Modulation de l'expression de gènes spécifiques du cartilage par des verres bioactifs

Audrey Asselin-Fiol

▶ **To cite this version:**

Audrey Asselin-Fiol. Modulation de l'expression de gènes spécifiques du cartilage par des verres bioactifs. Biologie cellulaire. 2005. hal-01464796

HAL Id: hal-01464796
https://ephe.hal.science/hal-01464796

Submitted on 10 Feb 2017

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

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

MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'EDUCATION NATIONALE
ET DE LA RECHERCHE

ECOLE **P**RATIQUE DES **H**AUTES **E**TUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

Mme Audrey ASSELIN-FIOL

Pour l'obtention du Diplôme de l'**E**cole **P**ratique des **H**autes **E**tudes

---

"MODULATION DE L'EXPRESSION DE GENES SPECIFIQUES DU CARTILAGE PAR DES VERRES BIOACTIFS"

Soutenu le 29 novembre 2005 devant le jury suivant :

Mme Marie-Madeleine Giraud-Guille	Président du Jury
Mme Sylvie Demignot	Rapporteur
M Michel Goldberg	Examinateur
M Jean-Michel Sautier	Examinateur

Laboratoire de Pharmacologie cellulaire Directeur : Pr Jean CHAMBAZ
E.P.H.E - U505 (Sciences de la vie et de la terre) - Institut Biomedicale des Cordeliers
15-21 rue de l'Ecole de Medecine 75006 Paris
email : sylvie.demignot-u505@bhdc.jussieu.fr

Laboratoire de Biologie Orofaciale et Pathologie Directeur : Dr Ariane BERDAL
UP7 – U714 - Institut Biomedicale des Cordeliers
15-21 rue de l'Ecole de Medecine 75006 Paris
email : sautierj@wanadoo.fr

ECOLE **P**RATIQUE DES **H**AUTES **E**TUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

“MODULATION DE L’EXPRESSION DE GENES SPECIFIQUES DU CARTILAGE PAR DES VERRES BIOACTIFS”

présenté le 29 novembre 2005 par **Mme Audrey ASSELIN-FIOL**

Dans cette étude, nous avons étudié le comportement de chondrocytes isolés à partir de septum nasal d’embryon de rat, et mis en culture en présence de verre bioactif (bioverre 45S 5) et d’un verre moins réactif contenant 60% de silice (60S). Les chondrocytes sont ensemencés en présence de granules de verre (45S 5 ou 60S), et l’évolution morphologique des cellules peut être visualisée en microscopie à contraste de phase. Cette évolution est associée à la différenciation cartilagineuse ainsi qu’à la minéralisation de la matrice. Dans les deux types de culture, les chondrocytes prolifèrent et forment des nodules cartilagineux au jour 5. Cependant, au jour 12, les nodules deviennent plus sombres en présence de granule 45S 5, ce qui correspond à une biominéralisation de la matrice plus importante en présence de 45S 5 par rapport au culture en présence de 60S.

Les observations en microscopie électronique à transmission montrent une matrice riche en fibre de collagène et la présence de foyers de minéralisation (cristaux en forme d’aiguille). De plus, ces cristaux sont observés au contact d’une couche dense aux électrons en périphérie des granules, ce qui laisse penser que le matériau joue un rôle de surface de nucléation pour les cristaux biologiques.

De plus, le dosage de l’activité spécifique de la phosphatase alcaline, montre une activité significativement plus élevée en présence de 45S5 par rapport au contrôle (60S) à J15.

Une étude de différents marqueurs chondrocytaires a été effectuée par RT-PCR en temps réel. Le facteur de transcription Sox9 est exprimé tout au long de la culture mais sans différence significative entre les deux sortes de culture. Au contraire, l’expression de Runx2 est plus élevée dans les cultures 45S 5 au jour 12. Les deux marqueurs de la matrice cartilagineuse, agrécan et collagène de type II, montrent un profil d’expression identique avec un pic au début de la culture et une expression plus forte en présence de 45S 5. Ihh est fortement exprimé entre les jours 9 et 12 avec une stimulation significative en présence de 45S 5. De la même manière, l’expression du collagène de type X semble être stimulée en présence de 45S 5 au jour 20 de culture.

En conclusion, cette étude montre que les bioverres 45S 5 sont capables non seulement de permettre la croissance des chondrocytes en culture mais aussi de stimuler certains gènes marqueurs du phénotype chondrocytaire. Ceci nous permet de penser que le concept des surfaces biomimétiques serait une matrice favorable pour une utilisation en ingénierie tissulaire.

