

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

Biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* des matériaux
céramiques. Pour quelles utilisations chez l'Homme !

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le Lundi 29 Octobre 2012

par

Pierre-Antoine FAYE

né le 16 Octobre 1985, à Saint Yrieix La Perche

EXAMINATEURS DE LA THESE

- M. le Professeur Alexis DESMOULIERE,
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.....Président
M. le Professeur Daniel HARTMANN,
Faculté de Pharmacie, Université de Lyon.....Membre du jury
M. le Docteur Bertrand LIAGRE,
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.....Membre du jury
M. le Docteur Aurélien BIGNON,
Directeur Recherche et Développement, MedicalGroup, Lyon...Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

Biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* des matériaux
céramiques. Pour quelles utilisations chez l'Homme !

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le Lundi 29 Octobre 2012

par

Pierre-Antoine FAYE

né le 16 Octobre 1985, à Saint Yrieix La Perche

EXAMINATEURS DE LA THESE

- M. le Professeur Alexis DESMOULIERE,
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.....Président
M. le Professeur Daniel HARTMANN,
Faculté de Pharmacie, Université de Lyon.....Membre du jury
M. le Docteur Bertrand LIAGRE,
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.....Membre du jury
M. le Docteur Aurélien BIGNON,
Directeur Recherche et Développement, MedicalGroup, Lyon...Membre invité

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

IMBERT Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
-----------------------	-----------------------------------

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Alexis DESMOULIÈRE

Je voudrais vous remercier pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de votre équipe. Je vous remercie pour votre confiance, votre rigueur, votre aide pertinente et précieuse tout au long de ce travail. Cette thèse a confirmé mon idée de poursuivre dans la voie de la recherche. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Benoit FUNALOT

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Je vous remercie pour vos conseils tout au long de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Daniel HARTMANN

Je voudrais vous remercier pour m'avoir fourni les poudres de céramique ainsi que pour votre accueil lors de mon passage à Lyon. Merci d'avoir accepté de juger cette thèse.

A Monsieur le Docteur Bertrand LIAGRE

Je suis très heureux que vous ayez accepté de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Aurélien BIGNON

Veuillez recevoir mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

A Monsieur le Docteur Ludovic MICALLEF

J'aimerais remercier Ludovic pour m'avoir fait l'honneur de me former. Tes phrases « cultes » et ta bonne humeur ont rythmé les journées. Merci pour ta grande disponibilité et ton aide.

A Monsieur le Docteur Serge BATTU

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour votre bonne humeur, votre disponibilité et vos précieux conseils. Ce fut un plaisir pour moi de travailler avec vous.

A Monsieur Fabrice ROSSIGNOL et Mademoiselle Malgorzata Anna PIECHOWIAK

Je voudrais vous remercier d'avoir pris de votre temps afin de pouvoir permettre une collaboration entre le laboratoire des Sciences des Procédés Céramiques et Traitement de Surface (SPCTS) et notre laboratoire. Merci de votre enthousiasme et de votre accueil.

A l'équipe de Pharmacie Galénique

Je tiens tout d'abord à remercier Mme le Professeur Dominique CHULIA pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que Mme le Docteur Marylène VIANA et Nathalie PECOUT.

A la fameuse équipe de doctorants

Merci Nicolas pour ta bonne humeur, tes précieux conseils et les coups de pouce sur certaines manip. Merci pour avoir pris de ton temps pour me faire participer à tes expériences. Merci Marcela pour ta bonne humeur. Merci Aurore pour tes conseils avisés.

A l'équipe du laboratoire Maintenance myélinique et neuropathies périphériques

Je n'oublie pas les bons moments passés avec le reste de l'équipe. Je tiens à remercier M le Docteur Fabrice BILLET, Mme Nelly BORDEAU, Mme Angélique NIZOU, Mme Laurence RICHARD et M le Docteur Yoann MOUSSEAU.

A l'équipe de physiologie médecine

Enfin je remercie Laurent BOTELLE, James JAVELAUD, qui m'ont tout de suite intégré et sans qui les pauses café n'auraient pas eu la même saveur.

A Sophie, ma famille et mes amis

Je remercie Hugo, Mo, Jimmy, Guillaume, Clara, JB, Sylvie et les autres, qui m'ont soutenu tout au long des études pharmaceutiques.

J'adresse un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et qui ont tout mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études. Merci à ma sœur, Anne-Cécile et son ami Loïc.

Merci à Sophie de m'avoir supporté pendant toutes ces années et d'avoir lu et relu cette thèse.

Liste des abréviations

2D : deux dimensions

3D : trois dimensions

Al₂O₃ : alumine

ATCC : American Type Culture Collection

AUFS : Absorbance Unit Full Scale (Absorbance en pleine échelle)

BCB : bleu de Coomassie brillant

CaO : oxyde de calcium ou chaux vive

CeO₂ : dioxyde de cérium

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DE : derme équivalent

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : diméthyl sulfoxyde

ECGF : Endothelial Cell Growth Factor

FD : fibroblaste dermique

FDA : food and drug administration

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

HBSS : Hank's balanced salt solution

HUVECs : human umbilical vein endothelial cells

IL : interleukine

j1 : jour 1

MEC : matrice extra-cellulaire

MET : microscopie électronique à transmission

MgO : oxyde de magnésium

MMP : matrix metalloproteinase

PA : principe actif

PBS : phosphate buffered saline

PFA : para-formaldéhyde

PMMA : polyméthylmethacrylate

PSZ : partially stabilized zirconia

qsp : quantité suffisante pour

rpm : rotation par minute

RT-PCR : reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SdFFF : sedimentation field flow fractionation

SDS : sodium dodecyl sulfate

SPCTS : Science des Procédés Céramique et Traitements de Surface

SVF : sérum de veau fœtal

TIMP : tissu inhibitor of metalloproteinase

TC : tissu conjonctif

TCP : phosphate tricalcique

TNF- α : tumor necrosis factor- α

Y₂O₃ : oxyde d'yttrium III

TZP : tetragone zirconia polycrystal

ZrO₂ : zircon

ZrO₂-Ce12 : zircon contenant 12 % de cérium

SOMMAIRE

Liste des abréviations

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Première Partie - Étude bibliographique

1. Anatomie et histologie de la peau humaine
 - 1.1. La peau
 - 1.2. Les fibroblastes
 - 1.3. Derme équivalent
2. Histologie des vaisseaux et structure du cordon ombilical
 - 2.1. Les veines
 - 2.2. Les artères
 - 2.3. Structure d'un cordon ombilical
 - 2.3.1. Entre 8 semaines et 3 mois
 - 2.3.2. A terme
 - 2.4. Les cellules endothéliales : HUVECs
3. La Céramique
 - 3.1. Généralités
 - 3.2. Utilisation de la céramique dans le domaine médicale
 - 3.2.1. Prothèses de première génération
 - 3.2.2. Prothèses de deuxième génération
 - 3.2.3. Prothèses de troisième génération
 - 3.2.4. Prothèses dentaires
 - 3.2.5. Chirurgie esthétique
 - 3.3. L'alumine
 - 3.4. La zircone-cérium
4. Méthode de tri cellulaire

- 4.1. Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'élution inertiel
- 4.2. Mise au point du matériel
- 4.3. Tri cellulaire par SdFFF
- 5. Observation des cellules
 - 5.1. La microscopie optique
 - 5.1.1. La microscopie à transmission
 - 5.1.2. La microscopie à fluorescence
 - 5.2. La microscopie électronique
- 6. Immunofluorescence
- 7. Pharmacocinétique
 - 7.1. Absorption
 - 7.2. Distribution
 - 7.3. Métabolisation
 - 7.4. Élimination
 - 7.5. Vecteur thérapeutique
 - 7.5.1. Vecteur de 1^{ère} génération
 - 7.5.2. Vecteur de 2^{ème} génération
 - 7.5.3. Vecteur de 3^{ème} génération
 - 7.5.4. Vecteur en céramique

Deuxième Partie - Études expérimentales

- 1. Matériel et méthodes
 - 1.1. Matériel
 - 1.2. Culture cellulaire
 - 1.2.1. Fibroblastes dermiques humains (FDs)
 - 1.2.2. Lignée de fibroblastes WI26
 - 1.2.3. Cellules endothéliales de cordon (HUVECs)
 - 1.2.4. Entretien cellulaire et ensemencement
 - 1.2.5. Comptage

- 1.3. Traitement par les poudres de céramique
- 1.4. Méthode de séparation
- 1.5. Coloration
- 1.6. Microscopie
 - 1.6.1. Microscopie confocale
 - 1.6.2. Microscopie électronique
- 1.7. Immunofluorescence
 - 1.7.1. Les cellules endothéliales
 - 1.7.2. Les fibroblastes
- 1.8. Migration cellulaire
- 1.9. Derme équivalent
 - 1.9.1. Le collagène
 - 1.9.2. Réalisation d'un derme équivalent
 - 1.9.3. Digestion du derme équivalent
- 1.10. Etude statistique
- 2. RESULTATS
 - 2.1. Fibroblastes FDs et WI26
 - 2.1.1. Traitement par les poudres de céramique
 - 2.1.2. Incorporation de la poudre de céramique dans les fibroblastes
 - 2.1.3. Coloration au BCB
 - 2.1.4. Microscopie
 - 2.1.5. Influence des poudres de céramiques sur l'organisation du cytosquelette
 - 2.1.6. Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire
 - 2.1.7. Poudres de céramique et derme équivalent
 - 2.2. Les cellules endothéliales : HUVECs
 - 2.2.1. Traitement par les poudres de céramique

2.2.2. Coloration

2.2.3. Microscopie confocale

2.2.4. Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire

3. DISCUSSION

4. Perspectives

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES TABLEAUX

SERMENT DE GALIEN

INTRODUCTION

Dans l'organisme, le tissu conjonctif fibreux joue le rôle de charpente pour les autres tissus. Le collagène de type I est la protéine majeure qui le compose. Les fibroblastes, cellules du tissu conjonctif, sont responsables de la biosynthèse du collagène. Diverses forces mécaniques comme l'étirement ou qui apparaissent à la suite de lésion tissulaire modifient les interactions entre les fibroblastes et la matrice de collagène. Dans certains cas, ces situations peuvent conduire au développement de différentes pathologies comme les fibroses (Miron-Mendoza et al., 2010).

La céramique est utilisée dans de nombreux domaines et notamment chez l'Homme pour de nombreuses applications médicales. Elle est utilisée en neurochirurgie, en ORL, en odontologie, en orthopédie mais aussi lors d'interventions esthétiques. Elle peut être aussi utilisée comme vecteur thérapeutique.

Les prothèses de hanche sont de plus en plus fabriquées en composite alumine-zircone et sont à l'origine de dépôts d'usure de ces céramiques. Des travaux ont donc été menés pour étudier l'impact de ces céramiques sur les cellules et leur environnement, notamment sur les fibroblastes (Roualdes et al., 2010). Ces études ont été réalisées en deux dimensions (2D). Lors de ce travail, la biocompatibilité de différentes céramiques a été étudiée en trois dimensions (3D).

En 2D, la culture et les expérimentations sont effectuées en monocouche. La propagation et la migration cellulaire sont décrites selon trois critères : la force cellulaire de protrusion, la force cellulaire de contraction et la force cellulaire d'adhésion (Miron-Mendoza et al., 2010). L'entretien cellulaire (amplification) est réalisé en monocouche. Par contre, pour les expérimentations en 3D, les cellules sont incluses dans un gel de collagène, ce qui leur confère un environnement tridimensionnel. Un des avantages de la 3D est que les fibroblastes reçoivent

classiquement des signaux physiques et chimiques mais subissent en plus les contraintes mécaniques de l'environnement, reproduisant plus fidèlement la situation *in vivo* (Amadeu et al., 2003).

Ainsi, dans cette étude, l'impact de poudres de céramique sur des cultures de fibroblastes en 3D a été abordée. Pour cela, des « dermes équivalents » (DEs) ont été réalisés. Les résultats obtenus nous ont dirigés vers l'utilisation d'une technique spécifique de séparation : le Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation (Sedimentation field flow fractionation, SdFFF). Cette technique permet, en conservant l'intégrité des cellules, de fractionner une population cellulaire totale en différentes fractions, en fonction de la densité et de la taille des cellules qui la composent. Cette technique a permis de mettre en évidence, lorsque nous utilisons des fibroblastes dermiques (FDs), une hétérogénéité d'incorporation de la poudre de céramique dans les cellules. Nous nous sommes donc tournés vers une lignée cellulaire où l'incorporation était plus homogène. De plus, de façon à comprendre comment les poudres de céramique interagissent avec les cellules environnantes lors de leur utilisation comme vecteur thérapeutique, nous nous sommes intéressés aux cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux et qui sont également plus fragiles que les fibroblastes.

Première Partie

Étude bibliographique

Dans cette partie, des notions générales concernant la peau, plus particulièrement le derme et son remodelage, mais aussi la structure du cordon ombilical, notamment les cellules composant la paroi de la veine et plus précisément les cellules endothéliales, seront exposées. Les différentes poudres de céramique, les techniques d'observations utilisées et la méthode de tri cellulaire par SdFFF seront également abordées.

1. ANATOMIE ET HISTOLOGIE DE LA PEAU HUMAINE

1.1. La peau

La peau est un organe composé de plusieurs couches de tissus qui sont, de la superficie vers la profondeur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme. C'est une enveloppe protectrice du corps. En regard de sa surface et de sa masse, elle est l'un des organes les plus importants. Elle représente environ 2 m² pour 5 kg chez l'adulte et son épaisseur varie de 1 mm au niveau des paupières à 4 mm sur la plante des pieds.

Les fonctions assurées par la peau sont nombreuses :

- barrière de protection physique et chimique ;
- perception, grâce à plusieurs types de récepteurs sensoriels ;
- thermorégulation corporelle, grâce notamment à la sécrétion de sueur...

Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement au derme. Le derme (Illustration 1, 2) est un tissu conjonctif (TC) vascularisé, contenant une matrice extracellulaire (MEC) particulièrement développée. Il contient plusieurs types cellulaires, notamment des mastocytes, des macrophages, et enfin les fibroblastes, cellules majoritaires au sein de ce tissu.

On distingue usuellement le derme papillaire proche de la jonction dermo-épidermique, le derme réticulaire et le derme profond.

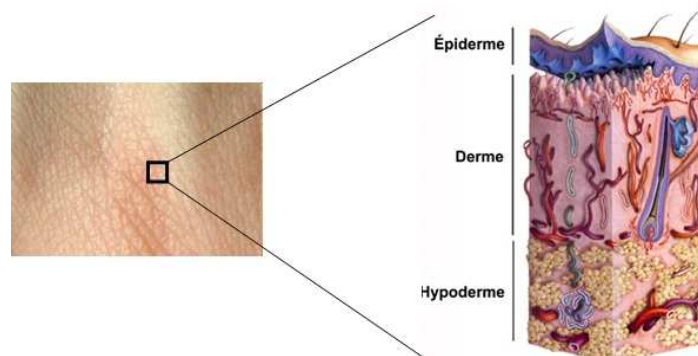
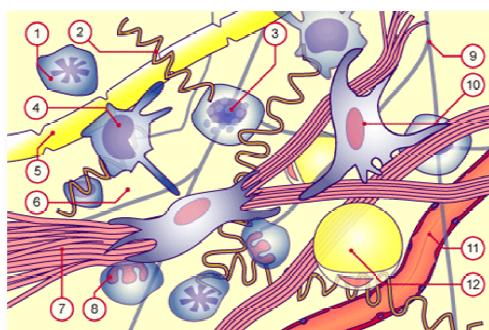


Illustration 1 : Coupe histologique de peau (www.lampe-collagene.com)

La surface du derme est irrégulière et présente de nombreux plis, les papilles dermiques. Elles s'imbriquent avec des projections épidermiques, les crêtes épidermiques. Ces papilles qui augmentent la surface de contact et d'échange entre le derme et l'épiderme, renforcent également la jonction dermo-épidermique de la peau qui est régulièrement soumise à différentes agressions mécaniques.

Le derme papillaire qui est proche de la jonction dermo-épidermique est un TC lâche constitué essentiellement de fibroblastes (Illustration 2). Le derme réticulaire constitue la partie la plus profonde et la plus épaisse. C'est un TC dense et irrégulier. Il est composé de collagène type I, de glycosaminoglycane, d'élastine, mais contient peu de cellules.

Le derme contient un important réseau vasculaire et lymphatique, des glandes, des follicules pileux et l'innervation est importante (Illustration 2).



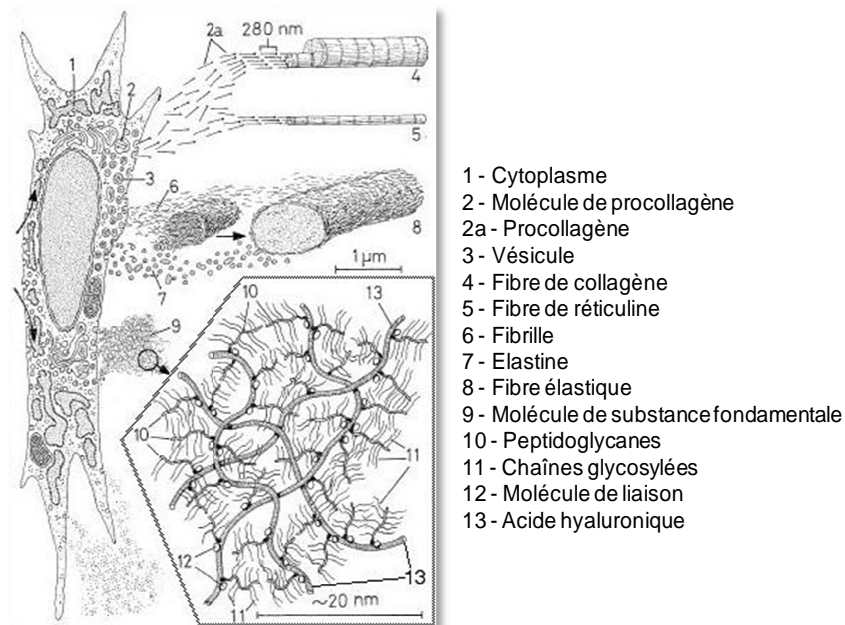
- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. Plasmocyte | 7. Microfibrilles de collagènes |
| 2. Fibrilles élastiques | 8. Granulocyte neutrophile |
| 3. Mastocyte | 9. Fibres de réticuline |
| 4. Macrophage | 10. Fibroblaste |
| 5. Fibre nerveuse | 11. Capillaire avec les cellules endothéliales |
| 6. Substance fondamentale amorphe | 12. Adipocyte |

Illustration 2 : Tissu conjonctif

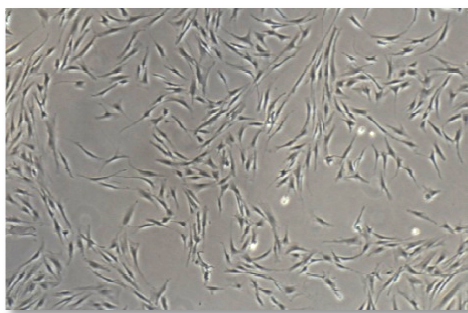
(<http://associationpourlasanteetlenvironnement.skynetblogs.be>)

1.2. Les fibroblastes

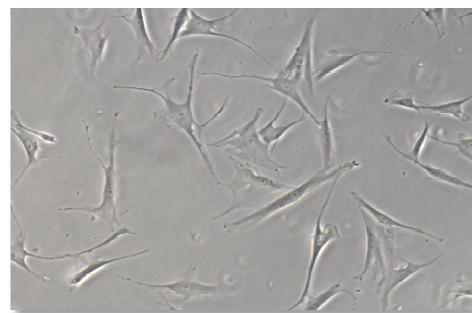
Les fibroblastes (Illustration 3), cellules principales des TC, synthétisent les précurseurs de la substance intercellulaire (fibres et substance fondamentale amorphe). Ils dérivent des cellules mésenchymateuses. Leur forme est étoilée ou fusiforme (Illustration 4) avec de nombreux prolongements. Un fibroblaste atteint entre 20 à 30 μm de longueur pour 5 à 10 μm de largeur. Leur cytoplasme est basophile. On retrouve une chromatine fine et des nucléoles évidents.



*Illustration 3 : Fibroblaste et produits de synthèses
(<http://associationpourlasanteetlenvironnement.html>)*



A



B

Illustration 4 : Fibroblastes en culture dans un milieu complet en microscopie à contraste de phase (A=x4 / B=x10)

Lors des processus de remodelage matriciel, les fibroblastes sont capables de dégrader le collagène et l'élastine en sécrétant des collagénases et des élastases. Parmi les enzymes responsables de cette dégradation, on trouve les métalloprotéinases (MMPs). Les MMPs ont un rôle central dans le remodelage des tissus tant sur le plan physiologique, développement embryonnaire ou turn-over du collagène, que sur le plan pathologique, comme par exemple, dans le maintien des plaies chroniques (Desmoulière et al., 2005).

Au sein de la matrice extracellulaire, il existe un équilibre entre les MMPs et les TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs). Les TIMPs, inhibiteurs spécifiques de haute affinité, sont intrinsèquement liés aux MMPs. Quand une cellule migre, elle synthétise des MMPs qui vont lyser la matrice de collagène et également permettre la libération des MMPs liées aux TIMPs. Une fois la migration terminée, les TIMPs vont inactiver les MMPs et ainsi, la matrice ne sera plus dégradée.

La balance TIMPs/MMPs intervient dans de nombreux processus pathologiques ; un excès de MMPs conduit à la lyse tissulaire, à la mise en place des processus d'apoptose ou encore à la formation de métastases. Dans le cas d'un excès de TIMPs, il peut y avoir une accumulation de MEC, induisant une cicatrisation excessive ou une fibrose (Amadeu et al., 2003).

1.3. Derme équivalent

Afin de se rapprocher du comportement des fibroblastes *in vivo*, l'équivalent d'un derme humain ou DE a été mis au point dans le laboratoire. Ce modèle s'inspire des travaux de B Coulomb (Coulomb et al., 1989). Dans ce modèle, le derme consiste en une matrice de collagène dans laquelle des fibroblastes sont inclus.

2. HISTOLOGIE DES VAISSEAUX ET STRUCTURE DU CORDON OMBILICAL

Nous allons ici proposer quelques rappels sur l'histologie des vaisseaux et la structure du cordon ombilical car, nous avons utilisé des cordons ombilicaux pour isoler des cellules endothéliales dites de cordon et qui sont alors couramment appelées « human umbilical vein endothelial cells » ou HUVECs. Le système sanguin est composé de deux types principaux de vaisseaux, les veines et les artères. Chaque type ayant des fonctions différentes, sa structure histologique sera différente.

2.1. Les veines

Elles sont organisées en 3 couches. De la couche la plus interne à la couche la plus externe, on trouve : l'intima, la média et l'adventice.

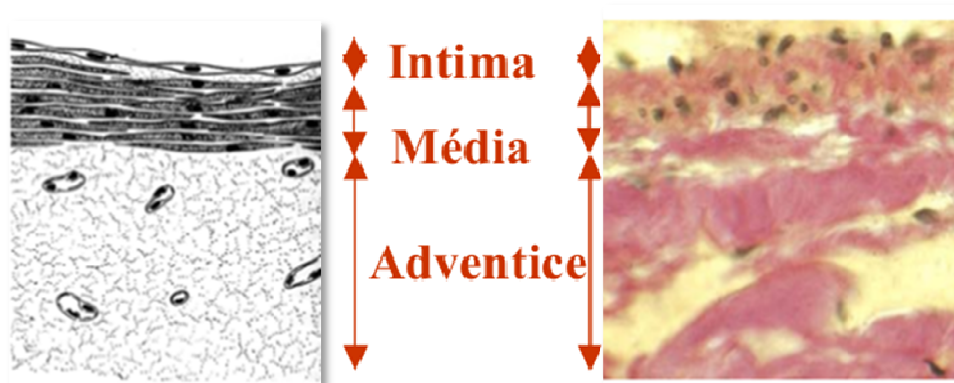


Illustration 5 : Coupe histologique (coloration hématoxyline-éosine) et schéma d'une veine (<http://www.snv.jussieu.fr>)

Les veines conduisent le sang depuis les réseaux capillaires jusqu'au cœur ; il s'agit donc de sang pauvre en oxygène. De plus, ces vaisseaux sont soumis à une pression artérielle relativement basse ; ainsi, leur paroi, notamment la média, est fine avec peu de cellules musculaires lisses présentant une activité contractile modeste. C'est dans l'intima

qu'on retrouve les cellules endothéliales qui ont été utilisées dans notre travail.

2.2. Les artères

De la même façon, elles sont organisées en trois couches.

