 1999; 26 (4): 791-9.
- LIU J, SUKHOVA GK, SUN JS, XU WH, LIBBY P, SHI GP
Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2004; 24: 1359–1366.
- LIVAGE J, SANCHEZ C.
Sol-gel chemistry.
J.Non Cryst.Sol. 1992; 145: 11-9.
- LODI PJ, GARRETT DS, KUSZEWSKI J, TSANG MLS, WEATHERBEE JA, LEONARD WJ ET AL.
High-resolution solution structure of the β chemokine hMIP-1 β by multidimensional NMR. *Science* 1994; 263 : 1762–1767.
- LOHMANN CH, FÜRST M, NIGGEMEYER O, RÜTHER W.
The treatment of periprosthetic infections.
Z.Rheumatol. 2007; 66 (1): 28-33.
- LOU O, ALCAIDE P, LUSCINSKAS FW, MULLER WA.
CD99 Is a Key Mediator of the Transendothelial Migration of Neutrophils.
J.Immunol. 2007; 178 (2): 1136-43.
- LUKACS N, STREITER RM, ELNER VM, EVANOFF HL, BURDICK M, KUNKEL S.
Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 during monocyte-endothelial cell interactions.
Blood 1994; 83: 1171-1178.
- LUSCINSKAS FW, GIMBRONE MA JR.
Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment.
Annu.Rev.Med. 1996; 47: 413-21.
- LUTGENS SP, CLEUTJENS KB, DAEMEN MJ, HEENEMAN S.
Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease.
FASEB.J. 2007; 21 (12): 3029-41.
- MACAULAY W, PAGNOTTO MR, IORIO R, MONT MA, SALEH KJ.
Displaced femoral neck fractures in the elderly: hemiarthroplasty versus total hip arthroplasty.
J.Am.Acad.Orthop.Surg. 2006; 14 (5): 287-93.
- MAGHAZACHI, A.A., AL-AOUKATY, A., SCHALL, TJ.
C-C chemokines MIP-1 alpha, MCP-1, and RANTES, but not MIP-1 beta induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK (IANK) cells, as determined in microchemotaxis assay.
J.Immunol. 1994; 153: 4969-4977.
- MAGNESON GR, PUVATHINGAL JM, RAY WJ JR.
The concentrations of free Mg²⁺ and free Zn²⁺ in equine blood plasma.
J.Biol.Chem. 1987; 262: 11140– 11148.

MALIZOS KN, KARANTANAS AH, VARITIMIDIS SE, DAILIANA ZH, BARGIOTAS K, MARIS T.

Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment.

Eur.J.Radiol. 2007; 63 (1): 16-28.

MARQUES AP, REIS RL, HUNT JA.

Cytokine secretion from mononuclear cells cultured in vitro with starch-based polymers and poly-L-lactide.

J.Biomed.Mater.Res.A 2004; 71 (3): 419-29.

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.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S.

Matrix metalloproteinases: Structure evolution and diversification.

FASEB J. 1998; 12: 1075–1095.

MATSUMINE A, MYOUI A, KUSUZAKI K, ARAKI N, SETO M, YOSHIKAWA H, et al.

Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study.

J.Bone Joint Surg.Br. 2004; 86 (5): 719-25.

MATSUSHIMA K, MORISHITA K, YOSHIMURA T, LAVU S, KOBAYASHI Y, LEW W, et al.

Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor.

J.Exp.Med. 1988; 167 (6): 1883-93.

MAYER I, FEATHERSTONE JDB.

Dissolution studies of Zn-containing carbonated hydroxyapatite.

J.Cryst.Growth 2000; 219: 98-101.

MCCOLL SR, HACHINA M, LEVASSEUR S, NEOTE K, SCHALL TJ.

Uncoupling of early signal transduction events from effector function in human peripheral blood neutrophils in response to recombinant macrophage inflammatory proteins-1 α and -1 β .

J.Immunol. 1993; 150: 4550–4560.

MCMINN DJ, DANIEL J, ZIAEE H.

Controversial topics in orthopaedics: metal-on-metal.

Ann.R.Coll.Surg.Engl. 2005; 87 (6): 411-5.

MEDZHITOV R, JANEWAY CA JR.

Innate immunity: impact on the immune adaptative response.

Cur.Op.Immunol. 1997; 9: 4-9.

MELNICOFF MJ, HORAN PK, MORAHAN PS.

Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation.

Cell Immunol.1989; 118 (1): 178-91.

MENEGHINI RM, FEINBERG JR, CAPELLO WN.

Primary hybrid total hip arthroplasty with a roughened femoral stem: integrity of the stem-cement interface.

J.Arthroplasty. 2003; 18 (3): 299-307.