Mots clés : Chondrogénèse, Cultures cellulaire, Matériaux Bioactifs, Différenciation, Ingenierie tissulaire

PLAN

Pages

Introduction---------- 5

I. Le tissu cartilagineux ----------
5

1) Les différents types de cartilage
2) Composants cellulaires et matriciels du cartilage de croissance

II. La réparation osseuse endochondrale ---------- 9

1) L'ossification endochondrale lors du développement embryonnaire et de la croissance
2) Processus de réparation osseuse endochondrale
3) Gènes impliqués lors du processus d'ossification endochondrale
4) Modèle de culture

III. Ingénierie du tissu cartilagineux par des matériaux biomimétiques ---------- 18

IV. Les verres bioactifs ----------
- 19

1) Classification des biomatériaux implantables en site osseux
2) Principe de la bioactivité des bioverres

Bibliographie ---------- 27

ABREVIATIONS

A : **A**bsorbance
ADN : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique **c**omplémentaire
ARN : **A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm : **A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essager
AS : **A**ctivité **S**pécifique
BCA : **A**cide **B**icin**C**honinique
BP 60 : **B**oîte de **P**étri **60** mm de diamètre
BSP : **B**one **S**ialo**P**rotein
Cbfa1 : **C**ore **B**inding **F**actor **A1**
Co II : **Co**llagène de type **II**
Co X : **Co**llagène de type **X**
Coll : **Coll**aborateurs
Dlx : **D**istal **l**ess homeobo**x**
DMEM : **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium
Dnase : Enzyme de dégradation de l'ADN

dNTP : **D**ésoxyribo**n**ucléotides **t**ri**p**hosphates
EDX : **E**nergy **D**ispersive **X**ray
F.A.C.I.T. : **F**ibril **A**ssociated **C**ollagens with **I**nteruped **T**riple Helix
GAPDH : **G**lycer**a**ldéhyde **P**hospho**de**h**h**ydrogénase
GAG : **G**lycos**A**mino**G**lycane
GLN : **Gl**utami**n**e
HA : **H**ydroxy**A**patite
HMG : **H**igh-**M**obility-**G**roup
Ihh : **I**ndian **H**edge**H**og
J 12 : **J**our **12**
MEB : **M**icroscopie **E**lectronique à **B**alayage
MET : **M**icroscopie **E**lectronique à **T**ransmission
MMP13 : **M**atrix **M**etallo**P**roteinase **13**
Msx : **M**uscle **S**egment homeobo**x**
OSE-2 : **O**steoblast **S**pecific **E**lement 2
Osf2 : **O**steoblast **S**pecific **F**actor 2
PAL : **P**hosphatase **Al**caline
PBS : **P**hosphate **B**uffered **S**aline
PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction
PG : **P**rotéo**G**lycanes
pNP : **p**ara**N**itro**P**hénol
pNP-P : **p**ara**N**itro**P**hénol **P**hosphate
PRO : **Pro**line
PTHrP : **P**ara**T**hyroid **H**ormone **R**elated **P**eptide
Rnase : Enzyme de dégradation de l'ARN
RT : **R**everse **T**ranscriptase
SER : **Sér**ine
Sox **S**RY-type HMG **box**
SRY : **S**ex-determining **R**egion on the **Y** chromosome
SVF : **S**érum de **V**eau **F**oetal
TCP : **P**hosphate **T**ri**C**alcique
TGFb : **T**issue **G**rowth **F**actor b
Tm : **T**empérature de fusion

INTRODUCTION

-
-

I Le tissu cartilagineux

1) Les différents types de cartilage

Les chondrocytes sont des cellules spécialisées qui dérivent des cellules mésenchymateuses durant le développement embryonnaire pour former les différents cartilages des vertébrés. Chez l'homme, on distingue trois types de cartilage selon la nature de la matrice extracellulaire.

Le cartilage hyalin, le plus abondant, est constitué d'une matrice extracellulaire dense, riche en collagènes et protéoglycanes, synthétisée par un nombre relativement restreint de cellules. Dans ce tissu, les forces de tension des fibres de collagène s'opposent à la pression osmotique due à la grande densité de charges des protéoglycanes pour conférer à ce tissu la propriété d'amortir les chocs au

niveau des surfaces articulaires. Le cartilage de croissance est également un cartilage hyalin transitoire.

Le fibrocartilage est un intermédiaire entre un tissu conjonctif et un cartilage hyalin. Il est riche en fibres de collagène qui lui confèrent une très grande résistance aux tractions et compressions et constitue les zones d'insertion de certains tendons et des disques intervertébraux.