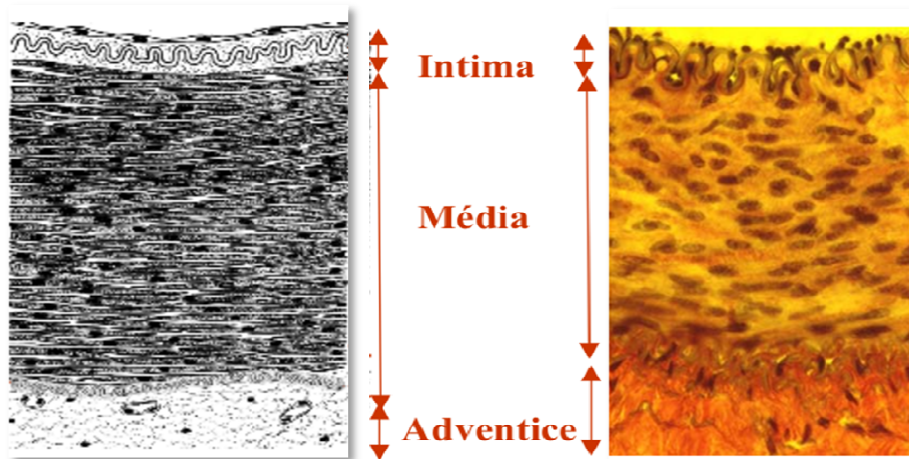


Illustration 6 : Coupe et schéma d'une artère (<http://www.snv.jussieu.fr>)

Les artères conduisent le sang depuis le cœur vers les réseaux capillaires. Il s'agit donc de sang oxygéné.

Compte tenu de l'organisation de leur média, on peut décrire essentiellement deux catégories d'artères aux propriétés et aux rôles bien différents :

- *les artères élastiques* qui présentent, dans leur média, d'importantes lames concentriques d'élastine (sécrétée par les cellules musculaires lisses) ; ces lames élastiques permettent de « stocker » l'énergie développée par la contraction du ventricule gauche lors de la systole ;

- *les artères musculaires* qui possèdent de nombreuses couches circulaires de cellules musculaires lisses présentant d'importantes propriétés contractiles.

2.3. Structure d'un cordon ombilical

2.3.1. Entre 8 semaines et 3 mois

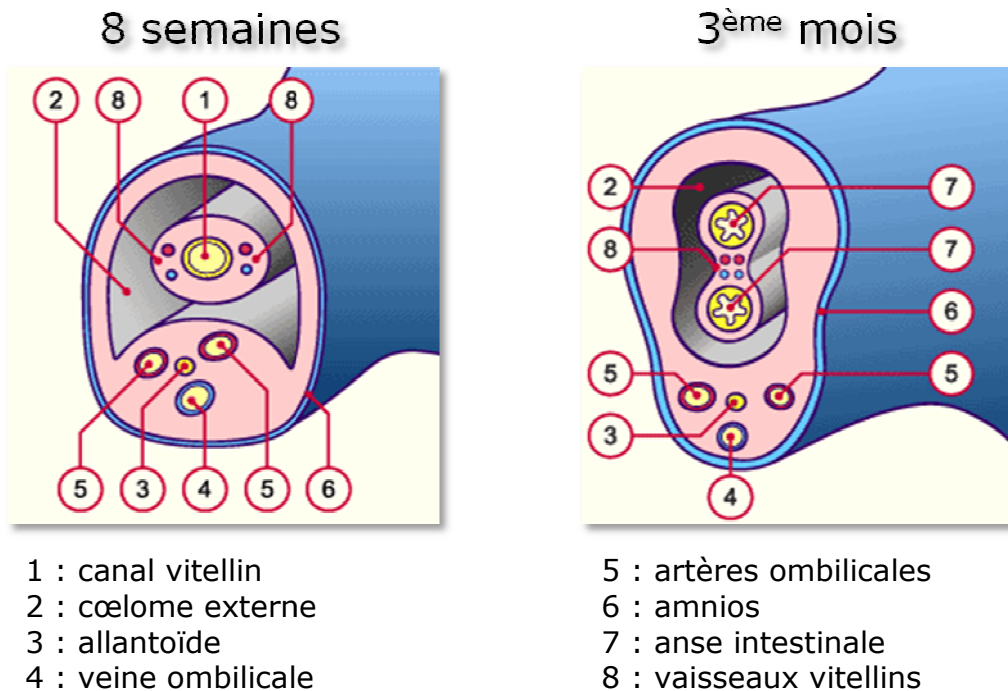


Illustration 7 : Comparatif des structures présentes dans deux cordons, un à 8 semaines, l'autre à 3 mois (www.embryology.ch)

Le cordon ombilical se présente sous la forme d'un anneau très large et court à la huitième semaine environ. Il comprend :

- le pédicule vitellin avec le canal vitellin qui réunit l'intestin primitif avec la vésicule ombilicale et les vaisseaux vitellins. La vésicule ombilicale proprement dite est située dans la cavité chorale.

- le pédicule embryonnaire avec l'allantoïde et les vaisseaux ombilicaux (2 artères et 1 veine). Ce pédicule embryonnaire passera en position ventrale au cours du développement et va finalement fusionner avec le pédicule vitellin.

- le cœlome ombilical qui fait communiquer le cœlome extra-embryonnaire et le cœlome intra-embryonnaire.

L'évolution va favoriser l'allongement et la réduction des structures. La cavité amniotique forme une gaine de plus en plus longue au niveau du pédicule embryonnaire vitellin, le cordon nouvellement formé continue à s'allonger et forme des sinuosités dans la cavité amniotique. De nombreux éléments dégénèrent au 3^{ème} mois, comme le canal vitellin, qui peut persister sous la forme du diverticule de Meckel ou encore l'allantoïde qui s'oblitére pour former le ligament ombilical médian chez l'adulte. En outre, les communications inter-cœlomiques se collabent et se résorbent.

2.3.2. A terme

Après l'accouchement, une étude histologique du cordon permet de constater que certaines structures, comme mentionnée plus haut, ont régressées et que l'on ne va plus trouver dans le pédicule embryonnaire que les vaisseaux ombilicaux, deux artères et une veine. Le tissu conjonctif du cordon est à l'origine de la gelée de Wharton qui va protéger les vaisseaux des contraintes mécaniques qui peuvent se développer pendant la grossesse. Cette gelée est précieuse car il a assez récemment été montré qu'elle contient de nombreuses cellules souches (Kim et al., 2011). D'ailleurs, nous pouvons noter que le sang de cordon ombilical est également très précieux dans la mesure où il renferme également de nombreuses cellules souches hématopoïétiques (Al Battah et al., 2011).

2.4. Les cellules endothéliales : HUVECs

Les cellules endothéliales tapissent la paroi des vaisseaux sanguins et lymphatiques constituant un épithélium pavimenteux simple qui est donc propice aux échanges, gazeux (O₂, CO₂), liquidiens et métaboliques. Normalement, leur taux de renouvellement est relativement lent, évalué d'environ 6 mois à 1 an. Dans certaines circonstances particulières, ce taux

est augmenté, et notamment lors d'agression de l'endothélium par des facteurs mécaniques, chimiques, infectieux ou encore immunologiques.

En microscopie optique, une cellule endothéliale est une cellule allongée pavimenteuse avec un noyau qui fait sailli dans la lumière. Elle mesure 50 μm de long et 10 μm de large avec le grand axe parallèle au courant sanguin. Une membrane basale sépare les cellules du tissu conjonctif sous-jacent.

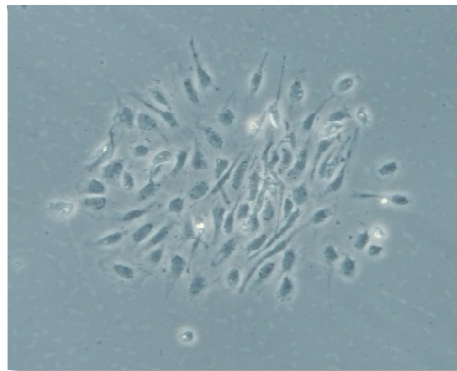


Illustration 8 : Cellules endothéliales obtenues à partir d'un cordon ombilical après 48 heures de culture observées en microscopie à contraste de phase

Les HUVECs sont des cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical. Elles ont donc les caractéristiques de cellules endothéliales de type veineux. Elles expriment des marqueurs caractéristiques veineux tels que COUPTFII, EpHB4 et Nrp2. Ces marqueurs ne sont pas exprimés par les cellules endothéliales issues de l'artère de cordon ombilical. Elles expriment par ailleurs l'ensemble des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, dont les antigènes de surface CD31, CD144 et KDR, ainsi que le facteur vWF, exprimé de manière intracytoplasmique.

Elles constituent un outil important, par exemple dans les études :

- d'angiogenèse ;
- des mécanismes de l'inflammation et de l'immunité ;
- sur l'athérosclérose ;
- sur le développement des tumeurs ;
- en pharmacologie.

3. LA CERAMIQUE

3.1. Généralités

La céramique est le premier « art du feu » à apparaître, bien avant la métallurgie et le travail du verre. La céramique désigne l'ensemble des objets fabriqués en terre qui ont subi une transformation physico-chimique irréversible au cours d'une cuisson à température élevée. Les objets en céramique sont réalisés par solidification à haute température d'une pâte humide plastique, ou agglutination par chauffage (frittage) d'une poudre sèche préalablement comprimée, sans passer par une phase liquide. Par extension, on désigne sous le terme « céramique » les objets eux-mêmes ainsi fabriqués. Les principales propriétés de ces céramiques sont la solidité, la résistance à la chaleur et la résistance à l'usure. De ces propriétés vont découler de multiples applications.

Elles sont divisées en trois branches :

- la céramique utilitaire, la plus ancienne des formes de céramique, retrouvé dans le domaine des transports, de l'environnement ou de l'aéronautique ;

- la céramique d'art qui est dérivée de la précédente, et délaisse la fonction utilitaire pour se centrer sur la valeur décorative ou esthétique. La porcelaine, spécialité de Limoges, est une céramique fine produite à partir du kaolin par cuisson à plus de 1200°C ;

- la céramique industrielle et technique, particulièrement développée au XX^{ème} siècle, utilise des matériaux à base d'oxydes, de carbures, de nitrures, etc. Ce sont les céramiques techniques dotées de nouvelles propriétés (tenue à très haute température, tribologie, conductivité, etc). Elles se rencontrent dans les applications médicales, sanitaires ou industrielles (Gutwein et al., 2004).

3.2. Utilisation de la céramique dans le domaine médicale

Les biocéramiques représentent un atout précieux pour la médecine. Leur neutralité chimique et leur composition, voisines de celles des tissus osseux, permettent aux céramiques de conserver leurs propriétés une fois implantées dans l'organisme et ainsi d'éviter les rejets. Leur résistance à la torsion et au frottement permettent d'obtenir des prothèses quasiment inusables.

Les applications concernent principalement la chirurgie orthopédique (articulations artificielles, couche bioactive pour une meilleure ostéointégration...), la chirurgie dentaire (couronnes, bridges, tenons, bagues parodontales, implants...), les connectiques médicaux (passage étanche pour pacemakers, défibrillateurs, stimulateurs neurologiques, implants cochléaires,...), mais aussi la chirurgie esthétique avec le comblement des rides. Dans un certain nombre de cas, les matériaux céramiques viennent en remplacement d'alliages métalliques dont l'utilisation induit des problèmes environnementaux et de santé publique liés à leur toxicité (alliage chrome/cobalt, amalgame plomb/mercure/étain...) (Ratner et al., 2004).

3.2.1. Prothèses de première génération

Il est important de comprendre comment est élaborée une céramique technique et plus particulièrement, une prothèse de hanche. L'obtention de poudre de céramique se fait à partir de la vaporisation du minerai, addition d'un gaz puis refroidissement de ce gaz de manière à obtenir une granulométrie déterminée. Une fois la poudre obtenue, elle est soit coulée en barbotine (mélange eau / poudre de céramique), soit comprimée à forte pression (Illustration 9). En ce qui concerne les prothèses de hanche, la poudre est comprimée à forte pression.

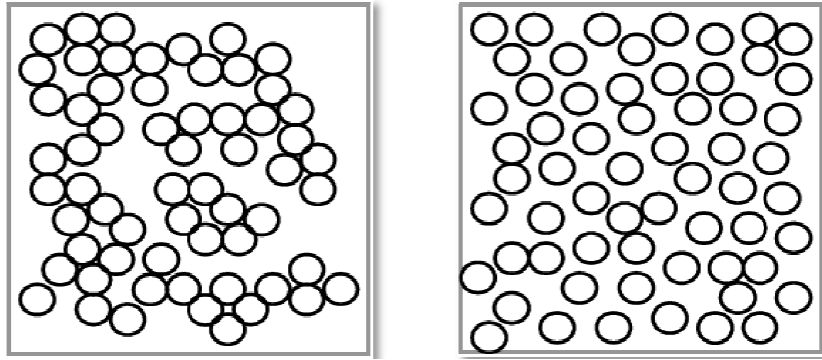


Illustration 9 : Représentation schématique de l'état d'empilement des particules de céramique pressés (à gauche) et coulés (à droite), présentant la même densité (même nombre de particule, même volume)

La poudre est alors frittée, c'est-à-dire qu'une température de l'ordre de 1400, 1500 °C est appliquée de manière à agglomérer les grains. De cette étape cruciale dépendra les propriétés de la céramique. Pour parfaire la cohésion, une phase de cuisson sous pression est appliquée. La pièce est ensuite usinée et polie.

Les prothèses de hanche classiques de première génération sont les prothèses totales de hanche dites « à tige fémorale », cimentées. Classiquement, elles se composent d'une tige posée dans le fémur et d'une partie se fixant en miroir du côté du bassin ; une pièce intermédiaire relie ces 2 composants pour permettre leur articulation. Les prothèses totales de hanche sont fixées, dans ce cas, à l'aide d'un ciment biologique.

Le risque principal est la survenue potentielle de descellements plusieurs années après la pose, imposant ainsi de remplacer la prothèse totale de hanche. Cette reprise chirurgicale constitue parfois une opération longue et délicate. C'est pourquoi ces prothèses totales de hanche cimentées tendent à être remplacées par les prothèses totales de hanche non cimentées dites « à revêtement » ou de deuxième génération (Institut de la hanche).

Les premières prothèses de hanche en céramique étaient à base d'alumine (Al_2O_3). Ce matériau est actuellement concurrencé par la zircone (ZrO_2) qui présente une tolérance biologique similaire, mais de meilleures propriétés mécaniques, permettant d'envisager la mise au point d'éléments

beaucoup plus petits demandant une grande fiabilité (prothèses du doigt, de l'épaule, du genou). A ce jour, plusieurs centaines de milliers de têtes de fémurs en zircone ont été implantées avec succès sur des patients en Europe et aux Etats-Unis.

3.2.2. Prothèses de deuxième génération

Les prothèses totales de hanches de deuxième génération sont les prothèses totales de hanches « à tige fémorale », non cimentées ou à revêtement. Elles sont dites « non cimentées » car pour les fixer dans le cotyle et le fémur, un ciment biologique n'est pas utile. Elles sont recouvertes par un revêtement particulier pour qu'elles puissent tenir. Ce revêtement a les caractéristiques biologiques mais aussi mécaniques du tissu osseux (Institut de la hanche).

Aujourd'hui, on utilise des céramiques dont la composition chimique est encore mieux adaptée : les prothèses se composent de phosphate de calcium, hydroxyapatite, utilisé en raison de sa composition chimique quasi identique à celle de l'os. L'hydroxyapatite s'intègre donc parfaitement dans un environnement osseux. Cela justifie son utilisation comme revêtement sur les parties métalliques des prothèses (hanches, genoux).

Ces revêtements sont réalisés par projection plasma sur la surface métallique de façon à obtenir une surface microporeuse. Ce revêtement va être de ce fait « envahi » par l'os qui entoure la prothèse, favorisant la repousse osseuse, et évitant ainsi tout risque de rejet avec des taux de réussite de plus de 90% après dix années de mise en place. (Pôle européen de la céramique).

Pour les greffes de plus petite taille, on a recours également à l'hydroxyapatite, mais la relative fragilité de ce matériau en limite l'utilisation à des zones peu sollicitées mécaniquement (réparation maxillo-faciale notamment, ou bien prothèses oculaires).

Les prothèses de hanche actuellement commercialisées ont une longévité de plus en plus importante et qui peut aujourd’hui dépasser 15 ans. Il est donc nécessaire d’en maîtriser le vieillissement mais aussi l’usure en limitant la quantité de débris produits et relargués dans l’organisme mais aussi en limitant la toxicité propre de ces débris. Ceux-ci sont aujourd’hui identifiés comme étant un élément majeur initiant les processus d’ostéolyse péri-prothétique pouvant conduire à terme au descellement des prothèses. L’une des stratégies possibles pour réduire ces débris d’usure est de diminuer les aspérités de surface des matériaux en frottement, notamment en réduisant la taille des particules constitutives dans le cas des céramiques. La production de débris d’usure sur différents couples de matériaux utilisés pour la fabrication de prothèses de hanche est schématisée par l’Illustration 10. L’utilisation de céramique a permis de baisser considérablement le volume de ces débris d’usure par rapport aux couples métal/métal ou métal/polyéthylène. Ceci est d’autant plus vrai que ces céramiques sont élaborées à partir de particules nanométriques. Cependant, l’utilisation de particules aussi fines est totalement nouvelle et il est possible que cela conduise à des mécanismes de toxicité jusqu’alors inconnus avec ces mêmes matériaux. (Roualdes, 2009).



Illustration 10 : Comparaison schématique de la production annuelle en débris d’usure pour une année d’utilisation dans des conditions normales

3.2.3. Prothèses de troisième génération

Les prothèses de hanche de resurfaçage, ou de troisième génération, sont posées depuis le début des années 1990 avec des résultats parfaitement établis. Ces prothèses s'adressent aux patients jeunes et actifs. Elles entraînent une moindre destruction de l'os, et les chances de luxation sont considérablement réduites ainsi que les risques de descellement précoce. Elles se caractérisent par des suites opératoires simplifiées et nettement moins douloureuses avec la possibilité de marcher avec un appui complet très rapidement après l'intervention (Institut de la hanche).

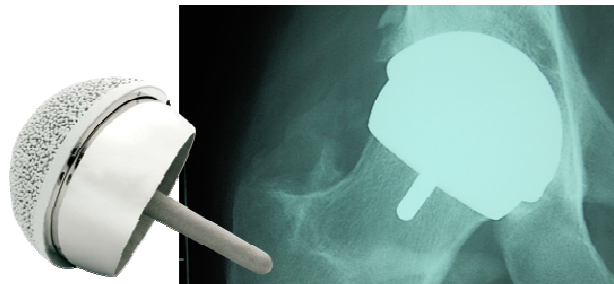


Illustration 11 : Prothèse de resurfaçage (<http://www.chirurgie-orthopedique-toulouse.fr/>)

3.2.4. Prothèses dentaires

Bien qu'utilisées depuis le début des années 60 dans le domaine des prothèses dentaires, les céramiques ont connu leur véritable essor dans la fin des années 70. Elles constituent aujourd'hui une classe de matériaux incontournables dans le domaine odontologique du fait de leur excellente qualité esthétique associée à une parfaite inertie chimique.

Dans cet objectif, sont apparues sur le marché trois grandes familles de matériaux :

- les verres ;
- les vitrocéramiques ;
- les zircons, les alumines ainsi que leurs dérivés.

Bien que ne représentant au niveau mondial que quelques dizaines de tonnes de matériaux par an, les céramiques à usage dentaire sont

quotidiennement utilisées dans plusieurs dizaines de milliers de laboratoires de prothèses, environ 5000 en France. Compte tenu des problèmes croissants liés à l'utilisation des métaux en bouche (bimétallisme, corrosion métallique, allergie, ...), un accroissement de la recherche dans le domaine des matériaux céramiques en vue de remplacer totalement le métal en bouche est de nature à améliorer de façon significative la santé publique.

Pour les défenseurs de l'amalgame, les quantités de mercure libérées seraient trop faibles pour générer des troubles de santé. Cependant, une étude menée à l'Université de Calgary remet en question l'innocuité du mercure à faibles doses (Leong et al., 2001). L'équipe de CC Leong a démontré que de faibles concentrations de mercure sont capables d'inhiber la fixation du GTP sur des brins de tubuline et ainsi d'empêcher sa polymérisation en microtubules, ce qui rendrait les cellules cérébrales inefficaces (Illustration 12).

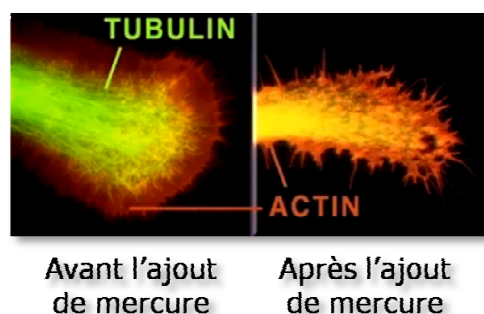


Illustration 12 : Terminaison nerveuse (neurone de rat) avant ou après l'ajout de mercure

Cet article montre comment le mercure, même à faible dose, est capable d'endommager les connexions nerveuses et peut créer des dommages cérébraux, à l'origine des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Les organismes en croissance, comme les enfants ou les fœtus contaminés par le passage du mercure à travers le placenta, seraient les plus exposés selon la FDA (Food and Drug Administration).

3.2.5. Chirurgie esthétique

Par définition, les rides sont des cassures cutanées dues à un affaissement des structures dermiques provoqué par la disparition progressive du collagène et de l'élastine. Le collagène est ce qui donne son volume, sa souplesse et sa fermeté à la peau jeune et saine. Le collagène commence à se décomposer au cours du vieillissement, ce qui entraîne une perte de volume du visage. De plus, la dégradation de l'élastine conduit à une perte d'élasticité de la peau. L'apparition de rides, de sillons faciaux et d'une laxité cutanée résultent de ces deux processus.

Un des traitements possible est l'injection de produit comblant. Comme le montre ce tableau (Tableau 1), les différents produits sont classés en fonction de leur dégradation. Les céramiques commencent à émerger dans ce domaine. Elles proposent de rétablir le volume, de restaurer le collagène et de retrouver un teint frais, mais des études scientifiques et cliniques sérieuses sont encore dans ce domaine bien sûr nécessaires (Pons-Guiraud, 2009).

Produits dégradables (6-18 mois)	Produits dégradables lents (2-3 ans)	Produits non dégradables
<p>COLLAGENES</p> <ul style="list-style-type: none"> • ORIGINE ANIMALE <p>Zydcem®, Zyplast® Evolence® (porcine)</p> <ul style="list-style-type: none"> • ORIGINE HUMAINE <p>Cosmoderm® Cosmoplast®</p> <p>ACIDES HYALURONIQUES</p> <p>1. RIDES ET SILLONS</p> <ul style="list-style-type: none"> • ORIGINE ANIMALE <p>Hylaform® Plus – Fine Line</p> <ul style="list-style-type: none"> • ORIGINE NON ANIMALE (biotechnologique) <p>Restylane® Perlane® Vital® Touch® Lipp Surgiderm® 18 - 30 - 24XP 30 XP - Lipps Juvederm® 18-24-30HV Hydrafill® 1.2.3. Softline – Softline max Rofilan® Matridur® Matrigel® Técosyal® Global Dccp - Kiss Esthelis® Basic – Men - Soft Visagel® Puragen® Coilingel® Isogel® 1.2 Varioderm® Idunc® 8 12 - 20</p> <p>2. RESTAURATION DES VOLUMES</p> <p>SubQ® Voluma® Ultra Dccp® Isogel® 3</p> <p>ALCOOL POLYVINYLIQUE</p> <p>Bioinbluc®</p> <p>CARBOXYMETHYL CELLULOSE/ POLYETHYLENEOXIDE</p> <p>Laresse®</p> <p>AGAROSE</p> <p>Easy-Agarose®</p>	<p>AUTRES ACIDES HYALURONIQUES</p> <p>Matridex® (+ dextran) Lastingel® (+ dextran) Reviderm® (+ dextran)</p> <p>POLYACRYLAMIDE</p> <p>Outline® (suspendu)</p> <p>ACIDE POLYLACTIQUE</p> <p>New-Fill® Sculptra®</p> <p>HYDROXYAPATITE de CALCIUM</p> <p>Radiesse®</p> <p>TRIPHOSPHATE de CALCIUM</p> <p>Atlean®</p>	<p>POLYMETHYLMETACRYLATE (+ collagène)</p> <p>Artecoll®</p> <p>HYDROGELS ACRYLIQUES (+ acide hyaluronique)</p> <p>Dermalive® Dermadeep Novasoft®</p> <p>GELS DE POLYACRYLAMIDE</p> <p>Evolution® Aquamid® Amazingel®</p> <p>ALKYLIMIDES</p> <p>Bio-alcamid®</p> <p>DIMETHYLSILOXANE</p> <p>Bioplastique®</p>

Tableau 1 : Produits utilisés en chirurgie esthétique (d'après Annik Pons-Guiraud)

Dans ce tableau, deux produits à dégradation lente sont mis en avant, le RADIESSE®, hydroxyapatite de calcium, et l'ATLEAN®, triphosphate de calcium.