- MENG ZH, HUDSON AP, SCHUMACHER HR JR, BAKER JF, BAKER DG. Monosodium urate, hydroxyapatite, and calcium pyrophosphate crystals induce tumor necrosis factor- α expression in a mononuclear cell line.
J.Rheumatol. 1997; 24 (12): 2385-8.
- MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J.
Macrophage inflammatory protein-1.
Cytokine Growth Factor Rev. 2002; 13 (6): 455-81.
- MIGNATTI P, RIFKIN DB.
Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.
Physiol.Rev. 1993; 73: 161–195.
- MILLION M, ROUX F, COHEN SOLAL J, BREVILLE P, DESPLACES N, BARTHAS J, et al.
Septic arthritis of the hip with *Propionibacterium avidum* bacteremia after intraarticular treatment for hip osteoarthritis.
Rev.Rhum. 2008; 75: 494-6.
- MIYAMOTO RG, KAPLAN KM, LEVINE BR, EGOL KA, ZUCKERMAN JD.
Surgical management of hip fractures: an evidence-based review of the literature. I: femoral neck fractures.
J.Am.Acad.Orthop.Surg. 2008; 16 (10): 596-607.
- MIZEL SB, KILIAN PL, LEWIS JC, PAGANELLI KA, CHIZZONITE RA.
The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts.
J.Immunol. 1987; 138 (9): 2906-12.
- MOCCHEGIANI E, GIACCONI R, MUZZIOLI M, CIPRIANO C.
Zinc, infections and immunosenescence.
Mech.Ageing Dev. 2000; 121: 21–35.
- MODI WS, DEAN M, SEUANEZ HN, MUKAIDA N, MATSUSHIMA K, O'BRIEN SJ.
Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily.
Hum.Genet. 1990; 84 (2): 185-7.
- MORITA S, FURUYA K, ISHIHARA K, NAKABAYASHI N.
Performance of adhesive bone cement containing hydroxyapatite particles.
Biomaterials 1998; 19 (17): 1601-6.
- MORONI F, DI PAOLO ML, RIGO A, CIPRIANO C, GIACCONI R, RECCHIONI R, et al.
Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant activity and zinc pool in very old age.
Biogerontology 2005; 6 (4): 271-81.
- MORSHED S, BOZIC KJ, RIES MD, MALCHAU H, COLFORD JM JR.
Comparison of cemented and uncemented fixation in total hip replacement: a meta-analysis.
Acta Orthop. 2007; 78 (3): 315-26.
- MOSER B, LOETSCHER P.
Lymphocyte traffic control by chemokines.
Nat.Immunol. 2002; 2: 123-8.

- MOSLEY B, URDAL DL, PRICKETT KS, LARSEN A, COSMAN D, CONLON PJ, et al.
The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor.
J.Biol.Chem.1987; 262 (7): 2941-4
- MUKAIDA N, OKAMOTO S, ISHIKAWA Y, MATSUSHIMA K.
Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression.
J.Leukoc.Biol. 1994; 56 (5): 554-8.
- MULROY WF, HARRIS WH.
Revision total hip arthroplasty with use of so-called second-generation cementing techniques for aseptic loosening of the femoral component. A fifteen-year-average follow-up study.
J.Bone Joint Surg.Am. 1996; 78 (3): 325-30.
- MUR E, ZABERNIGG A, HILBE W, EISTERER W, HALDER W, THALER J.
Oxidative burst of neutrophils in patients with rheumatoid arthritis: influence of various cytokines and medication.
Clin.Exp.Rheumatol. 1997; 15 (3): 233-7.
- MURGIA C, LANG CJ, TRUONG-TRAN AQ, GROSSER D, JAYARAM L, RUFFIN RE, et al.
Zinc and its specific transporters as potential targets in airway disease.
Curr.Drug.Targets. 2006; 7 (5): 607-627.
- MURPHY PM.
Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines.
Semin.Hematol. 1997; 34 (4): 311-8.
- MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HEBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, ET AL.
International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.
Pharmacol.Rev. 2000; 52: 145-176.
- MURRAY GI.
Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules.
J.Pathol 2001; 195 (2): 135-7.
- NAGASE M, NISHIYA H, ABE Y.
The effect of crystallinity on hydroxyapatite-induced production of reactive oxygen metabolites by polymorphonuclear leukocytes.
FEBS Lett. 1993; 325 (3): 247-50.
- NAGASE M, NISHIYA H, NODA M.
Priming effect of hydroxyapatite on the chemiluminescence response in human polymorphonuclear leukocytes.
FEBS Lett. 1994; 349 (1): 13-6.
- NAGASE H, WOESSNER JF JR.
Matrix metalloproteinases.
J.Biol.Chem. 1999; 274 (31): 21491-4.
- NAKAO M, NOMIYAMA H, SHIMADA K.
Structures of human genes coding for cytokine LD78 and their expression.
Mol.Cell.Biol. 1990; 10 (7): 3646-58.

NANCI A.

Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 7th ed.
St Louis: Mosby; 2008.

NASSER MW, RAGHUWANSHI SK, MALLOY KM, GANGAVARAPU P, SHIM JY, RAJARATHNAM K, et al.

CXCR1 and CXCR2 activation and regulation. Role of aspartate 199 of the second extracellular loop of CXCR2 in CXCL8-mediated rapid receptor internalization.
J.Biol.Chem. 2007; 282 (9): 6906-15.