Le cartilage élastique est caractérisé par la présence de fibres élastiques et constitue par exemple le pavillon de l'oreille et quelques pièces vocales laryngées (Mallein-Gérin et coll., 1996).

2) Composants cellulaires et matriciels du cartilage de croissance

-

Le cartilage se présente comme un tissu conjonctif avasculaire et non innervé constitué de cellules hautement spécialisées, arrondies, se divisant peu, appelées chondrocytes, et séparées par une matrice extracellulaire très riche. Cette matrice est composée de fibres essentiellement de collagène de type II et du protéoglycane sulfaté de haut poids moléculaire dénommé agrécane. Ces deux composants sont considérés comme marqueurs spécifiques du phénotype chondrocytaire.

-

Le cartilage de croissance est organisé en couches cellulaires superposées correspondant à des stades successifs de différenciation et de maturation des chondrocytes. Les chondrocytes de la zone de réserve sont quiescents puis se divisent en formant des colonnes longitudinales et parallèles les unes aux autres, chacune formée de plusieurs cellules empilées les unes au-dessus des autres (zone de prolifération). Les cellules deviennent ensuite hypertrophiques (zone hypertrophique) et meurent probablement par apoptose. Les premiers foyers de calcification apparaissent dans les septa longitudinaux, situés entre les colonnes de chondrocytes hypertrophiques. C'est seulement lorsque l'ensemble de ce processus est réalisé que la formation osseuse sous-jacente peut se faire.

A tous les stades, les chondrocytes synthétisent et sécrètent les protéines qui constituent la matrice extracellulaire dans laquelle ils sont dispersés.

La matrice du cartilage contient 65 à 80 % d'eau et présente une structure protéique tridimensionnelle particulière. La trame est composée d'un réseau de fibres de collagène, essentiellement représenté par le collagène de type II, et des protéoglycanes qui attirent et retiennent les molécules d'eau par leurs charges négatives. Cette trame joue un rôle essentiel dans la biologie de ce tissu.

Les collagènes du cartilage : le réseau de collagène du cartilage est composé de collagène fibrillaire et non fibrillaire.

Le collagène de type II est une glycoprotéine homotrimèrique constituée de trois chaînes identiques a1(II) codée par un seul gène *Col2A1*. La densité des fibrilles de collagène de type II et leur orientation varient suivant le stade de maturation des chondrocytes (Corvol M, 1996). Il s'agit du collagène majeur de la matrice cartilagineuse. C'est un collagène fibrillaire retrouvé au niveau des zones de prolifération, maturation et d'hypertrophie haute des cartilages hyalins. Ces fibres sont rares et dispersées dans la zone de réserve, de plus en plus abondantes dans la zone de prolifération où elles forment un feutrage serré autour des cellules et entre les colonnes pour donner naissance à l'ébauche de septa longitudinaux qui s'épaississent dans la zone d'hypertrophie.

Le collagène de type VI forme des microfilaments perlés par assemblage de deux molécules de façon antiparallèle qui s'organisent en tétramères interagissant avec des molécules de hyaluronane (Ayad et coll., 1989).

Le collagène de type IX, non fibrillaire, est un hétérotrimère constitué de 3 polypeptides a1(IX), a2(IX), a3(IX) génétiquement distincts. Chaque chaîne contient trois domaines en triple hélices (domaines COL) séparés par des domaines non hélicoïdaux (domaines NC). Le domaine NC3 est un site d'intéraction avec les glycosaminoglycanes. Caractérisé par des interruptions de sa triple hélice, il fait partie des F.A.C.I.T. (Fibril Associated Collagens with Interupted Triple Helix). Il est associé périodiquement le long de la fibrille de collagène de type II à laquelle il est lié de façon covalente. Il intervient dans la stabilisation des fibres de collagène de type II et de la matrice cartilagineuse par ses interactions avec les protéoglycanes (Olsen, 1997).

Le collagène de type X, non fibrillaire à chaîne courte, est un homotrimère constitué de 3 chaînes a1(X). Il a été mis en évidence dans les zones hypertrophiques où il est associé aux vésicules matricielles. Le rôle précis du collagène de type X au sein du cartilage hypertrophique n'est pas complètement élucidé. Il semblerait cependant qu'il puisse former un réseau de structure hexagonal qui servirait à organiser la matrice extracellulaire en interagissant avec d'autres composants matriciels (Bateman et coll., 2004)

Le collagène de type XI, fibrillaire, est un hétérotrimère constitué de 3 polypeptides a1(XI), a(XI), a3(XI). Il polymérise avec le collagène de type II et possède des sites de haute affinité pour l'héparane et l'héparine sulfate. Cependant, il se lie majoritairement entre eux, ce qui forme un réseau secondaire de filament. Son rôle est de réguler le diamètre des fibres de collagène de type II (Eyre D, 2002).