Au moment de l'injection, l'agent de remplissage volumisant, RADIESSE® ou ATLEAN®, vise à procurer immédiatement le volume et le redrapage nécessaires pour atténuer les signes de vieillissement, grâce aux microsphères à base de calcium et au gel dont il est composé. Ces produits serviraient de charpente sous la peau, procurant une structure et stimulant la production de collagène par le patient. Ce processus se poursuit pendant plusieurs mois, ce qui prolonge l'effet initial de RADIESSE® ou d'ATLEAN®.

Concernant RADIESSE®, la demi-vie est d'environ 12 mois, la tenue, plus ou moins connue, est de deux ans environ. La dégradation des billes de céramique se fait par les macrophages (Illustration 13). Le recul concernant l'utilisation de ce produit est faible et donc les effets secondaires ne sont pas encore connus.

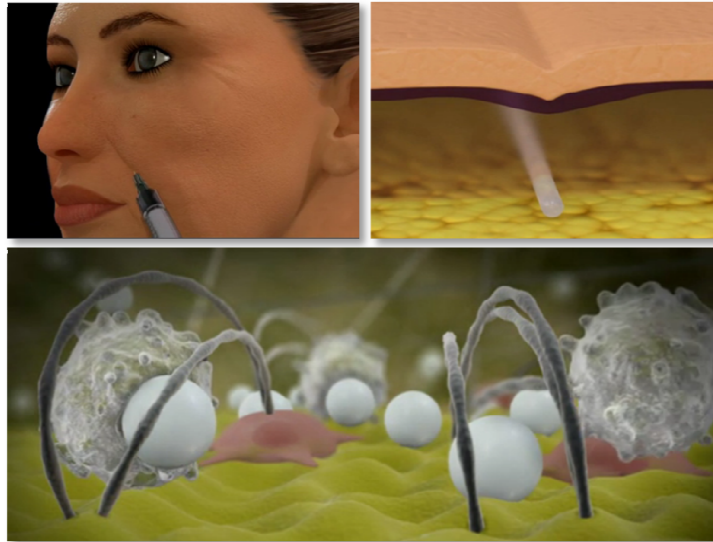


Illustration 13 : Injection de RADIESSE® (microbilles de céramique contenues dans un gel de carboxyméthyl cellulose sodique) (www.radiesse.com)



Illustration 14 : Avant et après injection de RADIESSE® (www.radiesse.com)

ATLEAN® a une demi-vie plus courte, d'environ 10 mois. Là encore, le recul concernant l'utilisation de ce produit est faible et donc les effets secondaires ne sont pas encore connus.

Dans ce travail deux types de céramiques ont été utilisés, l'alumine et la zircone-cérium.

3.3. L'alumine

L'alumine (Al_2O_3), présente une très bonne compatibilité biologique aussi bien sous forme massive que sous forme de particules. Elle a été introduite par Boutin en 1970 (Boutin, 1972). Depuis 1987, on retrouve de très nombreuses études *in vitro* (Grey et al., 1993) et *in vivo* (Hulbert et al., 1972 ; Christel et al., 1988 ; Hayashi et al., 1992) démontrant son excellente biocompatibilité. Depuis 1990, plus de 3,5 millions de prothèses en alumine ont été implantées avec succès (Gutwein et al., 2004).

Les alumines utilisées dans ce travail, sont l'alumine NanoTEK® dont les caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 2, et de l'alumine fluorescente (Illustration 15).

Oxyde d'Alumine Al_2O_3 NanoTEK® (poudre blanche)	
Pureté	99,95 %
Surface spécifique	35 m ² /g
Taille moyenne des particules	47 nm
Masse volumique	3,6 g/cm ³
Masse volumique apparente (en vrac)	0,26 g/cm ³
Morphologie	Sphérique
Phase cristallographique	70 : 30 δ : γ

Tableau 2 : Caractéristiques de la poudre d'alumine NanoTEK®

De façon à obtenir une poudre fluorescente, un corps sphérique en silice de 500 nm de diamètre est synthétisé. Ce corps est ensuite enrobé de FITC (isothiocyanate de fluorescéine) qui fluoresce dans le vert à une longueur d'onde de 488 nm. Elle est elle-même recouverte d'une couche d'alumine pour atteindre un diamètre de 600 nm. M F Rossignol et Mlle M A Piechowiak, du SPCTS de Limoges, nous ont fourni cette poudre.

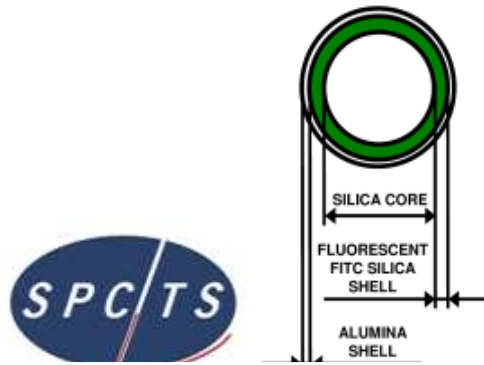


Illustration 15 : Poudre d'alumine fluorescente (600 nm de diamètre) (d'après A M Piechowiak)

3.4. La zircone-cérium

La zircone (ZrO_2) présente elle aussi une bonne compatibilité biologique (Olmedo et al., 2011). Les cristaux d'oxyde de zirconium s'organisent en structures cristallines (mailles). Elle est présente sous forme de trois polymères : monoclinique, quadratique et cubique (Illustration 16).

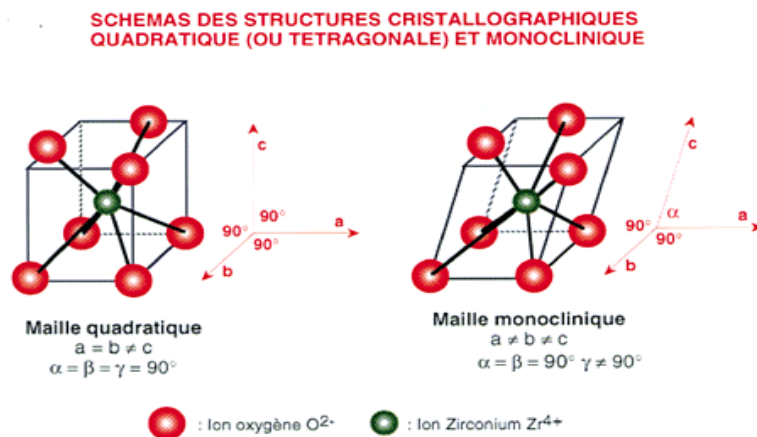


Illustration 16 : Schémas des structures cristallographiques quadratique (ou tétragonale) et monoclinique

Seule la phase quadratique permet d'obtenir une céramique aux propriétés mécaniques satisfaisantes (Fernández-Fairén et al., 2006). La phase monoclinique affaiblit les performances mécaniques et peut

contribuer à diminuer la cohésion des grains de la céramique et donc la densité. Il est ainsi essentiel que la proportion de phase monoclinique soit la plus faible possible. Les procédés de fabrication et de stérilisation doivent limiter les possibilités de passage d'une phase quadratique stable à une phase monoclinique instable. La transformation quadratique monoclinique ($q \rightarrow m$) s'accompagne d'une augmentation de volume importante d'environ 4,5%, mais elle est réversible. Ceci conduit les pièces de zirconium à se fissurer lors du refroidissement après frittage (Illustration 17). Ces microfissures peuvent lors de l'obtention de prothèses, entraîner des gênes et des douleurs qui peuvent nécessiter une nouvelle intervention chirurgicale. La température de frittage, c'est-à-dire d'agglomération des grains, doit être extrêmement précise pour l'obtention des différents cristaux. En dessous de 1400°C, le risque de mauvaise densification augmente. C'est pourquoi la température de frittage se situe entre 1400°C et 1500°C. Pour éviter cet inconvénient, on ajoute à la zirconium des oxydes qui stabilisent le matériau dans les phases quadratique ou cubique, empêchant la transformation $q \rightarrow m$ lors du refroidissement. Industriellement, quatre oxydes sont utilisés pour la stabilisation de la zirconium : MgO (oxyde de magnésium), CaO (oxyde de calcium), Y_2O_3 (oxyde d'yttrium III), CeO_2 (dioxyde de cérium).

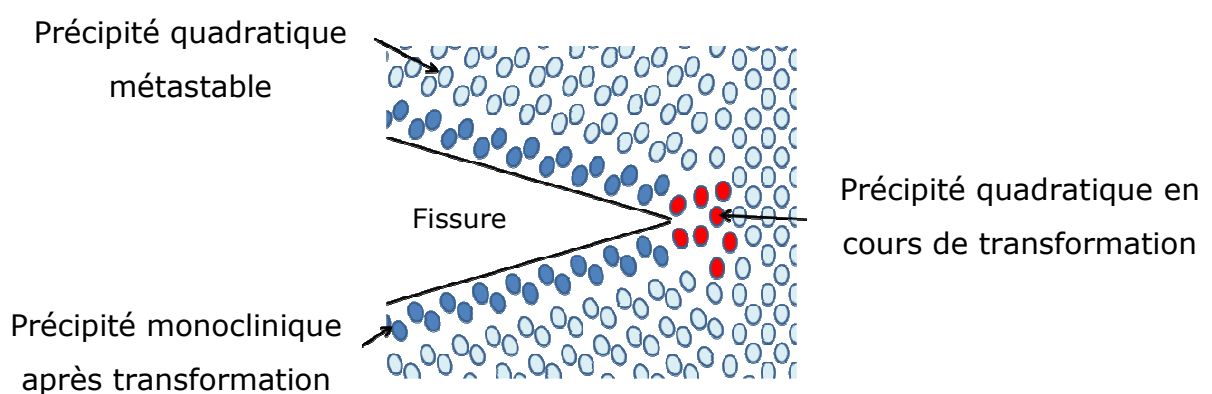


Illustration 17 : Passage de la forme quadratique métastable de zirconium à la forme monoclinique au niveau des berges d'une fissure

La classification des zircons stabilisés est faite en fonction des phases obtenues. Une zircone contenant un mélange de phase cubique et de phase quadratique, est appelée PSZ (Partially Stabilized Zirconia), et dérive principalement de l'addition de MgO ou de CaO. Une zircone stabilisée principalement en phase quadratique, TZP (Tetragonal zirconia polycrystal), est produite par l'addition d' Y_2O_3 ou de CeO_2 . La zircone que nous avons utilisée est de type Ce-TZP, c'est à dire stabilisée en phase quadratique par l'ajout d'oxyde de cérium CeO_2 et dont les caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 3 (El Hattoui, 2003).

Zircone-Cérium ZrO_2 Ce_2 (poudre légèrement jaune)	
Surface spécifique	23 m ² /g
Taille moyenne des particules	880 nm
Densité relative	99 %
Morphologie	Sphérique
Phase cristallographique	quadratique
% de Cérium	12 %

Tableau 3 : Caractéristiques de la zircone-cérium

4. METHODE DE TRI CELLULAIRE

La SdFFF (Sedimentation field flow fractionation) est une technique de Fractionnement par Couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF).

4.1. Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'élution inertiel

Le concept des méthodes de FFF a été inventé à la fin des années 1960 par JC Giddings. Elles représentent une famille de techniques apparentées

à la chromatographie liquide où la colonne est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250 μm) au regard de sa largeur (1-2 cm) et de sa longueur (50-90 cm) (Giddings, 1993) (Illustration 18).

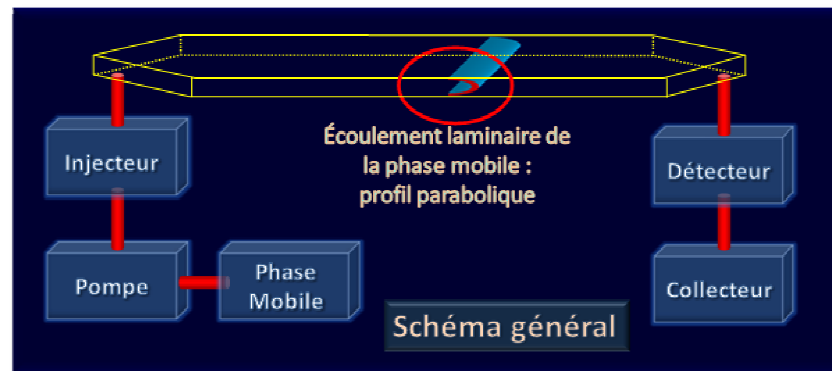


Illustration 18 : Schéma général d'un canal de séparation de FFF

La séparation des espèces microniques (cellules, amidon) dépend de leur sensibilité à deux forces antagonistes. Une force associée à l'application d'un champ externe multigravitationnel (mise en rotation du canal) appliqué perpendiculairement à la grande surface du canal, conduisant les particules vers la paroi d'accumulation (vitesses d'élution faibles) et une force d'élévation d'origine hydrodynamique liée au déplacement des particules dans la phase mobile, les conduisant vers le centre du canal (vitesses d'élution élevées). La balance de ces deux forces définit une position d'équilibre pour chaque population de particules séparées. Les particules sont alors focalisées dans de fines couches situées au-dessus de la paroi d'accumulation. Ces monocouches seront éluées à la vitesse de la ligne de flux passant par leur centre de gravité (Illustration 19).

Les forces hydrodynamiques sont décrites par les équations suivantes (Williams et al. 1994):

$$F_L = F_l + F_{asc} \approx C \frac{a^3 \eta S \omega}{\delta} \quad \text{avec} \quad F_l = C \frac{a^3 \eta 6 \langle V \rangle}{\delta w} \quad \text{et} \quad F_{asc} = 13.5 \pi \frac{\langle V \rangle^2 a^4 \rho}{w^2} g \left(\frac{x}{w} \right)$$

où F_L : forces hydrodynamiques, F_I : forces inertielles, F_{asc} : forces ascensionnelles, C : coefficient adimensionnel dépendant du flux de phase mobile ($\approx 7 \cdot 10^{-3}$), a : rayon des particules, η : viscosité, ρ : densité de la phase mobile, S_o : coefficient de Soret, δ : distance entre le centre de gravité de la monocouche et la paroi d'accumulation, $\langle V \rangle$: vitesse moyenne de la phase mobile / w : épaisseur du canal, x : distance entre le centre de gravité de la particule et la paroi.

Il est intéressant de noter que les forces hydrodynamiques dépendent des caractéristiques de l'appareillage, des espèces microniques à séparer mais aussi des caractéristiques du fluide (phase mobile) dans lequel elles se trouvent. Les facteurs influençant ces forces, et sur lesquels il est possible d'agir pour améliorer la séparation sont essentiellement la vitesse de la phase mobile (débit) et l'épaisseur du canal. Concernant les particules, les deux principaux paramètres régissant la séparation et l'ordre d'élution sont la densité et la taille. A densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques ; ainsi situées plus haut dans le canal, elles seront éluées avant les particules de plus faible diamètre (Illustration 18).

En SdFFF, la force de gravité s'exerçant sur une particule est de la forme :

$$F = m \left(1 - \frac{\rho_{mob}}{\rho_{part}} \right) \omega^2 r$$

où, m : masse de la particule, ρ : densité de phase mobile et de la particule, ω : fréquence de rotation angulaire, r : rayon du rotor.

La force de gravité dépend essentiellement des caractéristiques des particules et de l'appareillage. A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité comme les cellules, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier. L'intérêt du mode d'élution inertiel est évident pour l'élution des

cellules dont on connaît la fragilité et la capacité d'interaction ou d'adhésion aux surfaces. Ces interactions conduisent à des effets néfastes en termes d'intégrité fonctionnelle. Dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille (a^3) et du faible risque d'interaction particules / paroi qu'il offre, le mode inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre (Battu et al., 2002).

La SdFFF est une méthode préparative, douce et passive en comparaison des méthodes utilisant un pré-marquage fluorescent ou magnétique. La SdFFF, dont l'efficacité est simplement basée sur les propriétés biophysiques intrinsèques des cellules, est particulièrement intéressante dans les applications pour lesquelles le marquage peut interférer avec l'utilisation des cellules (culture, transplantation), ou pour lesquelles aucun marqueur n'est disponible, ou dans le cas où celui-ci induit une différenciation cellulaire (cellules souches) (Battu et al., 2002).

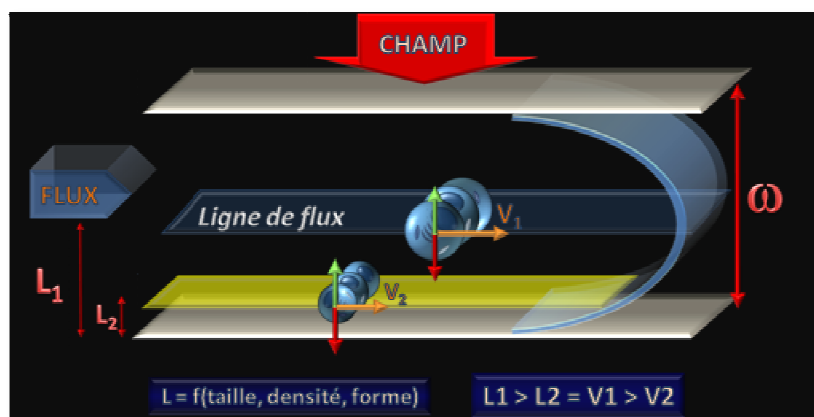


Illustration 19 : Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel

Le profil d'élution (fractogramme) de SdFFF est un signal de type absorbance = f (temps) (Illustration 20). Dans le cadre de la séparation d'espèces biologiques, afin de déterminer quelle fraction correspond à la sous-population d'intérêt, selon un critère biologique donné, il est nécessaire de réaliser un couplage avec les techniques de caractérisation biologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence, biologie

moléculaire... Ceci permet un calibrage multidimensionnel des fractogrammes obtenus en fonction de la taille, de la densité et des propriétés biologiques : état de différenciation (cellules souches), expression de marqueurs biologiques, sensibilité à l'apoptose, etc., ceci pouvant être défini sous le vocable général de "cellulomique" (Battu et al., 2002).

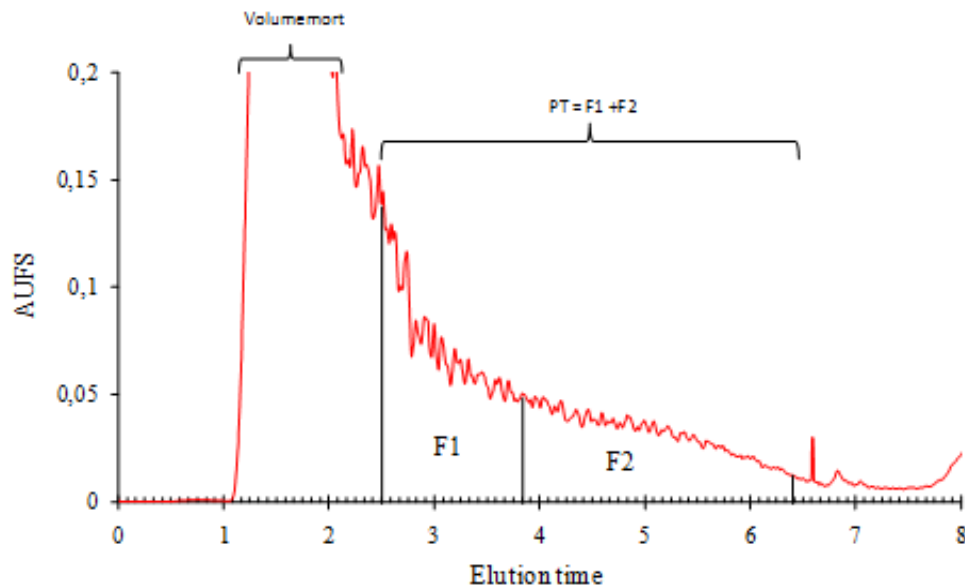


Illustration 20 : Profil d'éluion des fibroblastes dermiques FDs (fractogramme) traités par 1000 µg/mL d'alumine

4.2. Mise au point du matériel

La SdFFF est reconnue comme l'une des méthodes de FFF des plus efficaces et polyvalentes (Giddings, 1993). Cependant, sa diffusion a été jusqu'à présent limitée par le manque récurrent de matériels fiables disponibles à la commercialisation. Ainsi, de nombreuses équipes, bien que désireuses de l'utiliser, y ont renoncé par manque de matériels adéquats ou de savoir-faire pour la développer. De ce fait, l'équipe du Professeur Philippe Cardot et ses collaborateurs de l'Université de Limoges, en produisant des prototypes, ont acquis au cours de cette dernière décennie

une expérience et une place unique aux niveaux européen et mondial. Le développement de prototypes de phase-1 à -3 (Illustration 21) a porté sur l'ensemble des pièces maîtresses de l'appareillage : statif, bol de centrifugation, contrôle et pilotage du moteur, joints tournants, afin de les fiabiliser, et de permettre leur adaptation au tri cellulaire aseptique. Une étape fondamentale de ce travail a été la mise en place du système de contre-canal (Cardot et al., 2006a). Ce travail a été reconnu et récompensé par un Concours Allègre 2002, et par le transfert de technologie et de valorisation au sein de l'Université de Limoges (Cardot et al., 2006 a et b). Ainsi, cette équipe de l'Université de Limoges est-elle à même de proposer un outil analytique fiable et performant, mais aussi de proposer des applications associées, démontrant la polyvalence de la technique et d'en assurer la diffusion. Le développement instrumental de prototypes s'est accompagné d'une adaptation méthodologique pour l'analyse biologique dont l'efficacité est démontrée par le respect des exigences minimales en terme de séparation cellulaire telles que le maintien 1/ de l'intégrité fonctionnelle; 2/ d'un haut pourcentage de viabilité à court et long terme (culture et transplantation); 3/ de l'état de maturation et de différenciation (Battu et al., 1993).

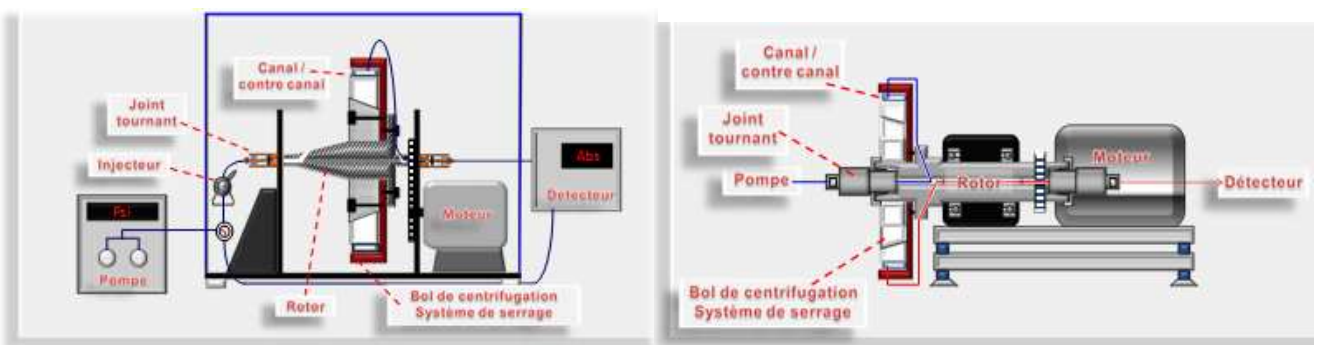


Illustration 21 : Prototypé de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite)

4.3. Tri cellulaire par SdFFF

La SdFFF est devenue depuis quelques années un outil performant pour le suivi de processus biologiques tels que l'apoptose ou la différenciation cellulaire, ainsi que pour l'isolement de sous-populations d'intérêt d'origine cancéreuse.

Dans le domaine de la cancérologie, un travail sur une lignée de neuroblastomes humains, les IMR-32, de morphologie et de dynamique cellulaire complexe, a pu être réalisé. Grâce à la SdFFF, l'isolement des différentes sous populations, a permis de mettre en évidence deux phénotypes différents. Ainsi, comprendre les mécanismes de différenciation, leur cinétique et les relations qui existent entre ces phénotypes permettrait de trouver des stratégies thérapeutiques adaptées et efficaces (Bégaud-Grimaud et al., 2007). Une des stratégies thérapeutiques à l'heure actuelle pour les tumeurs malignes hématopoïétiques, est d'induire une différenciation des cellules de la tumeur. La différenciation mégacaryocytaire des cellules d'une lignée érythroleucémique humaine a été induite par la diosgénine, un stéroïde végétal. La SdFFF a permis d'enrichir les fractions cellulaires en cellules plus ou moins différenciées qui sont utilisées pour l'analyse de l'expression des protéines (Cailleateau et al., 2008).