NATARAJAN M, DHANAPAL R, KUMARAVEL S, HUSSAIN J, SELVARAJ R, UVARAJ NR.

The use of bovine calcium-hydroxy-apatite in filling defects following curettage of benign bone tumours.
Indian J.Orthop. 2003; 37 (3): 50-2.

NATHAN C, SRIMAL S, FARBER C, SANCHEZ E, KABBASH L, ASCH A, et al.

Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins.
J.Cell.Biol. 1989; 109 (3): 1341-9.

NEALE SD, ATHANASOU NA.

Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts.
Acta Orthop.Scand. 1999; 70: 452-8.

NEOTE K, DIGREGORIO D, MAK JY, HORUK R, SCHALL TJ.

Molecular cloning, functional expression and signalling characteristics of a CC chemokine receptor.
Cell 1993; 72: 415–425.

NETTER P, BARDIN T, BIANCHI A, RICHETTE P, LOEUILLE D.

The ANKH gene and familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease.
Rev.Rhum. 2004; 71: 740-4

NEURATH H, WALSH KA

Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review).
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1976; 73: 3825–3832.

NICK JA, AVDI NJ, YOUNG SK, LEHMAN LA, MCDONALD PP, FRASCH SC, et al.

Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils.
J.Clin.Invest. 1999; 103 (6): 851-8.

NIWA Y, AKAMATSU H, SUMI H, OZAKI Y, ABE A.

Evidence for degradation of cytokines in the serum of patients with atopic dermatitis by calcium-dependent protease.
Arch.Dermato. Res. 2000; 292 (8): 391-6.

NORDIN JY, MASQUELET AC.

Chirurgie de l'appareil locomoteur .
Paris : Masson ; 1992.
(Pathologie chirurgicale ; 3).

NORRISH AR, RAO J, PARKER MJ.

Prosthesis survivorship and clinical outcome of the Austin Moore hemiarthroplasty: An 8-year mean follow-up of a consecutive series of 500 patients.

Injury 2006; 37 (8): 734-9.

OHNO I, OHTANI H, NITTA Y, SUZUKI J, HOSHI H, HONMA M, ET AL.

Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic air way inflammation.

Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1997; 16: 212–219.

O'KEEFE RJ, ROSIER RN, TEOT LA, STEWART JM, HICKS DG.

Cytokine and matrix metalloproteinase expression in pigmented villonodular synovitis may mediate bone and cartilage destruction.

Iowa Orthop.J. 1998; 18: 26–34.

ONG LJ, CARNES DL, BESSHO K.

Evaluation of titanium plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo.

Biomaterials 2004; 25: 4601-6.

ONG KL, KURTZ SM, LAU E, BOZIC KJ, BERRY DJ, PARVIZI J.

Prosthetic Joint Infection Risk After Total Hip Arthroplasty in the Medicare Population.

J.Arthroplasty. 2009; 24 (6 Suppl): 105-9.

OSAKA A, MIURA Y, TAKEUCHI K, ASADA M, TAKAHASHI K.

Calcium apatite prepared from calcium hydroxyde and orthophosphoric acid .

J.Mater.Sci.Mat.Med. 1991; 2: 51-5.

OONISHI H, OHASHI H, OONISHI H JR, KIM SC.

THA with hydroxyapatite granules at cement-bone interface: 15- to 20-year results.

Clin.Orthop.Relat.Res. 2008; 466 (2): 373-9.

OOSTERBOS CJ, RAHMY AI, TONINO AJ.

Hydroxyapatite coated hip prosthesis followed up for 5 years.

Int Orthop. 2001; 25 (1): 17-21.

OOSTERBOS CJ, RAHMY AI, TONINO AJ, WITPEERD W.

High survival rate of hydroxyapatite-coated hip prostheses: 100 consecutive hips followed for 10 years.

Acta Orthop.Scand. 2004; 75 (2): 127-33.

PARKER MJ, GURUSAMY K.

Arthroplasties (with and without bone cement) for proximal femoral fractures in adults. Cochrane

Database Syst.Rev. 2006; (3): CD001706.

PACIFICI R, CARANO A, SANTORO SA, RIFAS L, JEFFREY JJ,

MALONE JD, et al.

Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells.

J.Clin.Invest 1991; 87: 221-228.

PAGE MJ, DI CERA E.

Serine peptidases: classification, structure and function. Cell Mol.

Life Sci. 2008; 65 :1220–1236.