Les protéoglycanes du cartilage : Les protéines non collagéniques sont représentées essentiellement par des protéoglycanes (PGs) formant de longues chaînes s'agrégeant avec l'acide hyaluronique ou hyaluronane par l'intermédiaire de protéines de liaison *via* le domaine globulaire G1 amino-terminal. Le PG cartilagineux principal ou **agrécane** est constitué d'une protéine porteuse (core

protein) sur laquelle sont liées de façon covalente environ 100 chaînes de chondroïtine 4 et 6 sulfate et 30 chaînes de kératane sulfate, aboutissant ainsi à une forme agrégée de haut poids moléculaire (2400 kDa) (Poole, 1986 ; Watanabe et coll., 1998). Cette forme agrégée de PGs, en particulier par la présence de groupements sulfatés et carboxylés chargés négativement, donne au cartilage ses propriétés de résilience et de rétention hydrique. La double nature biochimique des protéoglycanes permet une grande capacité d'interactions avec d'autres composants cellulaires et matriciels et donc un rôle structural et fonctionnel au sein de la matrice cartilagineuse. Au cours du vieillissement, apparaissent des modifications de composition, de structure et d'organisation aussi bien au niveau des monomères d'agrécane que des agrégats. Il y a une accumulation de monomères d'agrécane de taille réduite s'agrégeant peu à l'acide hyaluronique, et une accumulation consécutive d'acide hyaluronique. Cela aboutit à une diminution de la résistance du cartilage aux forces de compression et l'apparition de maladies comme la dégénérescence des disques intervertébraux ou l'ostéoarthrite des cartilages synoviaux (Hardingham et Bayliss, 1990). Il existe également des maladies génétiques telles que la nanomélie ou des chondrodystrophies pouvant aboutir à un dysfonctionnement du cartilage. La nanomélie, caractérisée par une mutation ponctuelle au niveau du gène de l'agrécane, aboutit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Vertel et coll., 1994).

Il existe également des protéoglycanes mineurs de faible masse moléculaire qui se lieraient au collagène de type II. Il s'agit de la **décorine**, la **fibromoduline** et du **biglycan**. Ils interviennent dans le contrôle du diamètre des fibres de collagène de type II et de leur stabilisation. De plus, le biglycan régule positivement la formation osseuse ainsi que la masse osseuse (Knudson et coll., 2001).

D'autres protéines sont présentes dans la matrice cartilagineuse et mises en évidence plus particulièrement dans les zones hypertrophiques. La **chondrocalcine,** correspondant au propeptide C-terminal du procollagène de type II (Van der Rest et coll., 1986). Cette protéine est exprimée par les chondrocytes préhypertrophiques et intervient dans la croissance du cristal au cours de la minéralisation. Deux autres protéines semblent jouer un rôle dans la minéralisation : Il s'agit de la **phosphatase alcaline** et de l'**annexine** . En effet, l'initiation de la minéralisation se fait à l'intérieur de vésicules matricielles où sont acummulées les ions calcium et du phosphate inorganique. Ces vésicules créent un environnement spécifique qui permet la formation de cristaux d'hydroxyapatite sous forme d'aiguille sur la face interne des membranes des vésicules. Aprés avoir atteint une certaines longueurs, les aiguilles d'hydroxyapatite sont relarguées dans la matrice extracellulaire par un processus mal élucidé. Ce processus nécessite un système de régulation précis pour permettre de maintenir une homéostasie des ions calcium et du phosphate inorganique. Cette régulation fait intervenir la phosphatase alcaline et l'annexine. En effet, leurs interactions réciproques permettent d'obtenir la concentration en calcium et en phosphate inorganique nécessaire à la formation de hydroxyapatite (Balcerzak M, 2003).

II L' ossification endochondrale

Durant le développement embryonnaire, la formation de l'os se fait soit par un processus d'ossification intra-membranaire, soit par un processus d'ossification endochondrale.