L'épithélium olfactif d'embryon de poulet, riche en cellules souches neurales, constitue un excellent modèle de la capacité de la SdFFF à isoler ces populations. Un tri réalisé sous faible champ gravitationnel permet la purification d'une fraction cellulaire stérile, viable et fonctionnelle ayant les caractéristiques de cellules souches : immaturité – auto renouvellement – et pluripotentialité et obtention des différents types cellulaires de cet épithélium : progéniteurs, cellules de soutien et neurones olfactifs (Comte et al., 2006).

La première étape des travaux de S Battu fut la préparation d'une population enrichie, stérile et viable de neurones corticaux. Cette

population obtenue à partir d'une population cellulaire complexe (cortex d'embryon de rat E17) constitue un modèle d'étude viable de la physiopathologie neurale en quasi absence d'influence gliale (Battu et al., 2001) .

L'ensemble de ces travaux nous montre que la SdFFF est un outil incontournable de tri cellulaire en particulier dans le domaine de la biologie cellulaire. Néanmoins, des expérimentations biologiques doivent être associées à cette technique de manière à confirmer les résultats obtenus en SdFFF.

5. OBSERVATION DES CELLULES

Pour comprendre les interactions entre les cellules et les poudres de céramique, il est nécessaire de pouvoir les observer. Le principe de la microscopie est de former une image de l'objet grâce à des photons ou à des électrons. On distingue généralement deux types de microscopie, la microscopie optique ou photonique et la microscopie électronique.

5.1. La microscopie optique

Le premier microscope optique fut fabriquer par Kepler en 1611 mais ce n'est qu'en 1968 que Petran et ses collaborateurs fabriquent le premier microscope confocal. Des perfectionnements tels que la coloration des cellules, le phénomène de diffraction, l'élaboration de lentille, la vidéo et la fluorescence, ont permis à la microscopie optique de devenir incontournable pour la biologie cellulaire.

Les bactéries et les mitochondries, dont la largeur est d'environ 0,5 μm , représentent généralement le plus petit objet dont la forme peut être

clairement discernée en microscopie optique. On distingue la microscopie à transmission et la microscopie à fluorescence.

5.1.1. La microscopie à transmission

Lorsque l'onde lumineuse rencontre un obstacle qui ne lui est pas transparent, elle est diffractée. C'est le cas lorsqu'elle rencontre les lentilles convergentes, les bords des diaphragmes ou les composants cellulaires (Illustration 22). La nature ondulatoire de la lumière ainsi que la diffraction expliquent que l'image d'un point concentrique n'est pas un point, mais une tache composée d'un ensemble de cercles concentriques : c'est la tache de Airy (Illustration 23). Une image dite en contraste de phase sera obtenue. En routine, cette technique qui permet d'observer des cellules vivantes en culture sera employée pour contrôler le bon déroulement des expérimentations.

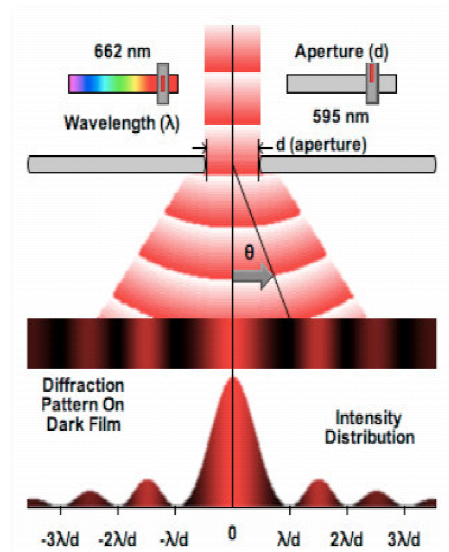


Illustration 22 : Diffraction d'un rayon lumineux

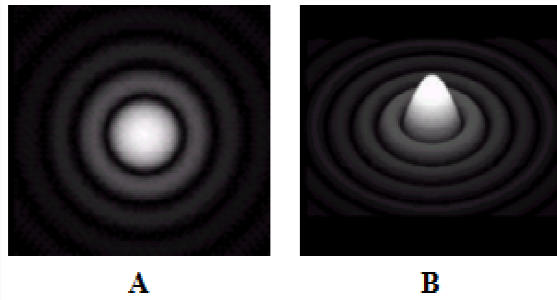


Illustration 23 : Tache de Airy ; (A) image en 2 dimensions (X, Y) ; (B) image en 3 dimensions (X, Y, Z) (<http://www.glafreniere.com/optique/airy.htm>)

5.1.2. La microscopie à fluorescence

Le microscope confocal à balayage laser, utilisé dans cette étude, est un microscope à fluorescence où l'échantillon observé est éclairé point par point par un faisceau laser balayant le plan (X, Y). Lors du passage du faisceau en un point, les molécules fluorescentes présentes à cette position dans toute l'épaisseur Z de l'échantillon sont excitées. La fluorescence émise est ensuite filtrée par un diaphragme (pinhole) situé au point de focalisation de la lumière avant le détecteur (photomultiplicateur). Par ce biais, on détecte uniquement la fluorescence provenant du plan de focalisation (X, Y). Les déplacements dans l'épaisseur de l'échantillon sont effectués à l'aide d'une platine motorisée. Ceci permet d'avoir des déplacements reproductibles, et par conséquent de faire des coupes optiques adjacentes. Les images faites en microscopie confocale étant numérisées, le traitement des coupes optiques adjacentes permet de visualiser et d'extraire des informations 2D et 3D. Les images ne sont composées que de la fluorescence émise au plan focal. Les images apparaissent donc nettes sans traitement. Cela fait de cette technique une méthode très sensible. Cependant, bien sûr, des inconvénients existent notamment de nombreux paramètres à régler pour optimiser la qualité des images obtenues, la possibilité de photodestruction et de photobleaching, et le choix des fluorochromes est limité par les caractéristiques des lasers présents.

5.2. La microscopie électronique

On distingue généralement deux types de microscopie électronique, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission (MET), seule technique développée dans ce mémoire.

La MET est une technique permettant d'observer des organites intracellulaires sur les échantillons coupés ou de localiser des molécules avec des marqueurs. Elle est utilisée également pour visualiser des structures moléculaires (protéines ou acides nucléiques) et des microorganismes entiers par les techniques de coloration positive. Un microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électrons pour illuminer l'échantillon. Les électrons sont déviés par les molécules gazeuses qu'ils rencontrent, et il est donc nécessaire de réaliser un vide élevé dans la colonne du microscope. Lorsque les électrons traversent l'échantillon, ils sont détectés par un ordinateur et l'image est formée. Les électrons incidents provenant de la source sont soit totalement arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif élimine les électrons déviés. Les électrons arrêtés se traduisent à l'observation par des zones sombres alors que les électrons transmis correspondent à des zones claires.

6. IMMUNOFLUORESCENCE

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage qui utilise des anticorps ainsi que des fluorochromes.

Il existe deux types de fluorescence. Tout d'abord, la fluorescence dite « naturelle », ou auto-fluorescence, émise spontanément par la cellule. Ensuite, il y a la fluorescence conférée par un fluorochrome, substance chimique qui émet de la lumière si elle est excitée à une certaine longueur d'onde. L'immunofluorescence consiste à marquer des antigènes dans un tissu ou dans des cellules en culture à l'aide d'anticorps primaires

spécifiques, et à détecter ce premier marquage à l'aide d'anticorps secondaires conjugués à des composés permettant leur détection comme par exemple un fluorochrome (Illustration 24).

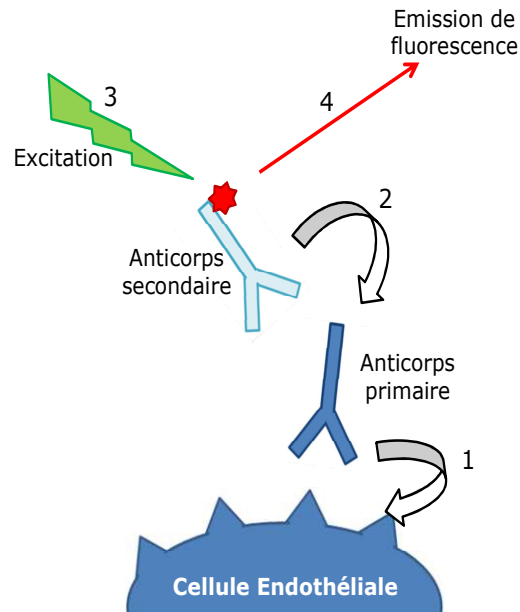


Illustration 24 : Technique d'immunofluorescence. (1) fixation de l'anticorps primaire ; (2) fixation de l'anticorps secondaire) ; (3) excitation du fluorochrome par un laser ; (4) émission de fluorescence

7. PHARMACOCINETIQUE

Le devenir dans l'organisme d'une substance active contenue dans un médicament, est lié à la pharmacocinétique, c'est-à-dire aux étapes d'absorption, de distribution, de métabolisation et de l'excrétion du principe actif (PA) et de ses métabolites.

7.1. Absorption

La substance active doit traverser les membranes biologiques du site d'absorption vers le sang pour pénétrer dans la circulation systémique. Les

membranes biologiques à traverser ont des compositions variables en fonction de la voie d'administration du médicament comme par exemple la paroi du tube digestif lors de l'administration de formulations orales (comprimés, solutions ou suspensions buvables, etc.), la peau lors de l'administration de formulations percutanées (pommades, patchs, etc.), la paroi du rectum lors de l'administration de suppositoires, la paroi du vagin lors de l'administration de formulations vaginales, la paroi des poumons pour les formes inhalées... De plus, la substance active doit être suffisamment hydrosoluble pour être dissoute, et suffisamment liposoluble pour franchir les barrières biologiques lipophiles. Enfin, l'absorption est dépendante des caractéristiques du milieu, comme par exemple l'absorption dans l'estomac où les substances actives acides faibles liposoluble sont absorbées, car elles ne sont pas ionisées en milieu acide, elles sont par conséquent capables de franchir les barrières biologiques lipophiles. Les substances actives bases faibles sont quant à elles faiblement absorbées au niveau de l'estomac, car elles sont ionisées en milieu acide. Enfin, l'administration d'un principe actif par injection intraveineuse permet un passage direct dans la circulation, sans avoir à se soucier des problèmes liés à l'absorption. Ceci en fait la voie d'administration privilégiée dans les cas d'urgence.

7.2. Distribution

La substance active présente dans la circulation systémique peut se lier plus ou moins fortement et de façon réversible aux protéines plasmatiques (albumine, globulines ou lipoprotéines). Les médicaments acides et bases faibles se fixent de manière forte aux protéines plasmatiques (plus de 90 % de liaisons), mais ces liaisons sont réversibles. C'est le cas des diurétiques, des barbituriques ainsi que de certains β -bloquants. En fonction de ses propriétés physico-chimiques et biochimiques, la substance active peut

également s'accumuler dans certains organes ou tissus contenant ou non des récepteurs pharmacologiques.v'

7.3. Métabolisation

La métabolisation d'une substance médicamenteuse est en règle générale due au foie. Cependant, de nombreux autres organes peuvent y jouer un rôle comme les poumons, l'intestin ou le cerveau.

C'est la transformation du médicament en différents métabolites par le système enzymatique de l'organisme. L'activité de ces métabolites est nulle, toxique mais ils peuvent être transformés en un autre produit actif. Ce phénomène peut être exploité pour concevoir un médicament inactif sous sa forme administrée au patient, mais conduisant à des métabolites actifs. On parle alors de médicament pro-drogue. Cet artifice peut être particulièrement utile quand la forme active de la substance présente des difficultés d'administration ou d'absorption.

7.4. Élimination

La substance active et ces métabolites sont voués à disparaître de l'organisme. Les voies prédominantes de l'élimination sont généralement la voie urinaire ou la voie biliaire (fécales).

La plupart des transformations que subissent les médicaments (oxydations et conjugaisons) augmentent leur hydrosolubilité et accroissent leur aptitude à être rejetés par voie urinaire. Les mécanismes d'élimination urinaire des médicaments sont similaires à ceux des substances physiologiques. Le médicament est éliminé aussi au niveau du foie dans la bile sous forme intacte ou bien souvent après avoir été métabolisé ou

conjugué. Parvenu dans l'intestin, ils peuvent entrer dans un cycle entérohépatique.

Cependant, de nombreux autres organes peuvent participer à cette élimination : les poumons, la peau (transpiration), les glandes salivaires, les glandes lacrymales...

7.5. Vecteur thérapeutique

Une voie importante de la recherche en pharmacie galénique est celle de la vectorisation des principes actifs. Selon F. Puisieux, la vectorisation peut être considérée comme une opération visant à moduler et, si possible, à maîtriser totalement la distribution d'un PA dans l'organisme en l'associant à un système approprié appelé vecteur de la substance considérée (Le Hir, 2006).

Le développement des nanotechnologies permet aujourd'hui de proposer l'idée de «vectorisation» des médicaments. S'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques et sur de nouveaux matériaux, la recherche a permis d'imaginer des systèmes innovants d'administration des médicaments. Ils sont capables de protéger la molécule active de la dégradation et d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace.

Le principe général de la vectorisation consiste à rendre la distribution de la substance dans l'organisme aussi indépendante que possible des propriétés du PA et à la soumettre aux propriétés d'un vecteur convenablement choisi, en fonction de la cible à atteindre. Actuellement sont à l'étude des vecteurs de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations (Illustration 25) (Antimisiaris et al., 2008).

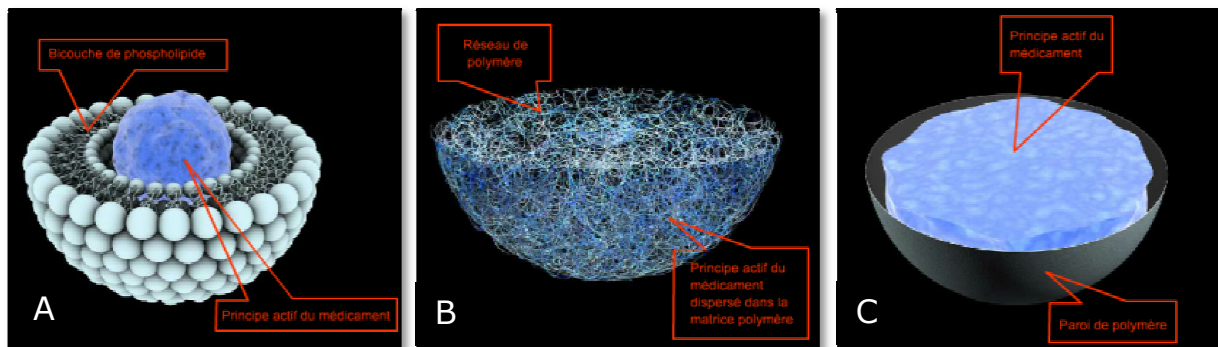


Illustration 25 : Vecteurs thérapeutiques de 1^{ère} génération (A), de 2^{ème} génération (B), et de 3^{ème} génération (d'après CNRS)

7.5.1. Vecteur de 1^{ère} génération

Le liposome est une vésicule biodégradable constituée d'une double couche de phospholipides et d'un compartiment aqueux. Certains liposomes peuvent comporter plusieurs bicouches de phospholipides et plusieurs compartiments aqueux. Le principe actif du médicament est encapsulé dans la phase aqueuse quand il est hydrophile, et dans la bicouche quand il est lipophile. La structure phospholipidique du liposome est proche de celle de la membrane de la cellule : on dit que le liposome est biomimétique. Un liposome est environ 70 fois plus petit qu'un globule rouge. Sa taille varie entre 100 et 300 nm.

Injectés dans le sang, ils sont vite reconnus et « signés » par des protéines nommées opsonines. Les macrophages du foie ainsi alertés captent ces éléments exogènes. Le système hépatique est donc la cible principale des vecteurs de première génération.

7.5.2. Vecteur de 2^{ème} génération

Pour que le médicament puisse traiter d'autres organes, il faut empêcher l'opsonisation, c'est-à-dire la fixation des opsonines. Pour cela, les scientifiques ont eu l'idée de greffer des polymères hydrophiles formant un réseau, appelés polyéthylène glycol, sur ces nanovecteurs de deuxième génération. Rendus ainsi furtifs, ces derniers passent le barrage des

macrophages et atteignent d'autres tissus malades. Son principe actif sera libéré par simple diffusion vers l'extérieur ou à la suite de sa biodégradation dans l'organisme. La taille d'une nanosphère varie entre 100 et 200 nm.

7.5.3. Vecteur de 3^{ème} génération

Enfin, les derniers nanovecteurs à l'étude sont capables de cibler le tissu malade grâce à des molécules placées au bout des polyéthylènes glycol, et qui reconnaissent les récepteurs de la cellule infectée ou cancéreuse. La nanocapsule est une nanoparticule de type réservoir. Elle est constituée d'une mince paroi de polymère généralement biodégradable, dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres, entourant un compartiment huileux ou aqueux qui contient le médicament. La taille d'une nanocapsule varie entre 100 et 200 nm.

7.5.4. Vecteur en céramique

La finalité de ce travail est de proposer une forme innovante, biocompatible et dépourvues de toute toxicité de vecteur thérapeutique. Il est couramment retrouvé dans la littérature l'utilisation de nombreux matériaux pour synthétiser ces vecteurs thérapeutiques. Les revues de S Bose (Bose et al, 2012) et de S Parveen en 2012 (Parveen et al., 2012) rapportent l'utilisation de nanoparticules, en particulier en silice et en phosphate de calcium (Illustration 26), comme vecteur de médicament. Le phosphate de calcium présente une excellente biocompatibilité et une excellente biodégradation car c'est un composant naturel de la matrice osseuse. Le phosphate de calcium est utilisé sous différentes formes, notamment des nanoparticules sphériques, surface de revêtement, ciment ou encore matrice piégeant certains facteurs de croissance. Sur les nanoparticules sphériques, ils greffent des protéines, de l'ARN ou encore de l'ADN. Elles sont utilisées dans le traitement de certains cancers comme le

cancer du colon. En regard de nos résultats, il serait envisageable de « greffer » des molécules sur nos poudres de céramique.

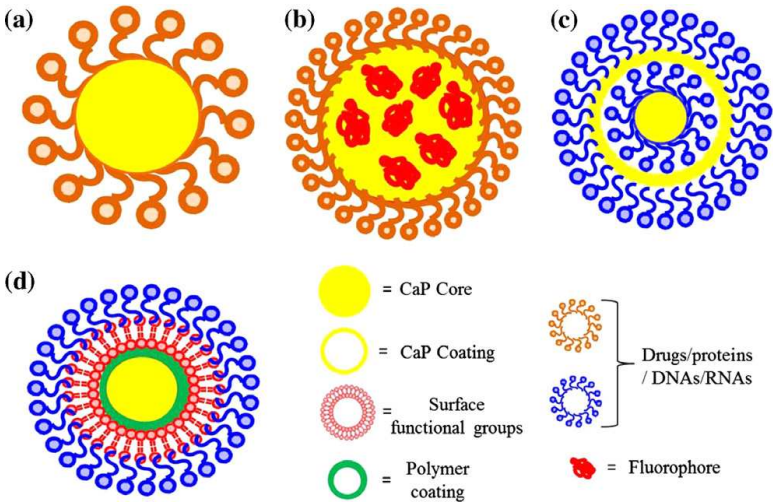


Illustration 26 : Différents type de vecteurs thérapeutiques en phosphate de calcium

Deuxième Partie

Études expérimentales

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

La poudre d'alumine NanoTEK® ainsi que la poudre de zircone-cérium nous ont été fournies par M le Professeur D Hartmann (Université de Lyon, Faculté de Pharmacie, UPSP 2007-135-03-TR12B). La poudre d'alumine fluorescente nous a été fournie par l'équipe de M F Rossignol (Responsable Equipe Procédés Céramiques, UMR CNRS 7315). Le Tableau 4 reprend les différents produits utilisés en culture cellulaire au cours de ce stage.

Produits	Fournisseur/Provenance	Utilisation
DMEM + GlutaMAX™ « Dulbecco's Modified Eagle Medium » + 4,5 g/L de glucose	GIBCO®	Base du milieu de culture
M199	GIBCO®	Base du milieu de culture
SVF « sérum de veau foetal »	GIBCO®	Apporte les facteurs des croissances
Pénicilline	GIBCO®	Antibiotique
Streptomycine	GIBCO®	Antibiotique
Fungizone	GIBCO®	Antifongique
ECGF	SIGMA-ALDRICH®	Facteur de croissance
PBS « phosphate buffered saline »	SIGMA-ALDRICH®	Rinçage
DPBS « Dulbecco's phosphate buffered saline »	GIBCO®	Rinçage pour SdFFF (sans Calcium ni Magnésium)
Trypsine/EDTA	GIBCO®	Décollement cellulaire
Collagène type I	Queues de rats	Fabrication de DE
Collagénase type IA	SIGMA-ALDRICH®	Extraction HUVECs Digestion des DEs

Tableau 4 : Produits utilisés lors du stage

1.2. Culture cellulaire

Toutes les cultures cellulaires sont effectuées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les cellules sont contrôlées quotidiennement par observation avec un microscope à contraste de phase (Nikon, France). Les différents supports de culture utilisés en fonction des expérimentations (flacons, boîtes de cultures...) sont placés dans un incubateur thermostaté à 37°C ayant une atmosphère saturée en eau et contenant 5% de CO₂.

1.2.1. Fibroblastes dermiques humains (FDs)

Un échantillon de peau (épiderme, derme et hypoderme) a été utilisé pour obtenir une culture primaire de fibroblastes. Une fois cet échantillon nettoyé, dépourvu au maximum de graisse, des fragments de derme d'environ 1 mm³ sont réalisés et déposés sur des boîtes de culture pour cellules adhérentes (20 à 30 fragments par boîte). Ces boîtes sont ensuite placées à l'étuve pendant 15 min afin de permettre aux échantillons de derme d'adhérer au support. Ils sont alors réhydratés par une goutte de milieu (DMEM +GlutaMAX®, 20% de sérum de veau fœtal ou SVF, 100 unité/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 250 µg/mL de fungizone). Après deux à trois heures, les boîtes sont délicatement remplies de ce même milieu et incubées à l'étuve. Le temps nécessaire à l'apparition des fibroblastes est d'environ 10 jours. Les boîtes de culture sont régulièrement rincées au PBS et le milieu renouvelé. A confluence, le milieu est écarté, les cellules sont rincées avec du PBS. Afin de décoller le tapis cellulaire, la trypsine est ajoutée. Au bout de 5 minutes d'incubation à l'étuve, de façon à neutraliser la trypsine, du milieu complet est ajouté. La suspension cellulaire est centrifugée et des aliquotes de cellules sont réalisés et placé à -80°C pour conservation.

Le comportement de ces fibroblastes étant très hétérogène vis-à-vis de l'incorporation de la poudre, nous avons par la suite utilisé une lignée de fibroblastes, les WI26.

1.2.2. Lignée de fibroblastes WI26

Les cellules utilisées proviennent d'une lignée de fibroblastes humains de type WI26. Ce sont des cellules adhérentes issues de la transformation par le virus SV40 de cellules fibroblastiques extraites d'un tissu pulmonaire embryonnaire (ATCC, USA).

1.2.3. Cellules endothéliales de cordon (HUVECs)

La méthode qui a été utilisée est classique. Un protocole détaillé a été trouvée dans la littérature (Jiménez et al., 2012).

Pendant toute l'opération, les cordons sont maintenus dans du « Hank's balanced salt solution » (HBSS) contenant de la pénicilline (100 unité/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). L'extraction des HUVECs a été réalisée sur la veine du cordon ombilical qui est moins riche en cellules musculaires lisses que les deux artères parcourant se cordon.

Une collagénase de type IA, de concentration 2 mg/ml dans du PBS (*Clostridium histolyticum*, SIGMA-ALDRICH®) a été introduits dans la veine de deux cordons puis laissés pendant 10 min pour la réalisation d'une première extraction. Deux autres extractions sont réalisées avec 5 min de digestion supplémentaire sur les mêmes veines. Après chaque digestion l'action de la collagénase a été stoppée par l'ajout de milieu de culture primaire (M199, 20% SVF, 100 unité/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, ECGF).

Les suspensions cellulaires obtenues ont ensuite été centrifugées à 1200 rpm pendant 10 min puis les culots cellulaires repris dans le milieu de culture primaire. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues ont étéensemencées dans deux boîtes de Pétri.