- PAGE-MCCAW A, EWALD AJ, WERB Z.
Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews. Mol.Cell Biol.* 2007; 8: 221–233.
- PALM L, JACOBSSON SA, IVARSSON I.
Hydroxyapatite coating improves 8- to 10-year performance of the link RS cementless femoral stem. *J.Arthroplasty.* 2002; 17 (2): 172-5.
- PATEL JD, KRUPKA T, ANDERSON JM.
iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils. *J.Biomed.Mater.Res.A* 2007; 80 (2): 381-90.
- PEAKE JM.
Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc.Immunol.Rev.* 2002; 8: 49-100.
- PEARCE WH, KOCH AE.
Cellular components and features of immune response in abdominal aortic aneurysms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1996; 800: 175–185.
- PENOLAZZI L, LAMBERTINI E, TAVANTI E, TORREGGIANI E, VESCE F, GAMBARI R, et al.
Evaluation of chemokine and cytokine profiles in osteoblast progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-PLEX technology. *Cell.Biol.Int.* 2008; 32 (2): 320-5.
- PERCIVAL MD, YEH B, FALGUEYRET JP.
Zinc dependent activation of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1997; 241:175–180.
- PFENDER E.
Plasma jet behavior and modeling associated with the plasma spray process. *Thin Solid Films* 1994; 238: 228–241.
- PIGNATTI P, MOSCATO G, CASARINI S, DELMASTRO M, POPPA M, BRUNETTI G, et al.
Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. *J.Allergy.Clin.Immunol.* 2005 Jan;115(1):88-94.
- PIZZOFERRATO A, CIAPETTI G, STEA S, TONI A.
Cellular events in the mechanisms of prosthesis loosening. *Clin.Mater.* 1991; 7 (1): 51-81.
- PRASAD AS, BAO B, BECK FW, KUCUK O, SARKAR FH.
Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic.Biol.Med.* 2004; 37: 1182–1190.
- PRASAD AS.
Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol.Med.* 2008; 14 (5-6): 353-7.

- PRYSTOWSKY JB, HUPRIKAR JS, RADEMAKER AW, REGE RV.
Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro.
Dig.Dis.Sci. 1995; 40 (2): 412-8.
- PUENTE XS, LOPEZ-OTIN C.
A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors.
Genome Research 2004; 4 : 609–622.
- PURDUE PE, KOULOUVARIS P, POTTER HG, NESTOR BJ, SCULCO TP.
The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis.
Clin.Orthop.Relat.Res 2007; 454: 251-61.
- RAAYMAKERS EL.
Fractures of the femoral neck: a review and personal statement.
Acta Chir.Orthop.Traumatol.Cech. 2006; 73 (1): 45-59.
- RADIN S, DUCHEYNE P.
Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability.
Mater.Med. 1992; 3: 33–42.
- REDDI AH.
Bone morphogenesis and modeling : soluble signals sculpt osteosomes in the solid state.
Cell 1997; 89: 169-71.
- REDDY R, SWAMY MKS.
The use of hydroxyapatite as a bone graft substitute in orthopaedic conditions.
Indian J.Orthop. 2005; 39 (1): 52-4.
- REGINATO AJ, COQUIA JA.
Musculoskeletal manifestations of osteomalacia and rickets.
Best Pract.Res.Clin.Rheumatol. 2003; 17 (6): 1063-80.
- REICHEL CA, REHBERG M, BIHARI P, MOSER CM, LINDER S, KHANDOGA A, et al.
Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling.
J.Leukoc.Biol. 2008; 83 (4): 864-74.
- RHEE SH.
Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment.
Biomaterials 2002; 23 (4): 1147-52.
- RICHARDSON RM, ALI H, PRIDGEON BC, HARIBABU B, SNYDERMAN R.
Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. J.Biol.Chem. 1998; 273: 10690-5.
- RICHETTE P.
Rapidly destructive hip osteoarthritis.
Rev.Rhum. 2009; 76: 341-5.
- RINK L, GABRIEL P.
Zinc and the Immune System.
Proc.Nutr.Soc. 2000; 59: 541–552.

- RINK L, GABRIEL P.
Extracellular and immunological actions of zinc.
Biometals 2001; 14 (3-4): 367-83.
- RIOUX JD, ABBAS AK.
Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease.
Nature 2005; 435 (7042): 584-9.
- ROBERGE CJ, DE MEDICIS R, DAYER JM, ROLA-PLESZCZYNSKI M, NACCACHE PH, POUBELLE PE, HMURA M
Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL- 1 and IL-1 receptor antagonist.
J.Immunol. 1994; 152 (11): 5485-94.
- RODRÍGUEZ-LORENZO LM, VALLET-REGÍ M, FERREIRA JM.
Fabrication of hydroxyapatite bodies by uniaxial pressing from a precipitated powder.
Biomaterials 2001; 22 (6): 583-8.
- ROOS D, VAN BRUGGEN R, MEISCHL C.
Oxidative killing of microbes by neutrophils.
Microbes Infect. 2003. 5 (4): 1307-15.
- ROTH SJ, WOLDEMAR CARR M, SPRINGER TA.
C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- γ inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 1995; 25: 3482–3488.
- SABOKBAR A, RUSHTON N.
Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties.
J.Arthroplasty 1995; 10 (6): 810-6.
- SABROE I, DOWER SK, WHYTE MK.
The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis.
Clin.Infect.Dis. 2005; 41 Suppl 7: S421-6.
- SAIKIA KC, BHATTACHARYA TD, BHUYAN SK, TALUKDAR DJ, SAIKIA SP, JITESH P.
Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects.
Indian J.Orthop. 2008; 42 (2): 169-72.
- SALEMI C, ANDERSON D, FLORES D.
American Society of Anesthesiology scoring discrepancies affecting the National Nosocomial Infection Surveillance System: surgical-site-infection risk index rates.
Infect.Control Hosp.Epidemiol. 1997; 18 (4): 246–7.
- SAMSON M, LABBÉ O, MOLLEREAU C, VASSART G, PARMENTIER M.
Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene.
Biochemistry 1996; 35: 3362–3367.
- SAMPSON AP.
The role of eosinophils and neutrophils in inflammation.
Clin.Exp.Allergy 2000; 30 (Suppl 1): 22-7.