Le processus d'ossification membranaire intéresse les os dit de membrane comme la calotte crânienne, le corps de la mandibule, le maxillaire ou le palais. Dans ce cas, le tissu osseux se forme directement à partir de cellules ectomésenchymateuses ostéoprogénitrices, sans passage cartilagineux intermédiaire (Baron R, 1993)

L'ossification endochondrale au contraire concerne les os longs des membres, les côtes, la colonne vertébrale ou certains os du squelette crânio-facial comme la base du crâne, le septum nasal ou le condyle mandibulaire. Le processus de réparation d'os endochondraux fait intervenir un passage cartilagineux transitoire avec la formation d'un cal cartilagineux minéralisé se résorbant secondairement pour être remplacé par du tissu osseux (Baron R, 1993)

1) L'ossification endochondrale lors du développement embryonnaire et de la croissance (Ducy P, 2001)

L'ossification de type endochondral est prépondérante chez les vertébrés supérieurs. En effet, tout le squelette appendiculaire (os long des membres) et axial se forme selon ce processus.

De la même facon que la plupart des autres processus organogénétiques, la formation du squelette débute par la convergence et la condensation de cellules en majorité mésenchymateuses en lieu et forme de chacun de ses futurs éléments. Trois régions de l'embryon vont être à l'origine du squelette. Les membres dérivent du mésoderme de la plaque latérale, le squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) dérive des somites et le squelette craniofacialeest majoritairement formé par des cellules originaires des crêtes neurales. Les facteurs qui contrôlent cette première étape jouent donc un rôle d'organisateur à l'échelle de l'embryon.

Chacune des condensations mésenchymateuses, une fois formées, va évoluer pour son propre compte vers la formation d'un élément ossifié, indépendamment de son origine ou de sa position.

Première étape : production d'un modèle cartilagineux

Une fois chaque élément préfiguré par une condensation, les cellules la composant vont progressivement acquérir une forme différente selon leur position. En périphérie, elles vont prendre un aspect allongé et s'organiser en plusieurs couches serrées. Cette structure lamellaire sera à l'origine du périchondre et de la structure primitive entourant la région médiane des futurs os, appellée virole osseuse (*bone collar*), dont les cellules se différencieront ultérieurement en ostéoblastes. A l'inverse, les cellules du centre de la condensation vont s'arrondir et s'entourer d'une matrice abondante, riche en protéoglycanes et en collagène de type II. Cette morphologie, comme la capacité de sécréter ce type de matrice extracellulaire, sont les manifestations d'une différenciation en chondrocytes. Cette première étape de ségrégation cellulaire est sous le contrôle de Sox9, un facteur de transcription de la

famille HMG (high mobility group) (Ducy P, 2001).

<u>Seconde étape</u> : différenciation des chondrocytes hypertrophiques et vascularisation.

Cette seconde étape va mettre en place la plaque de croissance, une structure cartilagineuse qui persistera jusqu'à la puberté chez l'homme et dont la fonction est primordiale pour la croissance longitudinale des os. Dans un premier temps, les chondrocytes présents dans la partie la plus médiane des condensations vont rapidement proliférer, formant des colonnes de cellules juxtaposées. Cette région est appelé zone prolifération. Les cellules situées à la partie inférieure des colonnes vont ensuite s'élargir et leur production de collagène de type II commencer à décroître. Ces cellules sont dites préhypertrophiques. S'élargissant encore, elles vont ensuite cesser de synthétiser ce type de collagène et lui substituer le collagène de type X. Ce changement marque le dernier stade de différenciation des chondrocytes, qui sont alors dénommés chondrocytes hypertrophiques. Enfin, les chondrocytes hypertrophiques présents dans la partie la plus centrale vont mourir suivant un processus apparemment différent de l'apoptose conventionnelle, mais encore mal connu.

<u>Troisième étape</u> : vascularisation, résorption des modèles cartilagineux et ostéogenèse

A ce stade de la squelettogenèse, les os en formation peuvent être identifiés par une juxtaposition en miroir des deux plaques de croissance. Au fur et à mesure du développement, ces structures régresseront vers les deux extrémités du futur os jusqu'à n'en occuper qu'une région très restreinte. Ces deux zones cartilagineuses seront responsables de la croissance longitudinale des os en période post-natale. Elles ne se résorberont qu'à la puberté, entraînant l'arrêt de la croissance. Une fois leur maturation achevée, les chondrocytes hypertrophiques sont encastrés dans une matrice calcifiée enrichie notamment en collagène de type X. Outre la synthèse de cette matrice, un élément important du programme génétique propre aux chondrocytes hypertrophiques est la capacité de sécrétion du VEGF (vascular endothelial growth factor). Le VEGF est un puissant facteur angiogénique dont l'expression dans les chondrocytes est sous le contrôle de Runx2 (Ducy P, 2001).