Un jour après l'extraction des cellules endothéliales du cordon et la mise en culture, les cultures cellulaires ont été observées en microscopie photonique. Des cellules organisées en ilots et de forme pavimenteuse, morphologie caractéristique des cellules endothéliales, ont été observées,

mais également des cellules présentant une forme plus étoilée et fusiforme (environ 1 à 2%). Ces dernières pourraient être, soit des fibroblastes soit des cellules musculaires lisses.

1.2.4. Entretien cellulaire et ensemencement

Les fibroblastes WI26 sont cultivées dans du milieu DMEM + GlutaMAX™, contenant 4,5 g/L de glucose, supplémenté par 5% de SVF et complété par 100 unité/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 250 µg/mL de fungizone (Tableau 4).

Les HUVECs sont cultivées dans un milieu identique à celui utilisé lors de leur extraction mais le taux de SVF est seulement de 10% (Tableau 4).

Lorsqu'une confluence d'environ 80% est atteinte, les cellules sont décollées à la trypsine. Le milieu contenant les cellules est récupéré et centrifugé pendant 10 minutes à 1500 rotation par minutes (rpm). Le surnageant est écarté et le culot cellulaire est repris dans du milieu complet. Les cellules sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre (voir plus bas) et le nombre de cellules nécessaires à l'ensemencement est déterminé.

1.2.5. Comptage

Le but du comptage est d'évaluer le nombre de cellules présentes dans une suspension. Après décollement de leur support, les cellules sont systématiquement comptées en utilisant la technique du bleu trypan : les cellules mortes présentent une membrane perméable et vont donc être colorées en bleu, les cellules vivantes restant réfringentes.

Pour cela, une dilution de la suspension cellulaire est effectuée avec une solution de bleu trypan. Après homogénéisation, un prélèvement de la dilution (15 µl) est déposé puis les cellules sont comptées sur un hémacytomètre de Malassez. Seules les cellules vivantes, non colorées, sont comptées.

1.3. Traitement par les poudres de céramique

Avant toute expérimentation, les poudres sont stérilisées dans une étuve sèche à 180°C pendant 4h (Roualdes, 2009).

Les fibroblastes WI26 sont ensemencés à $0,375 \cdot 10^6$ cellules (j-4) dans un flacon de 75 cm². Après 24h d'adhésion, les milieux sont changés et les cellules sont traitées ou non avec des concentrations de 100 ou 500 µg/mL de poudre de céramique (j-3). Après 3 jours de croissance en présence de poudre, les cellules sont trypsinisées, comptées (j0) et différentes expérimentations sont effectuées.

Les fibroblastes sont, soit, inclus dans un gel de collagène (réalisation de DEs), soit ensemencés pour réaliser des tests de migration avec des inserts. La méthode de SdFFF est utilisée de façon à fractionner la population cellulaire. Les DEs sont régulièrement observés (j1, j4, j7 et j14). Enfin, dans le but d'évaluer l'activité des fibroblastes en culture 3D, la rétraction des DEs est mesurée (Illustration 27).

Les HUVECs sont dans un premier temps identifiées par immunofluorescence après leur extraction. Le protocole de traitement par les différentes poudres de céramique est identique aux fibroblastes (ensemencement, temps passé dans l'étuve...). Les expériences réalisées sur les fibroblastes sont reproduites sur les HUVECs, à savoir les expérimentations de coloration, de migration et de microscopie confocale. Ainsi, l'incorporation dans les cellules des différentes poudres de céramique pourra être comparée en fonction de chaque type cellulaire.

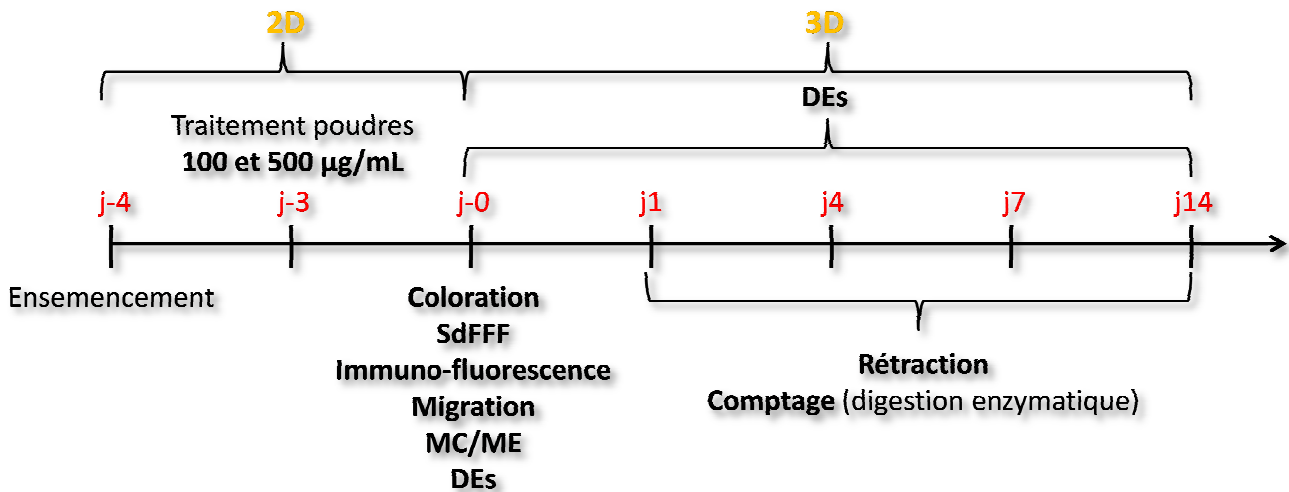


Illustration 27 : Chronologie de traitement par les poudres d'alumine NanoTEK® et de zircone-cérium à des concentrations de 100 et 500 µg/mL

1.4. Méthode de séparation

Le profil d'élution (fractogramme) de SdFFF est un signal de type absorbance = f (temps) (Illustration 28). Cette méthode permet de recueillir plusieurs fractions d'une population de cellules non homogènes, et dans notre cas, plus ou moins chargées de céramique.

Plusieurs fractions sont obtenues :

- Crude qui correspond à l'ensemble des cellules qui n'a pas subi de passage en SdFFF ;
- PT qui correspond au mélange des différentes fractions (F1 + F2) ;
- F1 qui correspond à l'ensemble des cellules recueillies en premier ;
- F2 qui correspond à l'ensemble des cellules recueillies en second.

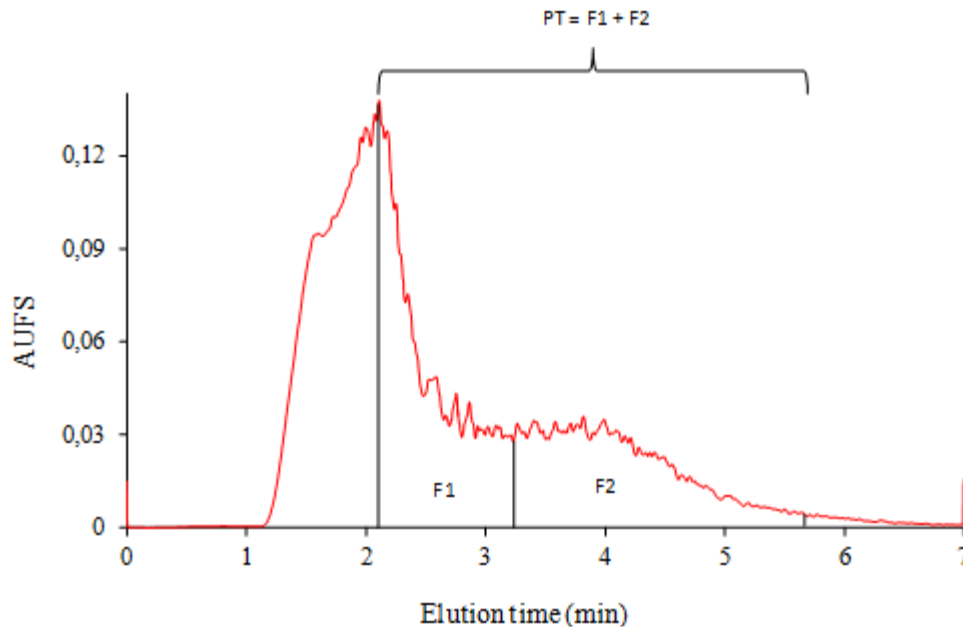


Illustration 28 : Fractogramme des fibroblastes FDs traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK®

1.5. Coloration

Afin d'observer l'inclusion des particules de céramique dans les fibroblastes ou les HUVECs, les cellules sont colorées. Elles sont d'abord rincées avec du PBS puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 1h à température ambiante. Le pH du PFA doit être préalablement contrôlé et ajusté au pH physiologique. Par la suite, les cellules sont colorées au Bleu de Coomassie brillant (BCB) (1g de BCB, 30% isopropanol, 10% acide acétique) pendant 20 minutes sous agitation et toujours à température ambiante puis rincées cinq fois au PBS. L'analyse a été réalisée au microscope optique inversé. Les photos ont été prises avec un appareil numérique Nikon D90®.

1.6. Microscopie

1.6.1. Microscopie confocale

Les cellules WI26 ainsi que les HUVECs sontensemencées à 5000 cellules par puits (j-4) dans des Lab-Tek™ II. Après 24h d'adhésion, le milieu est changé et les cellules sont traitées ou non avec une concentration de 100 µg/mL de poudre de céramique marquée au FITC (j-3) (Illustration 29). A j0, les membranes sont colorées avec le PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich), à une concentration de $2.10^{-6}M$, et les noyaux avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

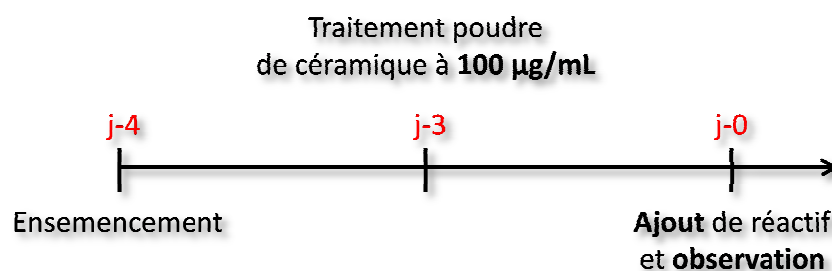


Illustration 29 : Chronologie de traitement par 100 µg/mL d'alumine marquée au FITC lors de l'observation au microscope confocal de WI26

Les cellules sont alors observées au microscope confocal (LSM 510 META, Zeiss, Allemagne) avec l'aide de Claire Carrion (Université de Limoges, Ingénieur d'Etude, UMR CNRS 6101).

1.6.2. Microscopie électronique

Les cellules WI26 sontensemencées à $0,1.10^6$ cellules (j-4) dans une plaque six puits de 9,6 cm². Après 24h d'adhésion, les milieux sont changés et les cellules sont traitées ou non avec une concentration de 500 µg/mL de poudre de céramique (j-3). Après 3 jours de croissance, les cellules sont fixées par 2,5% de glutaraldehyde dans un tampon phosphate pendant 30 minutes à température ambiante. La plaque est rincée au tampon

phosphate. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante avec une solution d'acide osmique 2% dans du tampon Palade, les cellules sont rincées. Elles sont ensuite déshydratées par des bains successifs d'alcool (30°, 50°, 70°, 95°) pendant 10 minutes, puis par trois bains de 15 minutes d'alcool 100°. Au dernier bain est ajouté de l'Epon volume à volume pendant 30 minutes. La plaque est laissée la nuit à 4°C avec de l'Epon pur. Des gélules sont complétées avec un mélange Epon, DMP30 (durcisseur) puis sont retournées sur les zones d'intérêts. Une fois la polymérisation réalisée, 48h à 60°C, les gélules sont enlevées du support. Des coupes ultrafines de 60 à 100 µm d'épaisseur sont réalisées avec un couteau de diamant. Les coupes sont récupérées sur des grilles en rhodium 200 mesh. Les cellules sont observées par contraste positif. En effet, les coupes sont incubées avec des solutions d'acétate d'uranyl 0,5% et de citrate de plomb qui se fixent sur différentes structures et les rendent opaques aux électrons ; elles permettent de visualiser les nucléoprotéines pour la première et les membranes pour la deuxième. Les échantillons sont alors examinés en microscopie électronique (JEOL JEM 101, JEOL, Europe) dans le service de neurologie du CHU Dupuytren de Limoges.

1.7. Immunofluorescence

1.7.1. Les cellules endothéliales

De façon à déterminer si les cellules obtenues lors de la culture primaire sont bien des cellules endothéliales, une immunofluorescence est réalisée.

Le facteur de Von Willebrand, spécifique des cellules endothéliales, a été mis en évidence grâce à un anticorps polyclonal de lapin (ab6994, abcam®) dirigé contre cet antigène ; cet anticorps primaire se fixe alors de façon spécifique sur la cellule (1) (Illustration 24). Par la suite, l'anticorps secondaire (Alexa fluor 488 chèvre anti-lapin IgG A11008, Invitrogen® ou Alexa fluor 594 chèvre anti-lapin IgG A11012, Invitrogen®) sur lequel un

fluorochrome est greffé se fixent sur l'anticorps primaire (2). Le fluorochrome est alors excité à une longueur d'onde de 488 nm ou de 594 nm (3), et l'échantillon peut être observé grâce à l'émission de fluorescence avec un microscope à fluorescence (Leica DM IRB, Leica, France). Les noyaux des cellules ont été marqués par le DAPI. Les images sont obtenues grâce au logiciel Nis Element BR, puis elles sont traitées avec le logiciel Image J.

1.7.2. Les fibroblastes

De façon à pouvoir observer l'impact de la poudre de céramique sur le remaniement du cytosquelette, une immunofluorescence a été mise en place. Les fibroblastes sont traités par de l'alumine marquée au FITC à une concentration de 100 µg/mL pendant 3 jours puis une différenciation en myofibroblastes par le TGFβ1 à une concentration de 5 ng/mL est induite (Desmoulière et al., 1993) (Illustration 30). Le milieu contenant le TGFβ1 est laissé pendant 3 jours avant que la détection de l'actine α-musculaires lisses (α-SMA, marqueur spécifique des myofibroblastes (Darby et al., 1990) ne soit faite par immunofluorescence. Dans une autre série d'expériences, les cellules subissent en premier une différenciation grâce au TGFβ1 puis le traitement par de l'alumine fluorescente est ensuite réalisé. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps monoclonal de souris anti-actine α-musculaire lisse (α-SMA, clone 1A4, Dako®). L'anticorps secondaire est l'Alexa Fluor chèvre anti-souris 594 de chez Invitrogen®.

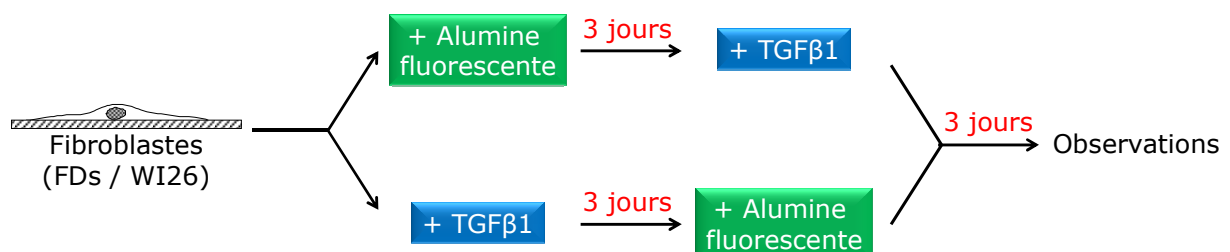


Illustration 30 : Traitement des fibroblastes en vue d'une immunofluorescence pour caractériser l'impacte d'une poudre de céramique sur le remaniement du cytosquelette

1.8. Migration cellulaire

Les expérimentations de migration cellulaire sont réalisées grâce à des inserts en silicone ibidi® (Biovalley, Marne la vallée, France). De façon à ce que les cellules soient confluentes, 35000 cellules pour un volume de 70 μ L sont déposées dans chacun des deux puits qui composent l'insert. Après 24h, l'insert en silicone est retiré, les cellules sont rincées au PBS et 2 mL de milieu est ajouté. Pour ces expérimentations de migration, le taux de sérum dans le milieu a été volontairement diminué de 5% à 1%, ceci afin de réduire au maximum la prolifération cellulaire et de ne conserver que les capacités de migration cellulaire (Illustration 31).

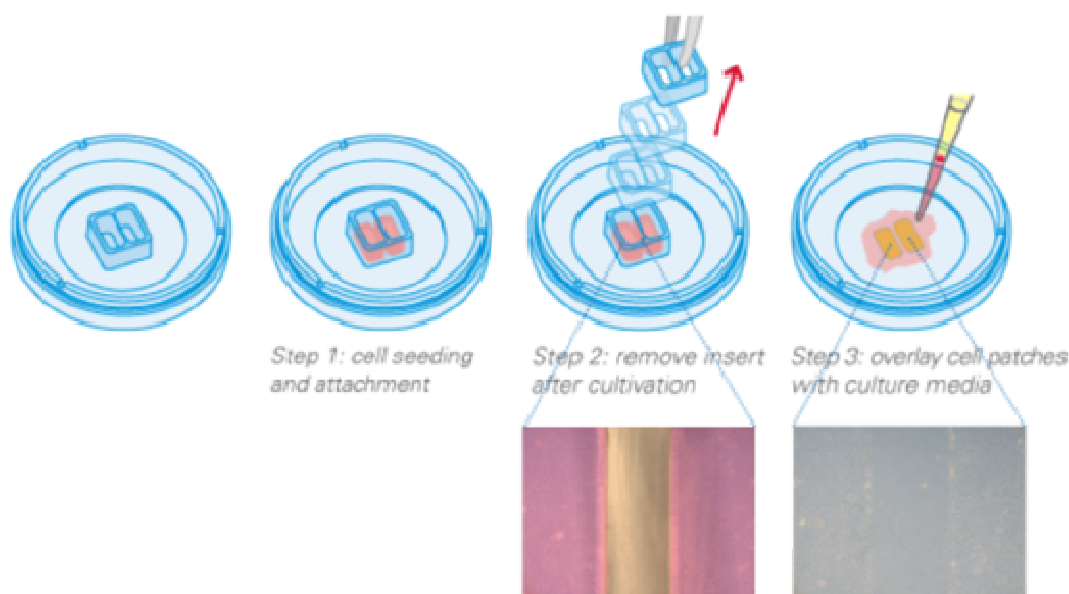


Illustration 31 : Test de migration (inserts en silicone ibidi® Biovalley)

L'observation de la quantité de cellules engagées dans la brèche créée lors du retrait de l'insert, a permis d'évaluer le pourcentage de recouvrement de la zone de migration à l'aide du logiciel image J. L'observation est faite à intervalles de temps réguliers, jusqu'à formation d'un tapis cellulaire homogène.

Les essais de migration cellulaire ont été réalisés sur les WI26 ainsi que sur les HUVECs avec différentes conditions :

- des cellules non traitées,
- des cellules traitées par 100 et 500 µg/mL d'alumine NanoTek®
- des cellules traitées par 100 et 500 µg/mL de zircone-cérium.

1.9. Derme équivalent

Afin d'étudier l'impact du traitement par différentes concentrations de céramique sur le comportement de fibroblastes cultivés en 3D, nous réalisons l'équivalent d'un derme humain ou DE dans une boîte de culture de 60 mm de diamètre.

1.9.1. Le collagène

La base du DE est le collagène de type I extrait à partir de queues de rats mâles de type Sprague Dawley âgés de 10 semaines. Les fragments de tendons sont placés dans une solution d'acide acétique 0,1% qui va digérer le collagène pendant 48h, sous agitation et à 4°C. Le mélange est centrifugé à 10000 rpm pendant 1h30 toujours à 4°C. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à 4°C. Le collagène de type I est alors prêt à l'emploi.

1.9.2. Réalisation d'un derme équivalent

La réalisation d'un DE suit un ordre précis d'introduction des différents constituants (Tableau 5). La température joue un rôle important sur la polymérisation du gel ; l'ensemble des manipulations est donc effectué à froid et bien sûr en conditions stériles.

Constituants d'un derme équivalent	Volume (mL)
Milieu complet	2,75
Collagène 3mg/mL	1,5
NaOH 0,1N	0,25
Suspension cellulaire 2.10^5 cellules/mL	0,5
TOTAL	5

Tableau 5 : Ordre et volume d'introduction des différents constituants pour la réalisation d'un derme équivalent

Une fois le mélange réalisé, il est déposé dans une boîte de Pétri (non adhérente) et placé à l'étuve. Après 10 minutes, temps nécessaire à la polymérisation, le gel est décollé mécaniquement des bords du support et du milieu complet est ajouté.

1.9.3. Digestion du derme équivalent

Afin de compter le nombre de cellules présentes dans un DE, la digestion de ce dernier se fait par action d'une collagénase. Le DE est introduit dans 2 mL d'une solution de collagénase (2 mg/mL dans du PBS), jusqu'à digestion complète. La suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 1500 rpm. Le culot cellulaire ainsi obtenu est repris dans 1 mL de milieu complet et les cellules sont comptées.

1.10. Etude statistique

Lors des résultats de migration et de rétraction, un Test t de Student a été utilisé. L'analyse a été possible grâce au logiciel R.

2. RESULTATS

Dans une première partie, les résultats concernant les fibroblastes FDs et WI26 seront présentés. Ces résultats seront comparés dans une deuxième partie aux résultats concernant les cellules endothéliales de cordon ombilical.

2.1. Fibroblastes FDs et WI26

2.1.1. Traitement par les poudres de céramique

Pour les deux types cellulaires, aucune modification morphologique n'est observée entre les cellules traitées, quelle que soit la concentration en céramique, et les cellules non traitées (Illustration 32). Pour les cellules traitées, la poudre se localise préférentiellement autour du noyau. Plus la concentration en alumine et zircone-cérium augmente et plus les cellules semblent contenir de poudre.

La répartition des particules de céramique dans les FDs traitées par 100 µg/mL n'est pas homogène. En effet, certaines cellules sont remplies de céramique (flèche rouge) alors que d'autres n'en contiennent que très peu ou pas du tout (flèche orange).

Lors de l'utilisation de la lignée WI26, l'incorporation des poudres de céramique semble plus homogène. De façon à confirmer ces résultats, une technique de séparation, la SdFFF, a donc été utilisée.

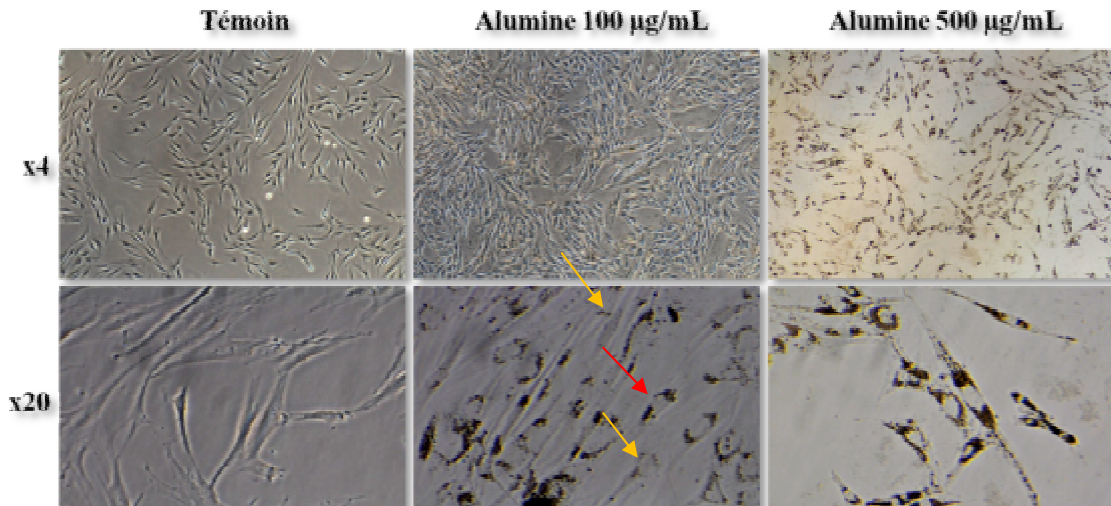


Illustration 32 : Fibroblastes FDs traités par différentes concentrations d'alumine NanoTEK®, à différents grossissements, 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase) ; certaines cellules sont remplies de céramique (flèche rouge) alors que d'autre n'en contiennent que très peu ou pas du tout (flèche orange).

2.1.2. Incorporation de la poudre de céramique dans les fibroblastes

Les fractogrammes de l'illustration 33 (A) (10 g ; 0,8 mL/min, 254 nm, $0,2 \cdot 10^6$ cellules) entre les cellules FDs traitées, en rouge, et les cellules FDs non traitées, en bleu, présentent un profil différent. Les cellules non traitées (fractogramme bleu) sont éluées majoritairement vers 4 minutes 15 secondes, contrairement aux cellules traitées qui sont éluées majoritairement pendant un temps très long, de 2 à 4 minutes. Théoriquement les cellules les plus grandes et les moins denses (F1) sortent en premier et les cellules de la fraction F2, les moins grandes et plus denses, sortent en dernier. Lors du passage en SdFFF, deux sous-populations pour les cellules traitées par de l'alumine 500 µg/mL peuvent être détectées. La SdFFF met donc en évidence une hétérogénéité d'incorporation de la poudre de céramique.