SANDSTEAD HH.

Zinc deficiency. A public health problem?

Am.J.Dis.Child. 1991; 145 (8): 853-9.

SCHALL TI, BACON K, CAMP RD, KASPARI JW, GOEDDEL DV.

Human macrophage inflammatory protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes.

J.Exp.Med. 1993; 1 (77): 1821-1826.

SCHMALZRIED TP, NOORDIN S, AMSTUTZ HC.

Update on nerve palsy associated with total hip replacement.

Clin.Orthop.Relat.Res. 1997; (344): 188-206.

SCHNAPER HW, GRANT DS, STETLER-STEVENSON WG, FRIDMAN R, D'ORAZI G, MURPHY AN, et al.

Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro.

J.Cell.Physiol. 1993 ; 156: 235-246.

SEEGMILLER JE, HOWELL RR, MALAWISTA SE.

The inflammatory reaction to sodium urate.

J.Am.Med.Assoc. 1962; 180: 125.

SEELY AJ, PASCUAL JL, CHRISTOU NV.

Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance.

Crit.Care 2003; 7 (4): 291-307.

SEITZ M, DEWALD B, GERBER N, BAGGIOLINI M.

Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis.

J.Clin.Invest. 1991; 87 (2): 463-9.

SELLAMI M, FRIKHA F, FOURATI H, EZZEDINE M, HDIJI N, ELLEUCH MH, et al.

Algodystrophy of the lower limbs during pregnancy.

Ann.Readapt.Med.Phys. 2006; 49 (4): 178-86.

SENGUPTA K, ARANDA-ESPINOZA H, SMITH L, JANMEY P, HAMMER D.

Spreading of neutrophils: from activation to migration.

Biophys.J. 2006; 91 (12): 4638-48.

SHETTY AA, SLACK R, TINDALL A, JAMES KD, RAND C.

Results of a hydroxyapatite-coated (Furlong) total hip replacement: a 13- to 15-year follow-up.

J.Bone.Joint.Surg.Br. 2005; 87 (8): 1050-4.

SHANBHAG AS, JACOBS JJ, BLACK J, GALANTE JO, GLANT TT. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area.

J.Biomed Mater.Res. 1994; 28 (1): 81-90.

SHANBHAG AS, JACOBS JJ, GLANT TT, GILBERT JL, BLACK J, GALANTE JO.

Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement.

J.Bone.Joint.Surg.Br. 1994; 76: 60-67.

SHANKAR AH, PRASAD AS.

Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection.

Am.J.Clin.Nutr. 1998; 68 (2 Suppl): 447S-463S

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.

SIERRA RJ, SCHLECK CD, CABANELA ME.
Dislocation of bipolar hemiarthroplasty: rate, contributing factors, and outcome.
Clin.Orthop.Relat.Res. 2006; 442: 230-8.

SIMS JE, GAYLE MA, SLACK JL, ALDERSON MR, BIRD TA, GIRI JG, et al.
Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1993; 90 (13): 6155-9.

SIWIK DA, CHANG DL, COLUCCI WS.
Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.
Circ.Res. 2000; 86: 1259-1265.

SOLOMONS NW.
Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity.
Nutr.Rev. 1998; 56 (1 Pt 1): 27-8.

SPRINGMAN EB, ANGLETON EL, BIRKEDAL-HANSEN H, VAN WART HE.
Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc-complex in latency and a 'cysteine switch' mechanism for activation.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1990; 87: 364-368.

STANDIFORD TJ, KUNKEL SL, LIEBLER JM, BURDICK MD, GILBERT AR, STRIETER RM.
Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 α from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4.
Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol. 1993; 9: 192-198.

STAUFFER RN.
Ten-year follow-up study of total hip replacement.
J.Bone Joint Surg.Am. 1982; 64 (7): 983-90.

STEFFENSEN B, WALLON UM, OVERALL CM.
Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen.
J.Biol.Chem. 1995; 270:11555-11566.

STEPHENSON PK, FREEMAN MA, REVELL PA, GERMAIN J, TUKE M, PIRIE CJ.
The effect of hydroxyapatite coating on ingrowth of bone into cavities in an implant.
J.Arthroplasty 1991; 6: 51-58.

STEVENSON FT, TORRANO F, LOCKSLEY RM, LOVETT DH.
Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms.
J.Cell Physiol. 1992; 152 (2): 223-31.

SUDA T, TAKAHASHI N, MARTIN TJ.
Modulation of osteoclast differentiation.
Endocr.Rev. 1992; 13 (1): 66-80.