Cette étape de vascularisation est indispensable pour la suite du processus d'ossification. En effet, les ostéoblastes expriment le récepteur du VEGF à leur surface. Sous l'action de VEGF, ils peuvent ainsi migrer de la virole osseuse (*bone collar*) vers les centres hypertrophiques des condensations par chimiotactisme et le dépôt de matrice osseuse peut se produire. La vascularisation permet également la migration des ostéoclastes dans les modèles cartilagineux. En effet, c'est par voie vasculaire que transitent les précurseurs des ostéoclastes, ces cellules multinucléées d'origine myéloïde capablent de résorber la matrice osseuse pour permettre le modelage et le remodelage de ce tissu rigide. En leur absence, la matrice cartilagineuse calcifiée déposée par les chondrocytes hypertrophiques ne pourra pas être digérée afin d'être remplacée par une matrice osseuse synthétisée par les ostéoblastes. Le processus de remodelage lors de l'ossification endochondrale est également sous la dépendance d'une dégradation de la matrice cartilagineuse par les matrices-métalloprotéinase (MMPs) notamment les MMP 9, 13 et 14 (Ortega N et coll 2004).

2) Processus de réparation osseuse endochondrale

A l'âge adulte, la réparation osseuse post-traumatique se déroule de la même manière que lors de la formation embryonnaire de l'os.

A la suite d'une fracture, le processus de **réparation osseuse endochondrale** des os longs se fait suivant une cascade de réactions (Rosen V. et Thies S. 1992):

1- Hémorragie.
2- Réaction inflammatoire en réponse au traumatisme.
3- Formation de l'hématome autour du site fracturé.
4- Organisation d'un tissu de granulation et inflammation aseptique, responsable de la libération d'agents vasoactifs et chimiotactiques.
5- Dans un premier temps, les fibroblastes du périoste vont proliférer afin d'augmenter la population de cellules ostéoprogénitrices. Ces cellules vont ensuite se différencier en ostéoblastes matures et synthétiser suffisamment de matrice pour refermer la fracture entre les surfaces corticales. Ce processus est analogue à la formation osseuse intramembranaire.
6- Des ostéoclastes, différenciés à partir de cellules hématopoïétiques de l'espace médullaire, résorbent les débris osseux.
7- Le corps central de l'os est réparé, dans un deuxième temps, par ossification endochondrale: Différenciation des cellules mésenchymateuses ostéoprogénitrices provenant du périoste, endoste ou du stroma médullaire (Simmons, 1985) en cellules cartilagineuses qui synthétisent une matrice extracellulaire comportant en majorité des protéines telles que le collagène de type II et l'agrécane.
8- Résorption et remplacement du tissu cartilagineux par un tissu osseux immature dans un premier temps qui se réorganisera par un processus de remodelage. La transition cartilage/os se déroule dans la zone hypertrophique basse.
9- On observe un changement d'expression de certaines protéines matricielles et apparition du collagène de type I, de l'ostéocalcine, de la BSP (bone sialoprotein), de l'ostéopontine, c'est-à-dire des marqueurs du phénotype ostéoblastique.

3) Gènes impliqués lors du processus d'ossification endochondrale

La formation de divers tissus tel que le cartilage, les muscles et l'os fait intervenir des cellules mésenchymateuses multipotentes qui vont se différencier en cellules comme les chondrocytes, les myoblastes ou ostéoblastes. Cette différenciation nécessite un contrôle complexe des différentes étapes qui permettent le passage de cellules mésenchymateuses en cellules différenciées. Ce contrôle fait intervenir des méchanismes transcriptionnels spécifiques aux tissus concernés (Lefebvre V et coll., 1998).

Sox9 marqueur précoce de la différenciation cartilagineuse : Sox9 appartient à la famille des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'une boîte HMG (high-mobility-group) qui est un site de liaison à l'ADN. Ce domaine, présente une homologie d'au moins 60 % avec le facteur de détermination du sexe SRY. Il existe près de vingt gènes dans la famille *Sox* (**S**RY -type HMG **box**) (Lefebvre V et coll., 1998 ; De Crombrugghe et coll., 2001).

Le rôle important de Sox9 au cours de la différenciation cartilagineuse a été suggéré par l'observation d'anomalie du squelette dans une maladie génétique humaine appelée dysplasie campomélique (DC) caractérisée par un nanisme et diverses malformations osseuses et cartilagineuses. Une mutation hétérozygote du gène SOX9 en est responsable (De Crombrugghe et coll., 2001).