Le profil des fractogrammes de l'illustration 33 (B), correspondant aux cellules WI26, est identique et ne nous permet pas de différencier les

cellules traitées des cellules non traitées, d'un point de vue physique (densité et taille). Les cellules traitées sont éluées quelques secondes plus tard, ce qui peut être dû à la présence de céramique car les cellules les plus denses sont éluées en dernier. L'incorporation de la céramique apparaît donc beaucoup plus homogène.

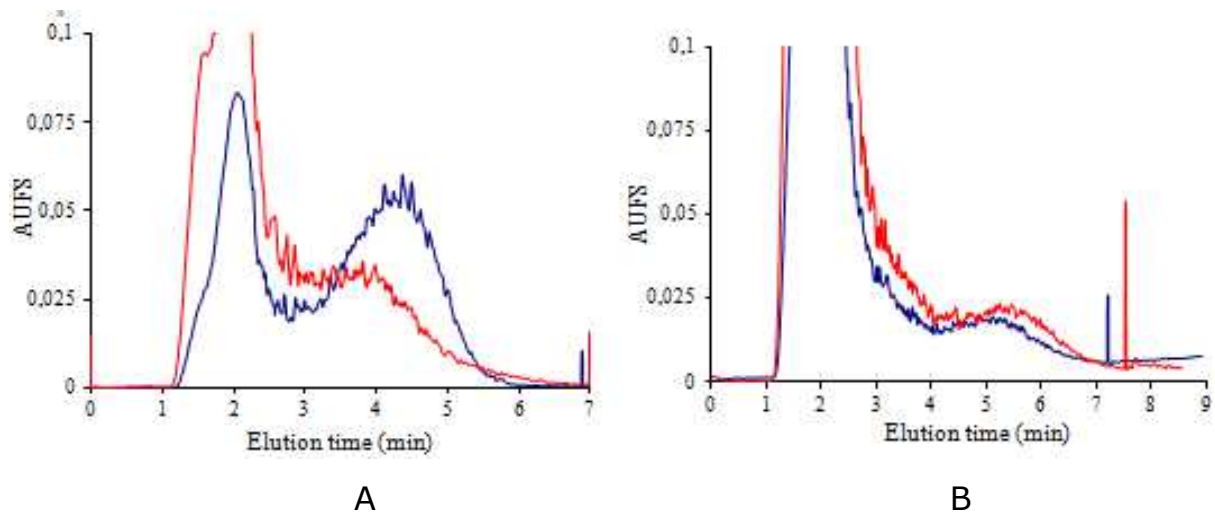


Illustration 33 : Fractogrammes obtenus par SdFFF (10 g ; 0,8 mL/min, 254 nm, 0,2.106 cellules ; (A) FDs traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK® (courbe rouge) et non traités (courbe bleu) ; (B) WI26 traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK® (courbe rouge) et non traités (courbe bleu)

2.1.3. Coloration au BCB

De manière à confirmer les résultats de la SdFFF, des colorations au BCB sont réalisées. Ainsi, aucune modification morphologique n'est observée entre les cellules non traitées et les cellules traitées, quelle que soit la concentration en céramique. La coloration au BCB nous permet également de confirmer la répartition des particules de céramique dans les cellules traitées autour du noyau. Enfin, plus la concentration en céramique augmente et plus les cellules contiennent de la poudre.

La répartition de la céramique dans les différentes cellules d'une culture de FDs après coloration au BCB n'apparaît pas homogène, ce qui confirme

les observations en microscopie à contraste de phase sans coloration (Illustration 32) ainsi que les expérimentations de SdFFF.

L'incorporation de la poudre de céramique (alumine et zircone-cérium 100 µg/mL) par les WI26 apparaît plus homogène (Illustration 34) et vient confirmer les expérimentations de SdFFF.

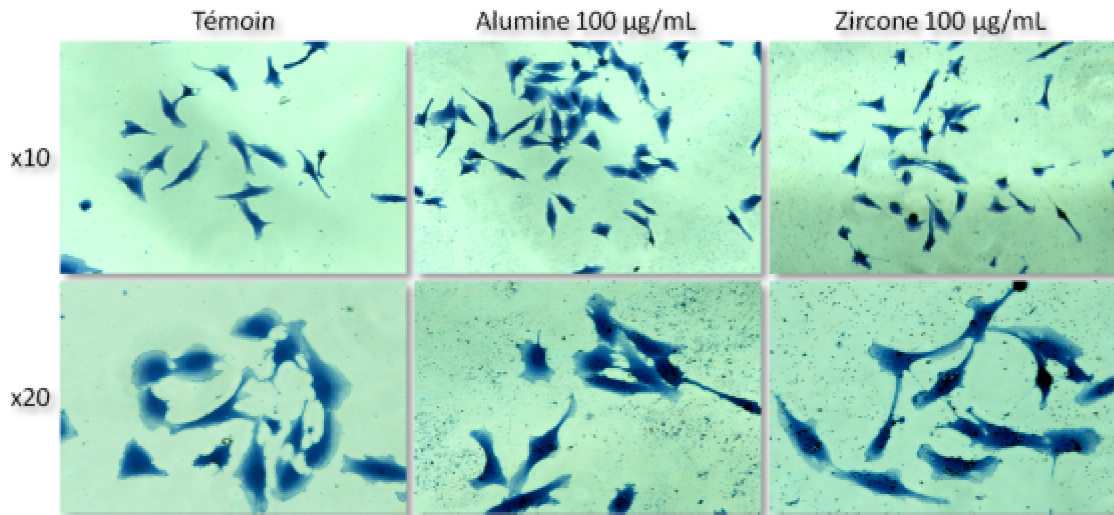


Illustration 34 : Fibroblastes WI26 colorés au BCB à différents grossissements et traités par différentes céramiques (100 µg/mL), 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)

2.1.4. Microscopie

2.1.4.1. Microscopie confocale

Le noyau est marqué en bleu par le DAPI, les membranes sont marquées en rouge par le CellMask DeepRed et la poudre de céramique est marquée en vert par le FITC. Comme précédemment, aucune modification morphologique n'est observée entre les cellules traitées, et les cellules non traitées. En 2D (Illustration 35), les poudres de céramique semblent bien être contenues dans les cellules, ce qui est confirmé par une reconstruction 3D (Illustration 36). Cependant, le mécanisme d'internalisation n'est toujours pas connu. Pour cela, des acquisitions au microscope électronique sont réalisées.

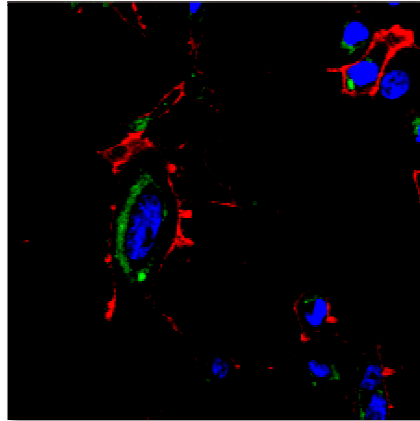


Illustration 35 : Fibroblastes WI26 traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC

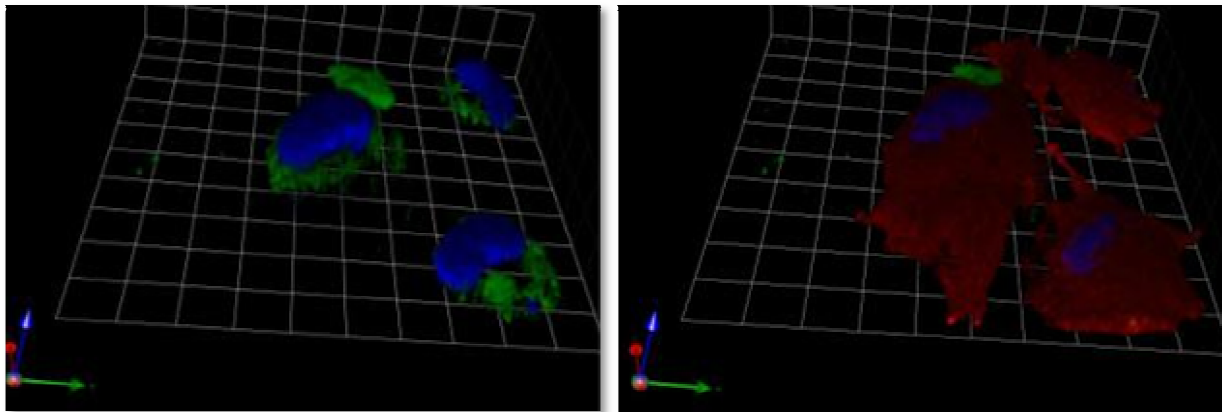


Illustration 36 : Reconstitution 3D de fibroblastes WI26 traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC.

2.1.4.2. Microscopie électronique

Trois jours après traitement par une concentration de 500 µg/mL d'alumine NanoTEK® ou de zircone-cérium, les fibroblastes WI26 ont internalisé la céramique (flèches rouges Illustration 37). A plus fort grossissement, il est possible de visualiser des vésicules constituées d'une membrane en bicouche et contenant de la poudre de céramique (flèches oranges Illustration 37).

D'après ces observations, les membranes autour des agrégats céramiques devraient être visibles et colorées en rouge par le « PKH26 Red fluorescent cell linker » lors des observations en microscopie confocale

(Illustration35). Cependant, si nous avons laissés agir le marqueur de membrane plus longtemps, le signal rouge (récupéré par l'appareil à 543 nm) aurait été trop intense laissant certes apparaitre les membranes autour des poudres de céramique, mais faisant « disparaître » le marquage vert de ces poudres.

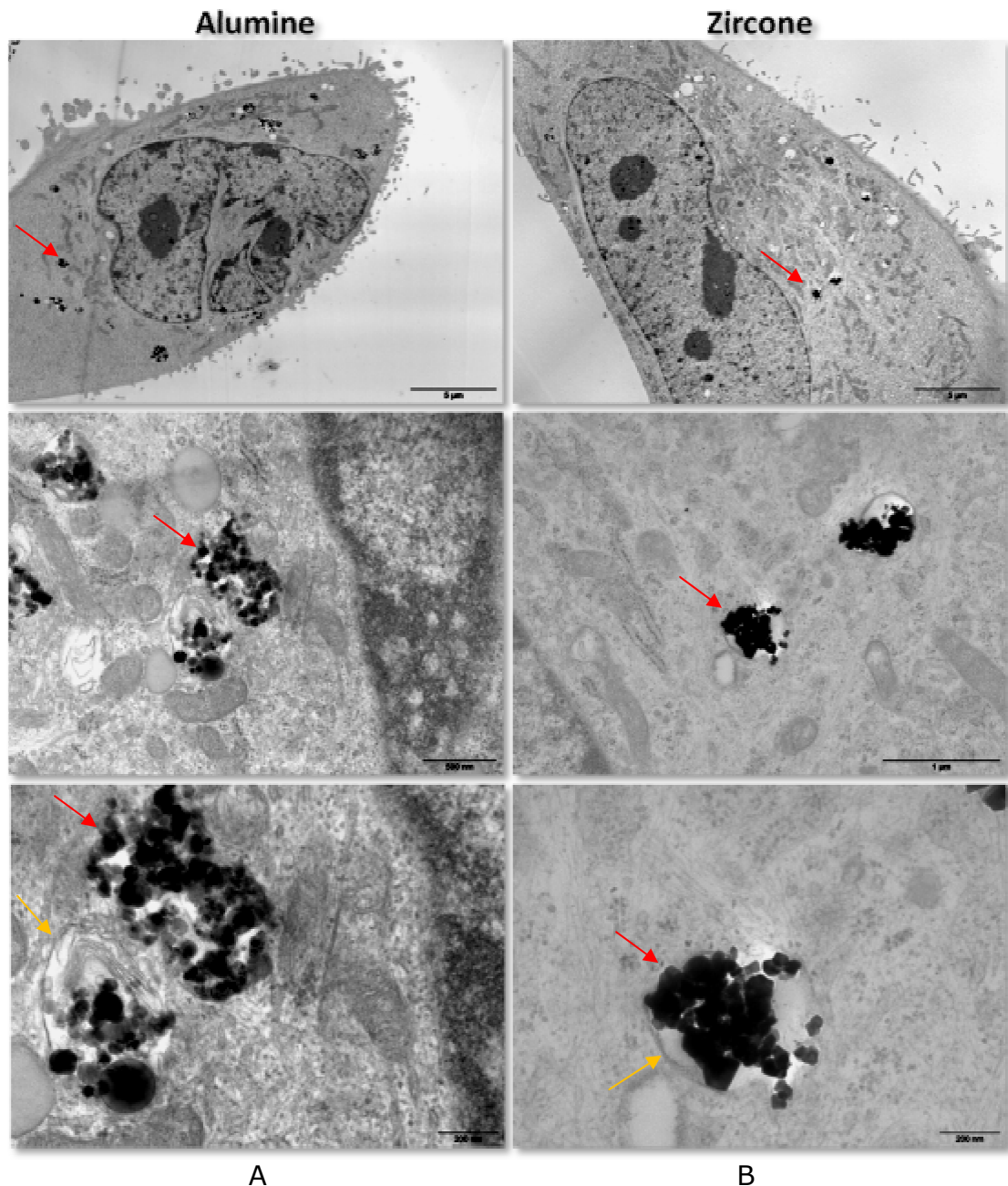


Illustration 37 : Fibroblastes WI26 observés en microscopie électronique, traités par de l'alumine NanoTEK® 500 µg/mL (A) et de la zircone-cérium 500 µg/mL (B) à différents grossissements ; les flèches rouges indiquent les poudres de céramique, les flèches oranges indiquent les vésicules d'endocytoses

2.1.4.3. Conclusion

D'après les images obtenues au microscope confocal et au microscope électronique, la poudre de céramique est internalisée par les fibroblastes. D'après les images de microscope électronique, une membrane classique en bicouche est présente autour des poudres de céramique. On peut supposer que l'internalisation se fait par le mécanisme d'endocytose.

2.1.5. Influence des poudres de céramiques sur l'organisation du cytosquelette

De façon à pouvoir observer l'impact de la poudre de céramique sur le remaniement du cytosquelette des fibroblastes WI26, une immunofluorescence est réalisée. Seulement quelques cellules témoins (sans traitement par la céramique) expriment l'actine α -SMA, ce qui nous amène à utiliser les FDs.

Quel que soit le traitement (par de la poudre ou non), les FDs expriment l'actine α -SMA, donc ils sont devenu des myofibroblastes (Illustration 38). On peut noter une légère surexpression de l' α -SMA pour les cellules ayant été préalablement traitées par de l'alumine fluorescente. Cependant, toutes les cellules, même dans le puits témoin, n'expriment pas l' α -SMA.

La présence de céramique ne semble pas perturber la mise en place du cytosquelette.

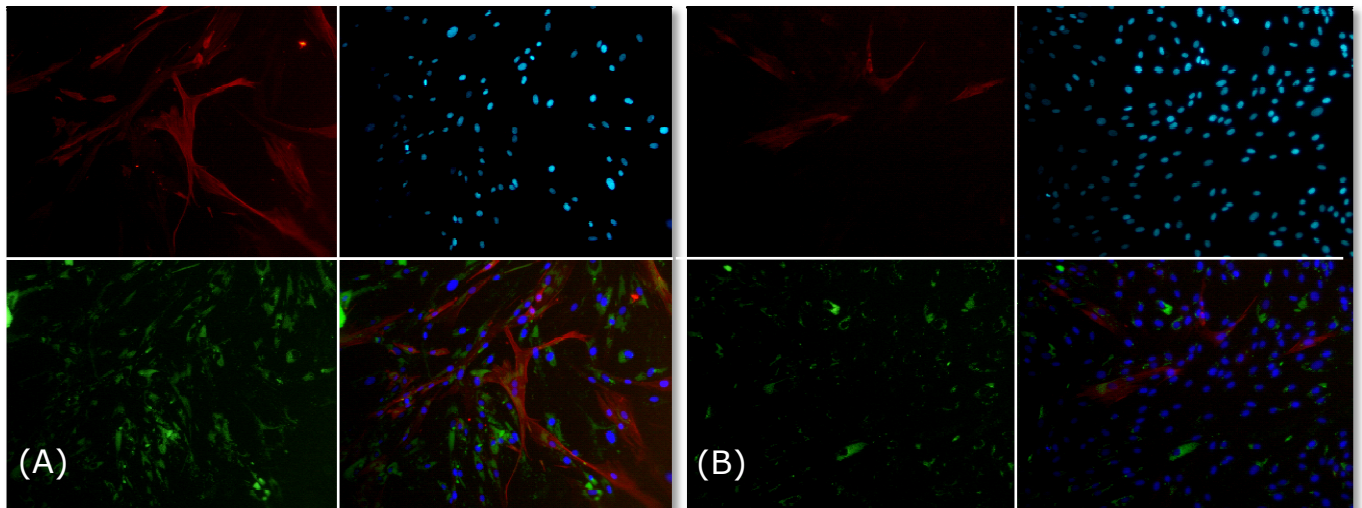
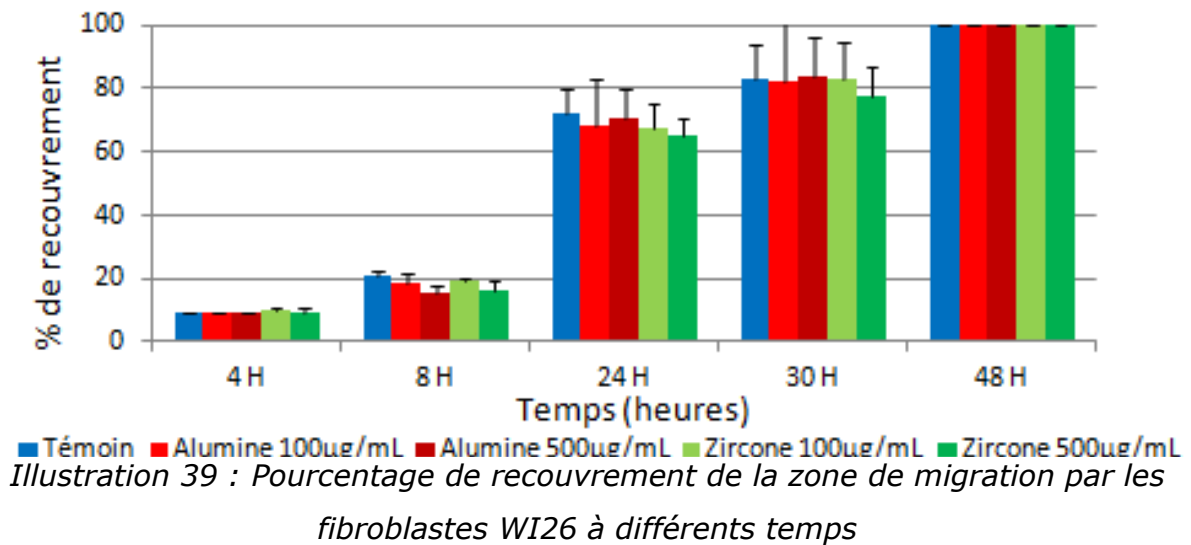


Illustration 38 : Immunofluorescence de (A) FDs traitées par de l'alumine fluorescente (100 µg/mL) puis par le TGFβ1 (5 ng/mL) ; (B) FDs traitées par le TGFβ1 (5 ng/mL) puis par l'alumine fluorescente (100 µg/mL) ; où les filaments d'actine apparaissent en rouge (α-SMA), les noyaux en bleu (DAPI), et la poudre de céramique en vert (FITC)

2.1.6. Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire

Les histogrammes sont obtenus à l'aide du logiciel Image J.

Il apparaît pour les fibroblastes WI26 que la migration est identique quelque que soit le traitement par différentes poudres de céramique à différentes concentrations (différence non statistiquement significative) (Illustration 39). Au bout de 4 heures de migration, seulement 10% de la zone de migration est recouverte. A 24 heures, environ 70% de la zone de migration est recouverte.



2.1.7. Poudres de céramique et derme équivalent

L'évolution du diamètre des DEs est identique, quel que soit le traitement reçu par les fibroblastes WI26 au préalable, c'est-à-dire traités par de l'alumine ou de la zircone-cérium à une concentration de 100 µg/mL ou de 500 µg/mL ou non traités (Illustration 40 A). La rétraction est donc identique (différence non statistiquement significative).

Le but est de savoir si la croissance cellulaire dans les différents DEs est identique et n'influencerait pas la rétraction. Pour cela, une digestion enzymatique est réalisée aux jours 1, 4, 7 et 14.

Quel que soit le traitement, le nombre de fibroblastes WI26 diminue légèrement entre j0 et j1. A j1 la variation du nombre de cellules en fonction du traitement est quasi-nulle (Illustration 40 B). Cependant aux jours 7 et 14, le nombre de cellules est difficile à déterminer en raison du nombre élevé de cellules mortes et de débris cellulaires. Lors d'autres expérimentations de comptage aux jours 1 et 4, l'estimation du nombre de cellules est identique pour toutes les conditions. Aux jours 7 et 14, les estimations diffèrent, allant de $20 \cdot 10^5$ à $60 \cdot 10^5$ cellules à j14 et ne sont pas

reproductibles quelle que soit la concentration ou le type de céramique utilisés.

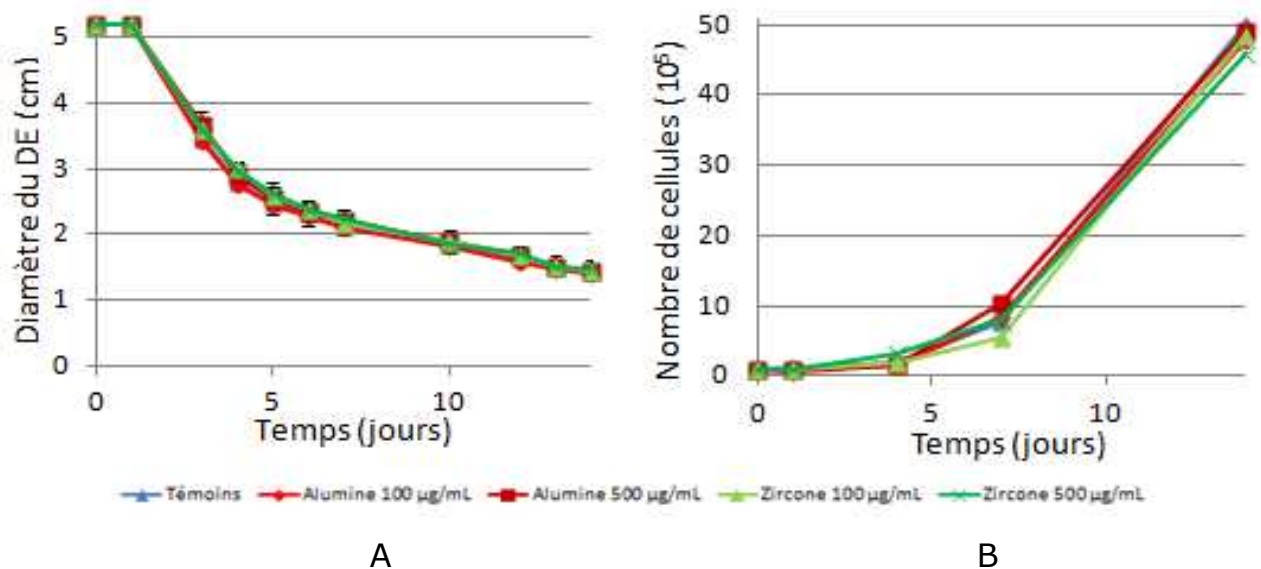


Illustration 40 : Evolution du diamètre des DEs contenant des fibroblastes WI26 pendant 14 jours, traités ou non avec de l'alumine ou de la zircone-cérium à des concentrations de 100 ou 500 µg/mL (A) et croissance cellulaire des DEs contenant des fibroblastes WI26 pendant 14 jours, traités ou non avec de l'alumine ou de la zircone-cérium à des concentrations de 100 ou 500 µg/mL (B)

2.2. Les cellules endothéliales : HUVECs

Une immunofluorescence est réalisée avant tout traitement par de la poudre de céramique de manière à s'assurer de la pureté de la culture primaire des HUVECs.

Les cultures de cellules extraites à partir des cordons ombilicaux contiennent environ 90% d'HUVECs. Les différentes expériences prévues pourront donc être réalisées.