SUKHOVA GK, SHI GP.
Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 2006; 1085: 161–169.

SUN L, BERNDT CC, GROSS KA, KUCUK A.
Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review.
J.Biomed.Mater.Res. 2001 ;58 (5): 570-92.

SUTTMANN H, LEHAN N, BÖHLE A, BRANDAU S.
Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis.
Infect.Immun. 2003; 71(8): 4647-56.

SVEHLA M, MORBERG P, ZICAT B, BRUCE W, SONNABEND D, WALSH WR.
Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures.
J.Biomed.Mater.Res. 2000; 51 (1): 15-22.

SVEHLA M, MORBERG P, BRUCE W, ZICAT B, WALSH WR.
The effect of substrate roughness and hydroxyapatite coating thickness on implant shear strength.
J.Arthroplasty. 2002; 17 (3): 304-11.

TAGGART CC, GREENE CM, CARROLL TP, O'NEILL SJ, MCELVANEY NG.
Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease.
Am.J.Respir.Crit.Care Med. 2005; 171 (10): 1070-6.

TAKEYAMA Y, OGINO K, SEGAWA H, KOBAYASHI H, UDA T, HOUBARA T.
Effects of zinc on production of active oxygen species by rat neutrophils.
Pharmacol.Toxicol. 1995; 76: 50–55.

TANAKA R, YASUNAGA Y, HISATOME T, YAMASAKI T, IWAMORI H, OCHI M.
Serum interleukin 8 levels correlate with synovial fluid levels in patients with aseptic loosening of hip prosthesis.
J.Arthroplasty. 2005; 20 (8): 1049-54.

TAUB DD, CONLON K, LLOYD AR, OPPENHEIM JJ, KELVIN DI.
Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β .
Science 1993; 260: 355-358

TAUB DD, SNAYER TJ, CARTER CRD, ORTALDO JR.
 α and β chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity.
J.Immunol. 1995; 155: 3877–3888.

TEDGUI A, MALLAT Z.
Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall.
Circ.Res. 2001; 88 (9): 877-87.

- TIKHONOV I, DOROSHENKO T, CHALY Y, SMOLNIKOVA V, PAUZA CD, VOITENOK N.
Down-regulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils upon activation of whole blood by *S. aureus* is mediated by TNF- α .
Clin.Exp.Immunol. 2001; 125 (3): 414-22.
- TOWLE CA, HUNG HH, BONASSAR LJ, TREADWELL BV, MANGHAM DC.
Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis.
Osteoarthritis Cartilage 1997; 5 (5): 293-300.
- TURK B, TURK V, AND TURK D.
Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors.
Biol.Chem. 1997; 378: 141–150.
- TURVEY SE, HAWN TR.
Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections.
Clin.Immunol. 2006; 120 (1): 1-9.
- TWINING SS.
Regulation of proteolytic activity in tissues.
Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol. 1994; 29: 315–383.
- UCHIDA A, ARAKI N, SHINTO Y, YOSHIKAWA H, KURISAKI E, ONO K.
The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery.
J.Bone Joint Surg.Br. 1990; 72 (2): 298-302.
- UGUCCIONI M, D'APUZZO M, LOESCHER M, DEWALD B, BAGGIOLINI M.
Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes.
Eur.J.Immunol. 1995; 25: 64–68
- VALLEE BL, FALCHUK KH.
The biochemical basis of zinc physiology.
Physiol Rev 1993; 73: 79–118.
- VAN HEEST A, SWIONTKOWSKI M.
Bone-graft substitutes.
Lancet 1999; 353 Suppl 1: S128-9.
- VELARD F, LAURENT-MAQUIN D, GUILLAUME C, BOUTHORS S, JALLOT E, NEDELEC JM, et al.
Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction.
Acta Biomater. 2009; 5 (5): 1708-15.
- VOLL RE, HERRMANN M, ROTH EA, STACH C, KALDEN JR, GIRKONTAITE I.
Immunosuppressive effects of apoptotic cells.
Nature 1997; 390 (6658): 350-1.
- VOLOSHIN I, GELINAS J, MALONEY MD, O'KEEFE RJ, BIGLIANI LU, BLAINE TA.
Proinflammatory cytokines and metalloproteases are expressed in the subacromial bursa in patients with rotator cuff disease.
Arthroscopy 2005; 21: 1076.

VON BÜLOW V, RINK L, HAASE H.

Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- α and IL-1 β production in monocytes by elevation of cGMP.

J.Immunol. 2005; 175: 4697–4705.

VON BÜLOW V, DUBBEN S, ENGELHARDT G, HEBEL S, PLÜMÄKERS B, HEINE H, et al.

Zinc-dependent suppression of TNF- α production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B.

J.Immunol. 2007; 179 (6): 4180-6.

VOOR MJ, ARTS JJ, KLEIN SA, WALSCHOT LH, VERDONSCHOT N, BUMA P.

Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model.

J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater. 2004; 71 (2): 398-407.

VU TH, WERB Z.

Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.

Genes Dev. 2000; 14 (17): 2123-33.