Sox9 est exprimé dans toutes les cellules des condensations mésenchymateuses préchondrogèniques, et dans les chondrocytes prolifératifs (Kronenberg, 2003, De Crombrugghe et coll., 2001). Cependant, il n'y a pas d'expression dans les chondrocytes hypertrophiques ainsi que dans les ostéoblastes (Kronenberg, 2003 ; De Crombrugghe et coll., 2001). Il a également été montré que les chondrocytes issus de souris *Sox9*-/- n'expriment pas certains gènes marqueurs du phénotype chondrocytaire tel que *Col2a1, Col9a2, Col11a2* et l'agrécane (Bi et coll., 2001) ce qui suggère le rôle important de Sox9 dans la différenciation cartilagineuse. De plus, *Col2a1 et Col11a2* contiennent un site de fixation au domaine HMG de Sox9.

Les souris mutantes *Sox9*+/- possède des anomalies squelettiques identiques à celles observées chez les patients atteints de DC. L'analyse de ces anomalies durant le développement embryonnaire indique que deux étapes de la différenciation cartilagineuse serait sensible au taux de protéine Sox9. L'observation de plus petites condensations mésenchymateuses suggère que Sox9 serait nécessaire à la formation des condensations mésenchymateuses, étape indispensable à la future différenciation des chondrocytes. Un des mécanisme d'action probable de Sox9 serait de contrôler l'expression de gènes de protéines de surface cellulaire nécessaire lors des condensations mésenchymateuses (De Crombrugghe et coll., 2001). Une augmentation de la longueur de la zone hypertrophique suggère également le rôle de Sox9 lors du passage de chondrocyte vers le stade hypertrophique (De Crombrugghe et coll., 2001).

Deux autres gènes de la famille *Sox* semblent jouer un rôle dans la différenciation chondrocytaire (De Crombrugghe et coll., 2001). Il s'agit de *L-Sox5* et *Sox6*. Comme *Sox9*, ces deux gènes ne sont pas du tout exprimés dans les chondrocytes hypertrophiques. Ces deux gènes possèdent un fort degré d'homologie de séquence entre eux mais pas avec *Sox9* (excepté pour le domaines HMG) (De Crombrugghe et coll., 2001). Cette propriété leur permet de former des homodimères et des hétérodimères entre eux ce qui augmente leur fixation à l'ADN sur un site de type HMG. De plus, il s'est avéré que des domaines semblables existent sur les gènes *Col2a* et *Col11a2*.

Contrairement à *Sox9, L-Sox5* et *Sox6* ne possèdent pas de domaine d'activation transcriptionnel. Cette absence suggère que ces facteurs de transcription jouent le rôle de protéine architecte. Leur rôle serait de courber l'ADN afin de faciliter l'accès, la liaison ou l'activité de Sox9 ou d'autres facteurs de transcription (Ducy P, 2001). Ces gènes interagissent avec Sox9 pour activer les gènes *Col2a1* et agrécane (De Crombrugghe et coll., 2001).

De plus, d'autres études utilisant des souris mutantes soit pour *L-Sox5*, soit pour *Sox6* ou bien pour les 2, ont montré que L-Sox5 et Sox6 ont des rôles redondants dans la chondrogenèse. En effet pour les deux simples mutations, peu d'anomalies squelettiques ont été observées cependant les souris doubles mutantes meurent *in utero* avec de graves défauts dans la formation du cartilage (De Crombrugghe et coll., 2001).

Contrairement à Sox9, Sox5 et Sox6 ne sont pas nécessaires à la formation des condensations mésenchymateuses. Cependant, ils sont nécessaires aux étapes suivantes, où l'expression des gènes spécifiques de la matrice cartilagineuse est la plus élevée (De Crombrugghe et coll., 2001).

Cbfa1/Osf2/Runx2 : rôle dans la différenciation chondrocytaire :

-

Durant la dernière décennie, des études réalisées chez la souris et l'homme ont permis d'identifier un facteur de transcription qui s'est avéré être un régulateur très précoce de la différenciation ostéoblastique. Il s'agit d'une découverte majeure concernant la régulation de la différenciation ostéoblastique. Son rôle incontournable a été spectaculairement démontré par son extinction génique, qui entraîne l'absence totale d'ostéoblastes et par conséquent d'ostéoformation chez les souris invalidées (Komori et coll., 1997 ; Otto et coll. 1997). Celles-ci ont un squelette entièrement cartilagineux et meurent peu après la naissance d'insuffisance respiratoire. La dysplasie cléido-cranienne est une anomalie humaine héréditaire (autosomale dominante) due à une mutation hétérozygote de *CBFA1 /RUNX2*. Elle s'accompagne de fontanelles ouvertes, d'absence partielle ou totale de clavicule, de retards d'éruption dentaire et de dents surnuméraires.