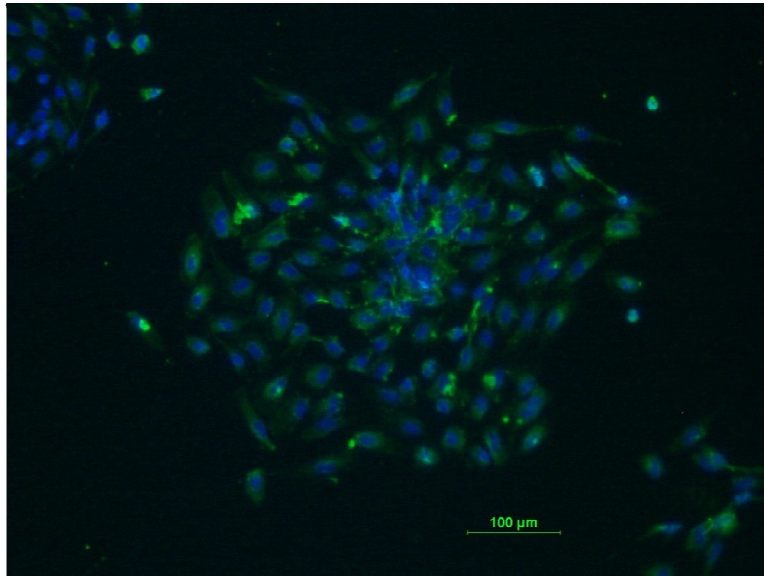


Illustration 41 : Cellules extraites d'un cordon après 48 heures de culture observées en microscopie à fluorescence ; noyau : DAPI (bleu) ; corps de Weibel-Palade : facteur Von Willebrand (vert)

2.2.1. Traitement par les poudres de céramique

Aucune modification morphologique n'est observée entre les cellules traitées, quelle que soit la concentration en céramique, et les cellules non traitées. En revanche, l'incorporation de poudre semble plus homogène que pour les FDs.

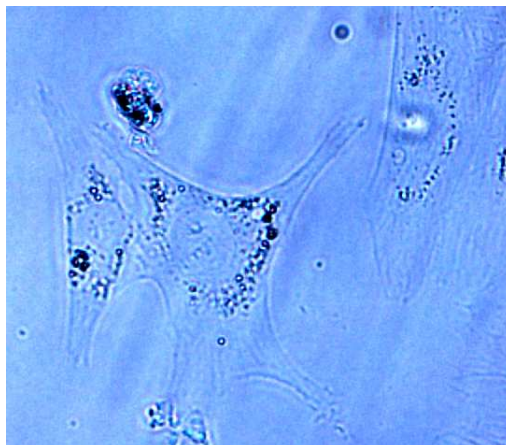


Illustration 42 : HUVECs traités par de l'alumine NanoTEK®, 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)

2.2.2. Coloration

Les HUVECs semblent incorporer les poudres de céramique, cependant cette incorporation paraît moins importante que pour les fibroblastes (Illustration 43). De plus, la présence de ces poudres ne semble pas induire une plus grande mortalité cellulaire que la population témoins. Néanmoins il faudrait confirmer ce résultat par un test de viabilité.

De manière à affirmer que les HUVECs incorporent les poudres de céramique, des acquisitions en microscopie confocale sont réalisées.

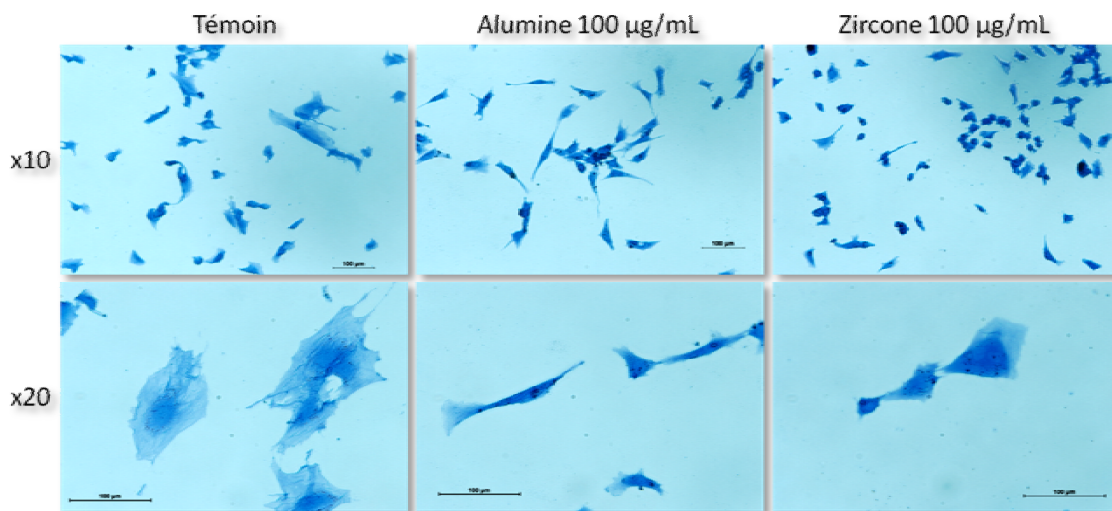


Illustration 43 : HUVECs colorés au BCB à différents grossissements et traités par différentes céramiques (100 µg/mL), 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)

2.2.3. Microscopie confocale

2.2.3.1. Microscopie confocale

Le noyau est marqué en bleu par le DAPI, les membranes sont marquées en rouge par le facteur anti-Von Willebrand et la poudre de céramique est marquée en vert par le FITC. Aucune modification morphologique n'est observée entre les cellules traitées et les cellules non traitées.

En 2D (Illustration 44), les poudres de céramique semblent bien être contenues dans les cellules, ce qui est confirmé par une reconstruction 3D (Illustration 45). Les résultats obtenus en microscopie confocale pour HUVECs sont comparables aux résultats concernant les fibroblastes WI26.

La microscopie électronique n'a pu être réalisée par manque de temps. Cependant, il serait probable d'observer une membrane classique en bicouche autour des agrégats de poudre de céramique, en regard des résultats obtenus avec les fibroblastes WI26.

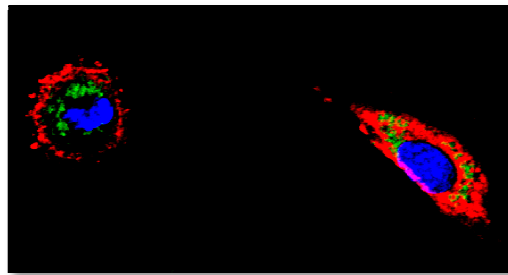


Illustration 44 : HUVECs traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; corps de Weibel-Palade : facteur Von Willebrand membrane (rouge) ; poudre de céramique (vert) : FITC

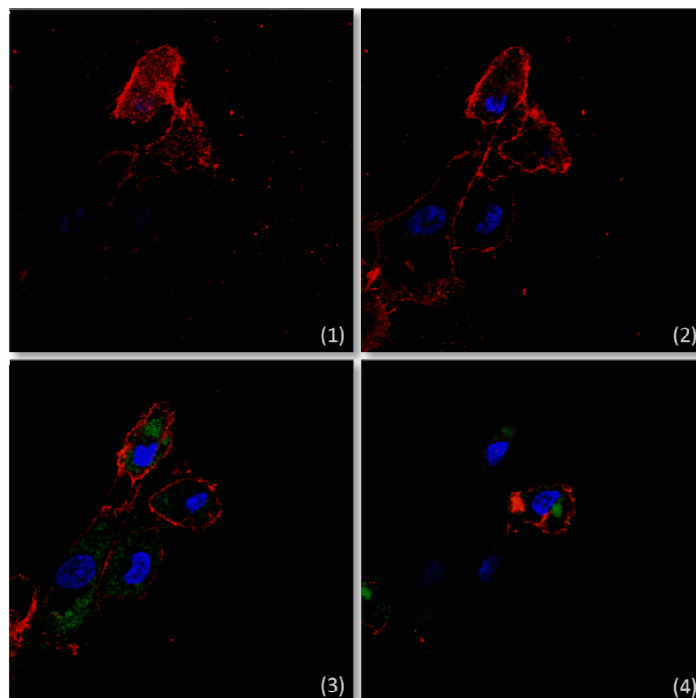


Illustration 45 : Vue dans l'épaisseur d'HUVECs traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC

2.2.4. Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire

Les profils des histogrammes sont similaires à ceux correspondant au pourcentage de recouvrement de la zone de migration par les fibroblastes WI26. Cependant, la fermeture n'est toujours pas complète même après 72 heures. L'essai n'a pu être réalisé qu'une seule fois. Il serait donc nécessaire de réitérer ce test de migration de manière à pouvoir conclure sur l'impact de la présence de céramique sur la migration de ces cellules.

3. DISCUSSION

La céramique est un matériau de plus en plus utilisé dans l'élaboration de prothèse médicale en raison de ses multiples propriétés et avantages, tels que la solidité ou encore la résistance à l'usure. Par rapport à des prothèses de hanche en métal, la production de débris d'usure est retardée et réduite, évitant une nouvelle intervention chirurgicale trop rapidement. Néanmoins, l'impact de ces débris de céramique sur les cellules autour de la prothèse reste mal connu. Dans ce travail, l'alumine NanoTEK® de 47 nm de diamètre et la zircone-cérium de 880 nm de diamètre, deux types de poudres de céramique employées dans l'élaboration de prothèse médicale, ont été utilisées. Afin de se rapprocher du comportement des fibroblastes *in vivo*, l'équivalent d'un derme humain ou DE a été mis au point dans le laboratoire. Ceci nous permet d'étudier l'interaction des fibroblastes avec leur environnement non plus en monocouche (2D) mais en 3D. L'incorporation de la céramique par les FDs s'avérant hétérogène, résultat confirmé par SdFFF et observation biologique, une lignée cellulaire a été choisie. Dans cette lignée cellulaire, les WI26, l'incorporation de céramique à différentes concentrations ne modifie ni le comportement biologique en 2D (migration, prolifération, division, interaction) ni le comportement en 3D (rétraction du DE). Par des méthodes de microscopie confocale et de microscopie électronique, une membrane autour des poudres de céramique est observée dans les cellules. Les différentes expérimentations concernant les fibroblastes ont été reproduites sur un autre type cellulaire, les HUVECs. Ce type cellulaire est réputé très fragile et sensible aux moindres variations physiologiques. Compte-tenu de l'absence de toxicité de ces poudres, leur utilisation comme vecteur thérapeutique peut être envisagée.

Les poudres d'alumine NanoTEK® et de zircone-cérium nous ont été fournies par Monsieur le Professeur D Hartmann (Université de Lyon, Faculté de Pharmacie, UPSP 2007-135-03-TR12B). Elles ont été étudiées par M Azar (Azar, 2009) ainsi que H El-Attaoui (El-Attaoui, 2003) dans le

cadre de leurs thèses. La poudre d'alumine fluorescente nous a été fournie par l'équipe de Monsieur F Rossignol (Responsable Equipe Procédés Céramiques, UMR CNRS 7315). Le choix de ces poudres est d'autant plus intéressant et important qu'elles présentent une excellente biocompatibilité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Grey et al., 1993 ; Christel et al., 1988 ; Hayashi et al., 1992 ; Olmedo et al., 2011). Les concentrations étudiées ont été 100 et 500 µg/mL. Le traitement ne semble pas induire de toxicité pour les cellules. Au contraire D D Dean (Dean et al., 1999) et C H Lohmann (Lohmann et al., 2000), qui ont utilisés des particules métalliques ont établi une relation entre la phagocytose de ces particules et de nombreuses altérations cellulaires. Ils constatent une large modification des constituants cytoplasmiques sur des ostéoblastes MG63 traités par ces particules métalliques : les mitochondries sont larges et gonflées, l'appareil de Golgi possède de grandes extensions, le réticulum endoplasmique rugueux est réduit et des inclusions granulaires sont retrouvées. Les cellules développent des extensions cytoplasmiques et la membrane cellulaire apparait froissée. De plus, une diminution significative de la prolifération cellulaire, de l'activité des phosphatases alcalines, du TGFβ₁ et une augmentation du taux de PGE₂ sont constatées. Tout ceci démontre la toxicité, pour les cellules traitées, des particules métalliques.

Pour les trois types cellulaires (FDs, WI26 et HUVECs), aucune modification morphologique n'est observée en contraste de phase entre les cellules traitées, quelle que soit la concentration en céramique, et les cellules non traitées (Illustration 32 ; 34 ; 43). Pour les cellules traitées, la poudre se localise préférentiellement autour du noyau. Plus la concentration en alumine et zircone-cérium augmente et plus les cellules semblent contenir de poudre. La répartition des particules de céramique dans les FDs traitées par 100 µg/mL n'est pas homogène. En effet, certaines cellules sont remplies de céramique alors que d'autres n'en contiennent que très peu ou pas du tout. Lors de l'utilisation de la lignée WI26, l'incorporation des poudres de céramique semble plus homogène.

Lors du passage en SdFFF, deux sous-populations pour les cellules FDs traitées par de l'alumine 500 µg/mL peuvent être détectées. La SdFFF met donc en évidence une hétérogénéité d'incorporation de la poudre de céramique. En revanche, les cellules WI26 présentent un profil de fractogramme quasi identique avec les cellules témoins. Il est alors impossible de différencier les cellules traitées des cellules non traitées (Illustration 33 (B)). L'incorporation de la céramique apparaît donc beaucoup plus homogène.

Les colorations au BCB (Illustration 34 et 43), montrent que les cellules traitées ou non ne présentent pas de variation morphologique, quelle que soit la concentration de céramique utilisée pour le traitement. Les fibroblastes de la lignée WI26, contrairement au FDs, incorporent de façon homogène les céramiques à différentes concentrations ce qui confirme les résultats de SdFFF. La lignée cellulaire WI26 a donc été utilisée pour la suite des expérimentations.

Nos résultats obtenus en microscopie électronique et en microscopie confocale viennent confirmer les observations faites par B Liagre (Liagre et al., 1997) selon lesquelles la céramique serait internalisée grâce à des vésicules d'endocytose caractérisées par la présence d'une membrane classique en bicouche.

Pour les expérimentations de migration, le taux de SVF a été volontairement diminué afin d'évaluer uniquement la capacité de migration et ainsi de s'affranchir de la capacité de prolifération des cellules. Il apparaît pour les fibroblastes WI26 que la migration est identique quel que soit le traitement par différentes poudres de céramique à différentes concentrations. Les résultats de migration concernant les HUVECs ne peuvent être interprétés ; cependant, une tendance qui semble reproduire les observations obtenues avec les fibroblastes WI26 peut être observée.

Des DEs ont été utilisés afin de se rapprocher du comportement des fibroblastes *in vivo*. Dans les travaux de F Grinnell (Grinnell et al., 2010), des fibroblastes évoluent dans une matrice de collagène et un parallèle entre migration et rétraction est fait. Dans un DE, les cellules se

comportent différemment en fonction de l'état de la matrice. En effet, quand la matrice est rigide, ce sont les cellules qui migrent, à l'inverse, quand la matrice n'est pas rigide, les cellules rétractent la matrice de collagène, ce qui est le cas dans notre étude. Nous pourrions nous attendre à ce que les fibroblastes WI26 où la concentration en céramique est la plus élevée, rétractent moins vite la matrice de collagène ; or, les DEs rétractent tous et de façon identique, qu'ils soient traités par de la céramique ou non à différentes concentrations. Des coupes de DEs en paraffine à j14 ont été colorées à l'hématoxyline éosine. Les noyaux apparaissent bleus violets, le cytoplasme est rose, les fibres de collagène rose orangées, et les poudres de céramique sont marrons (Annexe 1). Des poudres de céramique sont retrouvées dans le cytoplasme des fibroblastes, mais également quelques amas dans le réseau de collagène. Il ne nous est pas possible de conclure sur la provenance de ces poudres : sont-elles relargées par les cellules au cours de l'expérimentation dans les DEs, ou sont-elles apportées lors de l'élaboration des DEs.

Les études histologiques de ces coupes confirment les observations de Lohmann (Lohmann et al., 2002) sur les ostéoblastes MG63. Dans ces travaux, la nature de la réponse cellulaire varie en fonction de la nature chimique et du nombre de particules. Dans cette étude, l'alumine, la zircone et des particules de PMMA (polyméthylméthacrylate) ont été analysées. Lors de la culture cellulaire, les particules d'alumine, de diamètre $1,09 \pm 0,15 \mu\text{m}$, sont directement en contact avec les cellules. Or, dans notre étude, nous ne constatons pas de réponse cellulaire différente en fonction du nombre de particules, que ce soit au niveau de la migration cellulaire comme au niveau de la rétraction des DEs. Dans ce même article, les particules semblent être incorporées, et des études plus poussées montrent un changement marqué de la morphologie cellulaire, ce qui n'est pas le cas pour les cellules (fibroblastes ou HUVECs) que nous utilisons. En accord avec ces travaux, les particules sont intégrées dans le cytosol et aucune particule n'est retrouvée dans le noyau.

Les nanoparticules inorganiques, tels que les oxydes de fer, la silice ou l'or, ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leurs facilités de manipulation, leurs biocompatibilités et leurs chimies de surface appropriées. Cependant, lors de leurs usages comme vecteur thérapeutique, la toxicité de ces particules représentait une grave préoccupation (Bose et al., 2012). Le phosphate de calcium présente une excellente biocompatibilité et une excellente biodégradation car c'est un composant naturel de la matrice osseuse. De plus, les nanoparticules en céramique ne présentent pas de modifications de la porosité avec le pH. Par conséquent, ces particules peuvent protéger efficacement les différentes macromolécules, telles que les enzymes, contre la dénaturation induite par des changements de pH externe et de température (Parveen et al., 2012). Le phosphate de calcium est utilisé sous différentes formes, notamment des nanoparticules sphériques, surface de revêtement, ciment ou encore matrice piégeant certains facteurs de croissance. Sur les nanoparticules sphériques, des protéines, de l'ARN ou encore de l'ADN est greffé. Elles sont utilisées dans le traitement de certains cancers comme le cancer du colon, où un gène suicide greffé sur des particules de céramique de 1 à 10 μm de diamètre est injecté dans la masse tumorale chez des souris (Zhang et al., 2009). Il a été rapporté que les nanoparticules de silice poly-L-lysine étaient un vecteur original pour la délivrance de gène par voie orale (Li et al., 2005).

De plus, ces vecteurs thérapeutiques en céramique apportent de nombreux avantages, comme l'augmentation de la solubilité en milieu aqueux des drogues, leur protection, leur libération prolongée, ainsi que la diminution de leurs effets secondaires. En regard de nos résultats, il serait envisageable de « greffer » des molécules sur nos poudres de céramique. Ceci est d'autant plus envisageable qu'aucune variation biologique n'est observée que ce soit avec les fibroblastes, ou avec une population plus fragile, les HUVECS.

4. PERSPECTIVES

Quelle que soit la concentration et quelles que soit les particules de céramique, la morphologie et l'étalement cellulaire sont, dans nos conditions, inaltérés en 2D comme en 3D. La céramique se retrouve principalement autour du noyau.

Seule la poudre d'alumine a été testée par SdFFF. Il serait intéressant de tester également la zircone-cérium de manière à comparer les résultats avec les FDs et les WI26. Lors du fractionnement des FDs, deux sous-populations peuvent être mises en évidence, F1 et F2. Théoriquement les cellules les plus grandes et les moins denses (F1) sortent en premier et les cellules de la fraction F2, les moins grandes et plus denses, sortent en dernier. Sur ces populations, des essais préliminaires de migration ont été effectués. Il s'avère que les cellules les moins chargées en céramique (F1) migrent plus rapidement que les cellules les plus chargées (F2). Nous pouvons alors nous demander si cette différence de migration est due à l'hétérogénéité de la population fibroblastique (les fractions F1 et F2 n'auraient pas la même capacité de migration), ou si elle est due à la présence de la céramique. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de renouveler le fractionnement en SdFFF et ainsi de mieux caractériser les fractions cellulaires obtenues. La méthode de séparation employée pour les cellules WI26 ne nous permet pas de différencier les cellules traitées des cellules non traitées. L'incorporation de la poudre semble donc plus homogène.

Ce résultat est confirmé par l'observation des cultures en microscopie à contraste de phase, comme en coloration au BCB. Les images obtenues en microscopie confocale ont démontré que les poudres de céramique pénétraient bien dans les cellules. De plus, grâce aux images obtenues au microscope électronique, une membrane classique autour des poudres de céramique a pu être mise en évidence. Il serait intéressant de caractériser la voie d'internalisation de ces poudres.

Il semble possible que lors de la réalisation de la suspension de céramique en vue de traiter les fibroblastes, certains facteurs contenus dans le SVF puissent se « greffer » sur la poudre de céramique. Des poudres de céramique ont été incubées dans du milieu complet pendant 24h. Après plusieurs lavages au PBS, du triton 1X a été utilisé pour décoller d'éventuelle protéine de la surface des poudres de céramique. Un dosage des protéines du surnageant a été réalisé et a montré la présence de protéines (0,398 mg/mL Annexe 2). Après migration sur gel, deux bandes principales ont été identifiées. L'analyse par spectrométrie de masse a montré qu'il s'agissait de l'albumine et de l'apolipoprotéine A1. Il serait intéressant de cultiver les fibroblastes WI26 dans un milieu ne contenant pas d'albumine ni d'apolipoprotéine A1 de manière à pouvoir observer si l'incorporation des poudres est identique. De plus, des suspensions d'alumine 100 µg/mL ont été préparées et laissées à 4°C sous agitation, une dans du PBS et l'autre dans du SVF 100%. Après 24 h, des cellules WI26ensemencées à $0,375 \cdot 10^6$ cellules dans un flacon T75, sont traitées avec ces suspensions. Une estimation du nombre de cellules par comptage est réalisée 3 jours plus tard. Il apparaît que le nombre de cellules traitées par de l'alumine ayant séjournée dans le SVF est 27,09 % supérieure au nombre de cellules traitées par de l'alumine ayant séjournée dans le PBS. Cette expérience préliminaire semble montrer que les particules de céramique, en internalisant des protéines du sérum, favoriseraient la prolifération des cellules. Néanmoins, le mécanisme de « relargage » de ces protéines reste indéterminé.

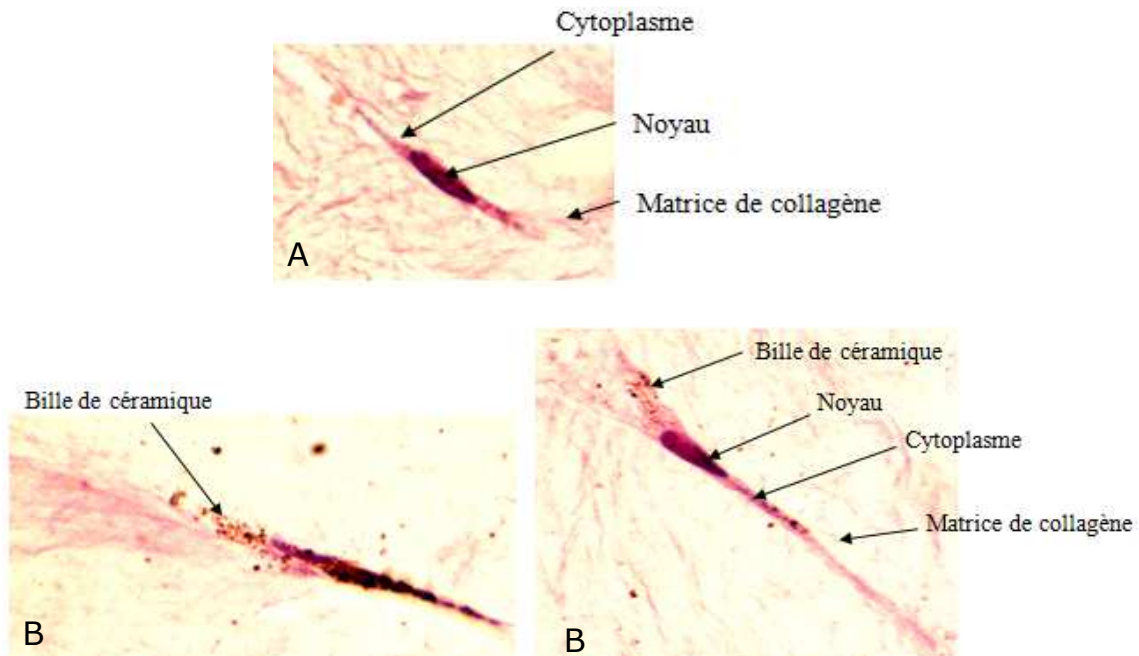
Selon les études de Yagil-Kelmer (Yagil-Kelmer et al., 2004), les particules d'alumine de différentes tailles affectent la production de cytokines inflammatoires par des monocytes humains en culture. Cette hypothèse est testée sur une lignée de monocytes humains U937 et sur des monocytes primaires sanguins humains. Le traitement est de 100 particules par cellules avec des poudres d'alumine de 0,5 ou 1,5 µm de diamètre. L'expression génétique de 12 cytokines différentes est mesurée par RT-PCR. Pour les cellules U937 traitées par la poudre de 0,5 µm, il est constaté

une augmentation des interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-8, IL-10 et du tumor necrosis factor- α (TNF- α). La variabilité de l'expression des cytokines dans les monocytes primaires sanguins humains (obtenus à partir de donneurs) est supérieure à la lignée cellulaire mais une tendance similaire est observée. Les particules de 0,5 μm apparaissent moins biocompatibles. En effet, elles affectent la production de cytokines inflammatoires. Dans notre modèle, il serait important de réaliser des études sur le processus inflammatoire de façon à voir l'impact des particules de céramique.