WAGNER JG, ROTH RA.

Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature.

Pharmacol.Rev. 2000; 52 (3): 349-74.

WALSH CT, SANDSTEAD HH, PRASAD AS, NEWBERNE PM, FRAKER PJ.

Zinc health effects and research priorities for the 1990's.

Environ.Health Perspect. 1994; 102: 5–46.

WANG K, ZHOU B, KUO YM, ZEMANSKY J, GITSCHIER J.

A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica.

Am.J.Hum.Genet. 2002; 71 (1): 66-73.

WAUGH DJ, WILSON C.

The interleukin-8 pathway in cancer.

Clin.Cancer.Res. 2008; 14 (21): 6735-41.

WEBB AC, COLLINS KL, AURON PE, EDDY RL, NAKAI H, BYERS MG et al.

Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2.

Lymphokine Res. 1986; 5 : 77-85.

WEBER KT, SUN Y, KATWA LC.

Local regulation of extracellular matrix structure.

Herz. 1995; 20 (2): 81-8.

WEEKS BS, SCHNAPER HW, HANDY M, HOLLOWAY E, KLEINMAN HK.

Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B).

J.Cell.Physiol. 1993; 157: 644–649.

WELGUS HG, CAMPBELL EJ, CURY JD, EISEN AZ, SENIOR RM, WILHELM SM, et al.

Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development.

J.Clin.Invest. 1990; 86: 1496–1502.

WELLINGHAUSEN N, SCHROMM AB, SEYDEL U, BRANDENBURG K, LUHM J, KIRCHNER H, et al.
Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide.
J.Immunol 1996; 157: 3139–3145.

WELLINGHAUSEN N, KIRCHNER H, RINK L.
The immunobiology of zinc.
Immunol.Today 1997; 18: 519–521.

WIEDOW O, MEYER-HOFFERT U.
Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation.
J.Intern.Med. 2005; 257 (4): 319-28.

WILLENBROCK F, CRABBE T, SLOCOMBE PM, SUTTON CW, DOCHERTY AJ, COCKETT MI, et al.
The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A.
Biochemistry 1993; 32 (16): 4330-7.

WIRTZ DC, NIETHARD FU.
Etiology, diagnosis and therapy of aseptic hip prosthesis loosening--a status assessment
Z.Orthop.Ihre Grenzgeb. 1997; 135 (4): 270-80.

WITTKAMPF AR.
Augmentation of the maxillary alveolar ridge with hydroxylapatite and fibrin glue.
J.Oral Maxillofac.Surg. 1988; 46 (11): 1019-21.

WOESSNER JF Jr.
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.
FASEB J. 1991; 5: 2145–2154.

WOOLEY PH, SCHWARZ EM.
Aseptic loosening.
Gene Ther. 2004; 11 (4): 402-7.

YAMAGUCHI M, INAMOTO K, SUKETA Y.
Effect of essential trace metals on bone metabolism in weanling rats: comparison with zinc and other metals' actions.
Res.Exp.Med 1986; 186 (5): 337–342.

YAMAGUCHI M, OISHI H, SUKETA Y.
Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture.
Biochem.Pharmacol 1987; 36 (22): 4007–4012.

YAMAGUCHI M, OISHI H, SUKETA Y.
Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-RNA synthetase.
Biochem.Pharmacol 1988; 37 (21): 4075–4080.

YOSHIDA H, HAYASHI S, KUNISADA T, OGAWA M, NISHIKAWA S, OKUMURA H, et al.
The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene.
Nature 1990; 345: 442-4.

ZALEWSKI PD.

Zinc and immunity: implications for growth, survival and function of lymphoid cells.

J.Nutr.Immunol. 1996; 4: 39–80.

ZARBOCK A, LEY K.

Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium.

Am.J.Pathol. 2008; 172 (1): 1-7.

ZHANG Y, ROM WN.

Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs.

Mol.Cell.Biol. 1993; 13: 831-837.

ZIEGLER SF, TOUGH TW, FRANKLIN TL, ARMITAGE RJ, ALDERSON MR.

Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7.

J.Immunol. 1991; 147: 2234–2239.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Abderrazzaq Belaaouaj and Patrice Laquerriere. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomater.* 2009 Jun;5(5):1708-15.

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Julien Braux, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Abderrazzaq Belaaouaj and Patrice Laquerriere. Effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils: potential modulatory role in bone implant-associated acute inflammation. *Soumis à Biomaterials*.

Julien Braux, **Frédéric Velard**, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Dominique Laurent-Maquin and Patrice Laquerriere. Effect of strontium on human primary bone cells culture: emphasize on ECM degradation. *En preparation pour soumission à Biomaterials*.

Emilie Buache, Emeline Bauden, **Frédéric Velard**, Christine Guillaume, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Dominique Laurent-Maquin and Patrice Laquerriere. Effect of strontium substituted hydroxyapatite on inflammatory mediators production by human monocytes. *En preparation pour soumission à Biomaterials*.

Louis Leheron, Christine Guillaume, **Frédéric Velard**, Julien Braux, Lhousseine Touqui, Isabelle Sermet-Gaudelus, Dominique Laurent-Maquin and Jacky Jacquot. Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function on expression of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone. *Soumis à Journal of Cystic Fibrosis*

COMMUNICATIONS ORALES

Frédéric Velard, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Abderrazzaq Belaaouaj, Patrice Laquerriere et Dominique Laurent-Maquin. Immuno-modulation de la réponse inflammatoire aiguë aux biomatériaux. ADF, Novembre 2009, Paris. (Acceptée)

Frédéric Velard, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Dominique Laurent-Maquin, Abderrazzaq Belaaouaj and Patrice Laquerriere. Modulatory Effect of Zinc on HA-mediated activation of Human Polymorphonuclear Neutrophils. 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Suisse. Septembre 2009.

Frédéric Velard, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Abderrazzaq Belaaouaj, Patrice Laquerriere et Dominique Laurent-Maquin. Effet du zinc sur la modulation de la réponse inflammatoire liée aux biomatériaux. 1^{ère} Journées Scientifiques de la Société Francophone des Biomateriaux Dentaires, Reims, France. Juin 2009.

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Abderrazzaq Belaaouaj et Patrice Laquerriere. Activation des Polynucléaires Neutrophiles humains par les particules d'hydroxyapatite. Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Nantes, France. Octobre 2008.

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Abderrazzaq Belaaouaj et Patrice Laquerriere. Activation des Polynucléaires Neutrophiles humains par les particules d'hydroxyapatite. Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, France. Juin 2008.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Christine Guillaume, Sylvie Bouthors, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Abderrazzaq Belaaouaj and Patrice Laquerriere. Zinc doped hydroxyapatite as immunomodulatory biomaterial. 36th annual meeting of European Society for Artificial Organs, Compiègne, France. Septembre 2009.

Frédéric Velard, Edouard Jallot, Jean-Marie Nedelec, Dominique Laurent-Maquin, Azzaq Belaaouaj, Patrice Laquerriere. Hydroxyapatite Particles-Induced Cytokine Release by Human Neutrophils. 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Pays-Bas. Mai 2008.

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Abderrazzaq Belaaouaj et Patrice Laquerriere. Effet du zinc sur la réponse des polynucléaires neutrophiles au contact d'hydroxyapatites. Journée de la Société de Biologie de Reims, France. Octobre 2007. 1^{er} prix Boehringer-Ingelheim.

Frédéric Velard, Dominique Laurent-Maquin, Abderrazzaq Belaaouaj et Patrice Laquerriere. Effet du zinc sur la réponse des polynucléaires neutrophiles au contact d'hydroxyapatites. Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, France. Juin 2007.

Etude de l'activation des polynucléaires neutrophiles humains en réponse aux particules d'hydroxyapatite et de sa modulation par le zinc : implications dans le contrôle de la réponse inflammatoire aiguë

RESUME :

Le descellement aseptique est la première cause d'échec des prothèses totales de hanche. L'hydroxyapatite (HA), biomatériau utilisé pour recouvrir les parties métalliques des implants, est pourvoyeur de débris. Ces derniers sont impliqués dans l'inflammation chronique observée lors de descellements aseptiques. Cependant, la phase inflammatoire aiguë liée aux biomatériaux, et notamment la réponse des polynucléaires humains (PMNs), cellules majoritaires de la phase inflammatoire précoce, aux particules d'hydroxyapatite n'est que très peu documentée. Notre travail a permis de démontrer que les particules d'HA avaient un potentiel activateur vis à vis des PMNs. Le contact entre les biomatériaux et ces cellules immunitaires entraîne une sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 α et IL-8) et chimioattractants (IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β) ainsi que de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9). Dans une seconde étude, nous avons démontré que l'utilisation d'une HA substituée en zinc permettait de moduler l'expression de l'IL-8 et la sécrétion de la MMP-9. Ces mécanismes semblent impliquer les récepteurs de l'IL-8 comme éléments majeurs de l'activation des PMNs suite au contact avec les particules d'HA.

L'ensemble de nos résultats fournit pour la première fois un mécanisme potentiel de la mise en place de la réponse inflammatoire aiguë aux biomatériaux.

MOTS CLES : Inflammation - Polynucléaires Neutrophiles - Cytokines - Hydroxyapatite - Biommatériaux - Métalloprotéases - Zinc.

COMPOSITION DU JURY :

Rapporteurs	Monsieur le Pr. Thierry MOREAU (Tours) Madame le Dr. Joëlle AMEDEC (Bordeaux)
Examineurs	Madame le Dr. Roselyne GARNOTEL (Reims) Madame le Pr. Dominique LAURENT-MAQUIN (Reims)
Directeurs de thèse	Monsieur le Pr. Patrice LAQUERRIERE (Strasbourg) Monsieur le Dr. Abderrazzaq BELAAOUAJ (Reims)

COORDONNEES DU LABORATOIRE :

Laboratoire Interfaces Biommatériaux Tissus-Hôtes (IBTH)
INSERM, UMR-S 926, IFR 53
1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, Cedex, France.