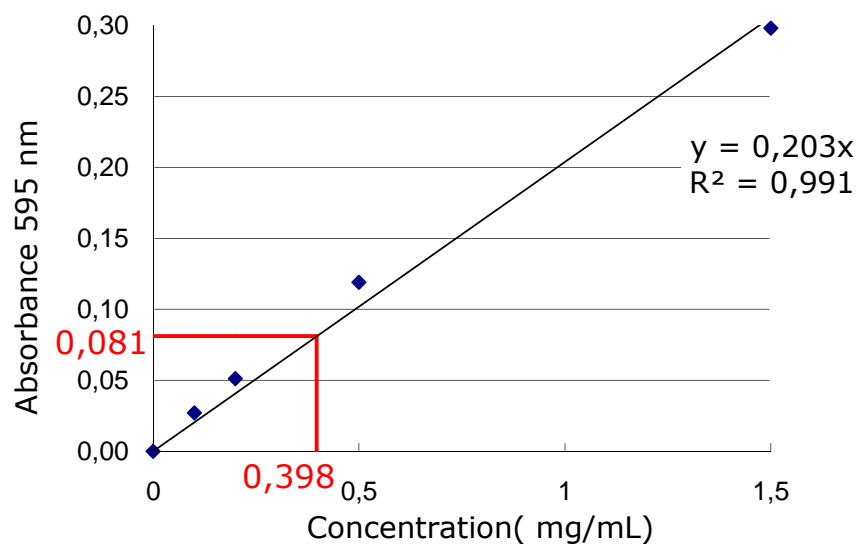
Le traitement par les poudres de céramique sur un type cellulaire fragile et exigeant, les HUVECs, n'entraîne pas de variation significative. Ces observations viennent confirmer les résultats obtenus sur les WI26.

Enfin, de façon à réaliser des études *in vivo* et à pouvoir suivre la répartition des poudres dans l'organisme sans sacrifier l'animal, il serait intéressant de pouvoir synthétiser des billes de céramique avec un traceur radioactif. Toutefois des études *in vivo* pourront être envisagées avec la poudre d'alumine fluorescente ; elles permettront de travailler sur des organes particuliers, comme le foie, de manière à apprécier notamment la biodégradation de cette poudre.

ANNEXES



Annexe 1 : Fibroblaste FDs non traité (A) et traité par de l'alumine 1000 µg/mL (B) après inclusion en paraffine et marquage hématoxyline éosine d'un DE à j14



Annexe 2 : Dosage selon la méthode de Bradford permettant de mettre en évidence les protéines sériques qui se sont fixées sur la poudre de céramique

BIBLIOGRAPHIE

- Al Battah F, De Kock J, Vanhaecke T and Rogiers V. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *The Scientific World Journal*, 2011, 11, 1568–81.
- Amadeu TP, Coulomb Bernard, Desmouliere A and Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *The international journal of lower extremity wounds*, 2003, 2 (2), 60–8.
- Antimisiaris SG, Kallinteri P and Fatouros DG. Liposomes and Drug Delivery, in *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Hoboken, NJ,USA, John Wiley & Sons, Inc.,2007, 1397p., p.443-534. doi: 10.1002/9780470259818.ch13
- Azar M. Mise en forme et frittage des poudres de céramique nanostructurées : Cas d'une alumine de transition. Thèse de doctorat d'université. Lyon : Institut National des Sciences Appliquées (INSA), 2009, 146 p.
- Battu S, Cook-Moreau Jm and Cardot PJP. Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J. Liq. Chromatogr. Rela. Technol*, 2002, 25:2193-2210.
- Battu S, Elyaman W, Hugon J and Cardot PJP. Cortical cell elution by sedimentation field-flow fractionation. *Biochimica and biophysica acta*, 2001, 1528 (2-3), 89–96.
- Bose S and Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta biomaterialia*, 2012, 8 (4), 1401–21.
- Boutin P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. *A Review de Chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*, 1972, 58 (3), 229–46.
- Bégaud-Grimaud G, Battu S, Lazcoz P, Castresana JS, Jauberteau MO and Cardot PJP. Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *International journal of oncology*, 2007, 31 (4), 883–92.
- Cailleateau C, Liagre B, Battu S, Jayat-Vignoles C and Beneytout JL. Increased cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase expression is

- implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Analytical biochemistry*, 2008 380 (1), 26–34.
- Cardot PJP, Battu S, Sarrazin R. Field flow fractionation separation device with a separation channel and a counter channel, Eur. Pat. Appl., 2006a Ep. 20p.
- Cardot PJP, Battu S, Sarrazin R. Swivel joint for conduits used in Analytical chemistry, Fr. Demande, 2006b, Fr. 25p.
- Christel P, Meunier A, Dorlot JM, Crolet JM, Witvoet J, Sedel L and Boutin P. Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopedic surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988, 523, 234–56.
- Comte I, Battu S, Mathonnet M, Bessette B, Lalloué F, Cardot PJP and Ayer-Le Lièvre C. Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2006, 843 (2), 175–82.
- Coulomb B, Lebreton C and Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *The Journal of investigative dermatology*, 1989, 92 (1), 122–5.
- Darby I, Skalli O and Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1990, 63 (1), 21–9.
- Dean DD, Schwartz Z, Liu Y, Blanchard CR, Agrawal CM, Mabrey JD, Sylvia VL, Lohmann CH and Boyan BD. The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro. *The Journal of bone and joint surgery*, 1999, 81 (4), 452–61.
- Desmoulière A, Chaponnier C and Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound repair and regeneration*: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society, 2005, 13 (1), 7–12.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F and Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 1993, 122 (1), 103–11.
- El Attaoui H. Influence du renforcement sur le comportement en fatigue statique et cyclique des céramiques monolithiques de type alumine et

- zircone. Thèse de doctorat d'université. Lyon : Institut National des Sciences Appliquées (INSA), 2003, 142 p.
- Fernández-Fairén M, Sala P and Gil FJ. Failures of yttria-stabilised tetragonal zirconia: 52 retrieved ceramic femoral heads of total hip prostheses. *Bio-medical materials and engineering*, 2006, 16 (6), 415–22.
- Giddings JC. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science*, 1993, 260 (5113), 1456–65.
- Grinnell F and Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annual review of cell and developmental biology*, 2010, 26, 335–61.
- Grey NJ, Piddock V and Wilson MA. In vitro comparison of conventional crowns and a new all-ceramic system. *Journal of dentistry*, 1993, 21(1), 47–51.
- Gutwein LG and Webster TJ. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials*, 2004, 25 (18), 4175–83.
- Hayashi K, Matsuguchi N, Uenoyama K and Sugioka Y. Re-evaluation of the biocompatibility of bioinert ceramics in vivo. *Biomaterials*, 1992, 13 (4), 195–200.
- Hulbert SF, Morrison SJ and Klawitter JJ. Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. *Journal of biomedical materials research*, 1972, 6 (5), 347–74.
- Institut de la hanche. Evolution des prothèses de hanche. [en ligne]. Disponible sur <http://www.institut-hanche.com/evolution-prothese-hanche.php>. (Page consultée le 15/03/12)
- Jiménez N, Krouwer VJD and Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology*, 2012, doi 10.1007/s10616-012-9459-9
- Kim MJ, Shin KS, Jeon JH, Lee DR, Shim SH, Kim JK, Cha D-H, Yoon TK and Kim GJ. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. *Cell and tissue research*, 2011, 346 (1), 53–64.
- Le Hir A. Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 8ième édition. Issy-les-Moulineaux : Masson 2006, 402p. p.202-204

- Leong CC, Syed NI and Lorscheider FL. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. *Neuroreport*, 2001, 12 (4), 733–7.
- Li Z, Zhu S, Gan K, Zhang Q, Zeng Z, Zhou Y, Liu H, Xiong W, Li X and Li G. Poly-L-lysine-modified silica nanoparticles: a potential oral gene delivery system. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2005, 5 (8), 1199–203.
- Liagre B, Charissoux JL, Leboutet MJ, Bernache-Assollant D and Beneytout JL. Interactions of hydroxyapatite and fluorapatite particles on human osteoarthritis type B synoviocytes: effects on interleukin-1 alpha levels and lipoxigenase pathways. *Journal of biomedical materials research*, 1997, 38 (3), 243–56.
- Lohmann C. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. *Biomaterials*, 2002, 23 (8), 1855–1863.
- Lohmann C, Schwartz Z, Köster G, Jahn U, Buchhorn G, MacDougall M, Casasola D, Liu Y, Sylvia V, Dean D and Boyan B. Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*, 2000, 21 (6), 551–561.
- Miron-Mendoza M, Seemann J and Grinnell F. The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices. *Biomaterials*, 2010, 31 (25), 6425–35.
- Olmedo DG, Tasat DR, Evelson P, Rebagliatti R, Guglielmotti MB and Cabrini RL. In vivo comparative biokinetics and biocompatibility of titanium and zirconium microparticles. *Journal of biomedical materials research*, 2011, Part A. 98 (4), 604–13.
- Parveen S, Misra R and Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*: nanotechnology, biology, and medicine, 2012, 8 (2), 147–66.
- Pôle Européen de la Céramique. [en ligne]. Disponible sur <http://www.cerameurop.com>. (Page consultée le 03/01/12)
- Pons-Guiraud A. Adverse reactions to injectable fillers. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 2009, 136 Suppl , S293–8.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ and Lemons J. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. *Biomaterials Science*, 2004, 864p. p1-20.
- Roualdes O, Duclos M-E, Gutknecht D, Frappart L, Chevalier J and Hartmann DJ. In vitro and in vivo evaluation of an alumina-zirconia

composite for arthroplasty applications. *Biomaterials*, 2010, 31 (8), 2043–54.

Roualdes O. Evaluation in vitro et in vivo de la biocompatibilité d'une céramique composite d'alumine-zircone pour usage orthopédique et de ses poudres constitutives. Thèse de doctorat d'université. Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1, 2009, 224p.

Yagil-Kelmer E, Kazmier P, Rahaman MN, Bal BS, Tessman RK and Estes DM. Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. *Journal of orthopaedic research* □: official publication of the Orthopaedic Research Society, 2004, 22 (4), 832–8.

Zhang G, Liu T, Chen Y-H, Chen Y, Xu M, Peng J, Yu S, Yuan J and Zhang X. Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene in vitro and in vivo. *Clinical cancer research* □: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009, 15 (1), 201–7.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	1
SOMMAIRE.....	3
INTRODUCTION.....	7
Première Partie - Étude bibliographique.....	9
1. Anatomie et histologie de la peau humaine.....	10
1.1. La peau.....	10
1.2. Les fibroblastes.....	12
1.3. Derme équivalent.....	13
2. Histologie des vaisseaux et structure du cordon ombilical.....	14
2.1. Les veines.....	14
2.2. Les artères.....	15
2.3. Structure d'un cordon ombilical.....	16
2.3.1. Entre 8 semaines et 3 mois.....	16
2.3.2. A terme.....	17
2.4. Les cellules endothéliales : HUVECs.....	17
3. La Céramique.....	19
3.1. Généralités.....	19
3.2. Utilisation de la céramique dans le domaine médicale.....	20
3.2.1. Prothèses de première génération.....	20
3.2.2. Prothèses de deuxième génération.....	22
3.2.3. Prothèses de troisième génération.....	24
3.2.4. Prothèses dentaires.....	24
3.2.5. Chirurgie esthétique.....	26
3.3. L'alumine.....	29
3.4. La zircone-cérium.....	30
4. Méthode de tri cellulaire.....	32

4.1.	Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'élution inertiel	32
4.2.	Mise au point du matériel	36
4.3.	Tri cellulaire par SdFFF	38
5.	Observation des cellules	39
5.1.	La microscopie optique.....	39
5.1.1.	La microscopie à transmission	40
5.1.2.	La microscopie à fluorescence	41
5.2.	La microscopie électronique	42
6.	Immunofluorescence.....	42
7.	Pharmacocinétique	43
7.1.	Absorption.....	43
7.2.	Distribution.....	44
7.3.	Métabolisation.....	45
7.4.	Élimination	45
7.5.	Vecteur thérapeutique.....	46
7.5.1.	Vecteur de 1 ^{ère} génération	47
7.5.2.	Vecteur de 2 ^{ème} génération	47
7.5.3.	Vecteur de 3 ^{ème} génération	48
7.5.4.	Vecteur en céramique	48
Deuxième Partie - Études expérimentales		50
1.	Matériel et méthodes	51
1.1.	Matériel.....	51
1.2.	Culture cellulaire	52
1.2.1.	Fibroblastes dermiques humains (FDs)	52
1.2.2.	Lignée de fibroblastes WI26.....	53
1.2.3.	Cellules endothéliales de cordon (HUVECs)	53
1.2.4.	Entretien cellulaire et ensemencement	54
1.2.5.	Comptage.....	54

1.3.	Traitement par les poudres de céramique	55
1.4.	Méthode de séparation	56
1.5.	Coloration.....	57
1.6.	Microscopie.....	58
1.6.1.	Microscopie confocale.....	58
1.6.2.	Microscopie électronique.....	58
1.7.	Immunofluorescence.....	59
1.7.1.	Les cellules endothéliales.....	59
1.7.2.	Les fibroblastes	60
1.8.	Migration cellulaire	61
1.9.	Derme équivalent	62
1.9.1.	Le collagène.....	62
1.9.2.	Réalisation d'un derme équivalent	62
1.9.3.	Digestion du derme équivalent	63
1.10.	Etude statistique.....	63
2.	RESULTATS	64
2.1.	Fibroblastes FDs et WI26.....	64
2.1.1.	Traitement par les poudres de céramique	64
2.1.2.	Incorporation de la poudre de céramique dans les fibroblastes.....	65
2.1.3.	Coloration au BCB.....	66
2.1.4.	Microscopie.....	67
2.1.5.	Influence des poudres de céramiques sur l'organisation du cytosquelette.....	70
2.1.6.	Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire	71
2.1.7.	Poudres de céramique et derme équivalent.....	72
2.2.	Les cellules endothéliales : HUVECs	73
2.2.1.	Traitement par les poudres de céramique	74

2.2.2.	Coloration.....	75
2.2.3.	Microscopie confocale.....	75
2.2.4.	Influence des poudres de céramique sur la migration cellulaire	77
3.	DISCUSSION	78
4.	Perspectives	83
	ANNEXES.....	86
	BIBLIOGRAPHIE.....	87
	TABLE DES MATIERES	92
	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	96
	TABLE DES TABLEAUX.....	100
	SERMENT DE GALIEN	101

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Illustration 1 : Coupe histologique de peau (www.lampe-collagene.com) .	11
Illustration 2 : Tissu conjonctif (http://associationpourlasanteetlenvironnement.skynetblogs.be).....	11
Illustration 3 : Fibroblaste et produits de synthèses (http://associationpourlasanteetlenvironnement.html)	12
Illustration 4 : Fibroblastes en culture dans un milieu complet en microscopie à contraste de phase (A=x4 / B=x10).....	12
Illustration 5 : Coupe histologique (coloration hématoxyline-éosine) et schéma d'une veine (http://www.snv.jussieu.fr).....	14
Illustration 6 : Coupe et schéma d'une artère (http://www.snv.jussieu.fr)	15
Illustration 7 : Comparatif des structures présentes dans deux cordons, un à 8 semaines, l'autre à 3 mois (www.embryology.ch).....	16
Illustration 8 : Cellules endothéliales obtenues à partir d'un cordon ombilical après 48 heures de culture observées en microscopie à contraste de phase.....	18
Illustration 9 : Représentation schématique de l'état d'empilement des particules de céramique pressés (à gauche) et coulés (à droite), présentant la même densité (même nombre de particule, même volume).....	21
Illustration 10 : Comparaison schématique de la production annuelle en débris d'usure pour une année d'utilisation dans des conditions normales	23
Illustration 11 : Prothèse de resurfaçage (http://www.chirurgie-orthopedique-toulouse.fr/).....	24
Illustration 12 : Terminaison nerveuse (neurone de rat) avant ou après l'ajout de mercure.....	25

Illustration 13 : Injection de RADIESSE® (microbilles de céramique contenues dans un gel de carboxyméthyl cellulose sodique) (www.radiesse.com)	28
Illustration 14 : Avant et après injection de RADIESSE® (www.radiesse.com)	28
Illustration 15 : Poudre d'alumine fluorescente (600 nm de diamètre) (d'après A M Piechowiak)	30
Illustration 16 : Schémas des structures cristallographiques quadratique (ou tétragonale) et monoclinique	30
Illustration 17 : Passage de la forme quadratique métastable de zircon à la forme monoclinique au niveau des berges d'une fissure	31
Illustration 18 : Schéma général d'un canal de séparation de FFF	33
Illustration 19 : Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel.....	35
Illustration 20 : Profil d'éluion des fibroblastes dermiques FDs (fractogramme) traités par 1000 µg/mL d'alumine	36
Illustration 21 : Prototype de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite)	37
Illustration 22 : Diffraction d'un rayon lumineux	40
Illustration 23 : Tache de Airy ; (A) image en 2 dimensions (X, Y) ; (B) image en 3 dimensions (X, Y, Z) (http://www.glafreniere.com/optique/airy.htm).....	41
Illustration 24 : Technique d'immunofluorescence. (1) fixation de l'anticorps primaire ; (2) fixation de l'anticorps secondaire) ; (3) excitation du fluorochrome par un laser ; (4) émission de fluorescence	43
Illustration 25 : Vecteurs thérapeutiques de 1 ^{ère} génération (A), de 2 ^{ème} génération (B), et de 3 ^{ème} génération (d'après CNRS).....	47
Illustration 26 : Différents type de vecteurs thérapeutiques en phosphate de calcium	49
Illustration 27 : Chronologie de traitement par les poudres d'alumine NanoTEK® et de zircon-cérium à des concentrations de 100 et 500 µg/mL	56

Illustration 28 : Fractogramme des fibroblastes FDs traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK®	57
Illustration 29 : Chronologie de traitement par 100 µg/mL d'alumine marquée au FITC lors de l'observation au microscope confocal de WI2658	
Illustration 30 : Traitement des fibroblastes en vue d'une immunofluorescence pour caractériser l'impacte d'une poudre de céramique sur le remaniement du cytosquelette	60
Illustration 31 : Test de migration (inserts en silicone ibidi® Biovalley) ...	61
Illustration 32 : Fibroblastes FDs traités par différentes concentrations d'alumine NanoTEK®, à différents grossissements, 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase) ; certaines cellules sont remplies de céramique (flèche rouge) alors que d'autre n'en contiennent que très peu ou pas du tout (flèche orange).....	65
Illustration 33 : Fractogrammes obtenus par SdFFF (10 g ; 0,8 mL/min, 254 nm, 0,2.106 cellules ; (A) FDs traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK® (courbe rouge) et non traités (courbe bleu) ; (B) WI26 traités par 500 µg/mL d'alumine NanoTEK® (courbe rouge) et non traités (courbe bleu)	66
Illustration 34 : Fibroblastes WI26 colorés au BCB à différents grossissements et traités par différentes céramiques (100 µg/mL), 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)	67
Illustration 35 : Fibroblastes WI26 traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC	68
Illustration 36 : Reconstitution 3D de fibroblastes WI26 traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC.....	68
Illustration 37 : Fibroblastes WI26 observés en microscopie électronique, traités par de l'alumine NanoTEK® 500 µg/mL (A) et de la zircone-cérium 500 µg/mL (B) à différents grossissements ; les flèches rouges indiquent les poudres de céramique, les flèches oranges indiquent les vésicules d'endocytoses	69

Illustration 38 : Immunofluorescence de (A) FDs traitées par de l'alumine fluorescente (100 µg/mL) puis par le TGFβ1 (5 ng/mL) ; (B) FDs traitées par le TGFβ1 (5 ng/mL) puis par l'alumine fluorescente (100 µg/mL) ;	71
Illustration 39 : Pourcentage de recouvrement de la zone de migration par les fibroblastes WI26 à différents temps	72
Illustration 40 : Evolution du diamètre des DEs contenant des fibroblastes WI26 pendant 14 jours, traités ou non avec de l'alumine ou de la zircone-cérium à des concentrations de 100 ou 500 µg/mL (A) et croissance cellulaire des DEs contenant des fibroblastes WI26 pendant 14 jours, traités ou non avec de l'alumine ou de la zircone-cérium à des concentrations de 100 ou 500 µg/mL (B)	73
Illustration 41 : Cellules extraites d'un cordon après 48 heures de culture observées en microscopie à fluorescence ; noyau : DAPI (bleu) ; corps de Weibel-Palade : facteur Von Willebrand (vert)	74
Illustration 42 : HUVECs traités par de l'alumine NanoTEK®, 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)	74
Illustration 43 : HUVECs colorés au BCB à différents grossissements et traités par différentes céramiques (100 µg/mL), 4 jours après ensemencement (microscopie à contraste de phase)	75
Illustration 44 : HUVECs traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; corps de Weibel-Palade : facteur Von Willebrand membrane (rouge) ; poudre de céramique (vert) : FITC	76
Illustration 45 : Vue dans l'épaisseur d'HUVECs traités par 100 µg/mL d'alumine ; noyau (bleu) : DAPI ; membrane (rouge) : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker ; poudre de céramique (vert) : FITC	76

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Produits utilisée en chirurgie esthétique (d'après Annik Pons-Guiraud)	27
Tableau 2 : Caractéristiques de la poudre d'alumine NanoTEK®	29
Tableau 3 : Caractéristiques de la zircone-cérium	32
Tableau 4 : Produits utilisés lors du stage	51
Tableau 5 : Ordre et volume d'introduction des différents constituants pour la réalisation d'un derme équivalent	63

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Pierre-Antoine FAYE - Biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* des matériaux
céramiques. Pour quelles utilisations chez l'Homme !

Thèse de Pharmacie – Limoges – Lundi 29 Octobre 2012

Résumé

La céramique est un matériau de plus en plus utilisé dans l'élaboration de prothèse médicale en raison de ses multiples propriétés et avantages, tels que la solidité ou encore la résistance à l'usure. Par rapport à des prothèses de hanche en métal, la production de débris d'usure est retardée et réduite. Néanmoins, l'impact de ces débris de céramique sur les cellules environnantes de la prothèse reste mal connu. Dans ce travail, l'alumine NanoTEK® de 47 nm de diamètre et la zircone-cérium de 880 nm de diamètre, deux types de poudres de céramique employés dans l'élaboration de prothèse médicale, ont été utilisés. Les fibroblastes dermiques (FDs) ainsi qu'une lignée cellulaire fibroblastique, les WI26 ont été utilisés. Afin de se rapprocher du comportement des fibroblastes *in vivo*, l'équivalent d'un derme humain ou DE a été mis au point dans le laboratoire. Ceci nous permet d'étudier l'interaction des fibroblastes avec leur environnement non plus en monocouche (deux dimensions, 2D) mais en trois dimensions (3D). L'incorporation de la céramique par les FDs s'avérant hétérogène, résultat confirmé par SdFFF et observation biologique, une lignée cellulaire a été choisie. Dans cette lignée cellulaire, les WI26, l'incorporation de céramique à différentes concentrations ne modifie ni le comportement biologique en 2D (migration, prolifération, division, interaction) ni le comportement en 3D (rétraction du DE). Par des méthodes de microscopie confocale et de microscopie électronique, une membrane autour des poudres de céramique est observée dans les cellules. Compte-tenu de l'absence de toxicité de ces poudres, leur utilisation comme vecteur thérapeutique peut être envisagée. De plus, de façon à comprendre comment les poudres de céramique interagissent avec les cellules environnantes, nous nous sommes intéressés aux cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux et qui sont également plus fragiles que les fibroblastes.

Mots Clés

Alumine
Zircone-cérium
Vecteur thérapeutique
Fibroblaste dermique
Fibroblaste WI26
Derme équivalent

Intitulé et adresse de l'UFR

Faculté de Pharmacie de Limoges – 2 rue du Docteur Marcland – 87025 Limoges