Ce facteur appelé Cbfa1 (Core binding factor-A1), appartient à une famille qui comprend deux autres membres (Cbfa2 et Cbfa3) et qui est caractérisée par la présence dans la séquence d'un domaine homologue au gène *Runt* de la drosophile. Le domaine commun responsable de la liaison à l'ADN est composé de 128 acides aminés très conservés au cours de l'évolution entre la drosophile et l'homme (Ducy et coll., 1996). Actuellement le terme Runx2 est surtout utilisé.

Le gène *Runx2* comprend 9 exons. La transcription alternative entraîne la génération de trois variantes majeures de la protéine. Une de celles-ci (type III) a été découverte comme étant un facteur liant un élément *cis* du promoteur du gène de l'ostéocalcine qui n'est activé que dans les ostéoblastes. Cette variante est nommée OSE-2 (osteoblast specific element).

Runx2 est fortement exprimé dans les structures squelettiques dès le stade de condensation mésenchymateuse qui précède la formation des ébauches cartilagineuses des os longs et la première formation osseuse dans les os plats. Son expression diminue ensuite durant la phase de prolifération des chondrocytes, puis réaugmente chez les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques (Boissy et coll., 2000, Kronenberg HM, 2003).

Une étude effectuée sur une lignée de cellules chondrogéniques, a montré le double rôle de Runx2 dans le cartilage. Premièrement, il induit les condensations mésenchymateuses de cellules préchondrogéniques à des stades précoces de la différenciation cartilagineuse (Komori T, 2002 ; Stricker S, 2002). De plus, Runx2 induit également la maturation des chondrocytes hypertrophiques à des stades plus tardifs de la différenciation cartilagineuse (Komori T, 2002). La surexpression de Runx2, induit une diminution de la prolifération des chondrocytes mais augmente leur différenciation vers le stade hypertrophique avec une expression des marqueurs spécifiques : glycosaminoglycanes, phosphatase alcaline, MMP13 (matrix métalloproteinase 13), collagène de type X. Il augmente également la minéralisation de la matrice cartilagineuse (Komori, 2000). Une surexpression de Runx2 accélère donc le processus d'ossification endochondrale (De Crombrugghe et coll., 2001) et peut induire l'hypertrophie et la formation d'os dans du cartilage autre que le cartilage de croissance (Kronenberg HM, 2003).

Les souris *Runx2*-/-, ne possèdent aucun ostéoblaste et montrent des anomalies de maturation des chondrocytes. En effet, le nombre de chondrocytes hypertrophiques est fortement diminué. On observe également une absence de minéralisation ainsi qu'une diminution voire une extinction de l'expression des gènes de l'ostéopontine et de la MMP13 qui sont normalement exprimés tardivement par les chondrocytes hypertrophiques (Kronenberg HM, 2003).

D'autres études ont montré qu'une surexpression de Runx2 dans des souris *Runx2*-/-, permet le rétablissement partiel de certaines anomalies telles que la différenciation des chondrocytes vers le stade hypertrophique. Cependant il y a toujours absence d'ostéoblastes, ce qui nous laisse penser que d'autres facteurs de transcription sont nécessaires à la différenciation ostéoblastique (De Crombrugghe et coll., 2001).

Runx2 est également nécessaire dans la production de la matrice extracellulaire osseuse. En effet, certains promoteurs de protéines osseuses (ostéocalcine, bone sialoprotein, phosphatase alcaline et le collagène de type I) en sont la cible (Olsen BR et coll., 2000)

Ihh (Indian hedgehog) : Ihh est une molécule de signalisation qui appartient à la famille hedgehog. Il s'agit d'un polypeptide synthétisé par les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques. Ihh joue un rôle clé dans le contrôle de trois stades critiques du processus d'ossification endochondrale (De Crombrugghe et coll., 2001) :

- la prolifération des chondrocytes ainsi qu'à la formation des colonnes caractéristiques du cartilage de croissance.
- la différenciation des chondrocytes vers le stade hypertrophique.
- la différenciation des ostéoblastes. Ihh induit la différenciation des cellules ostéogéniques du périoste. Cependant, malgré le rôle essentiel de Ihh dans la différenciation des ostéoblastes au cours de l'ossification endochondrale, l'ossification membranaire, elle, n'est pas affectée par l'absence d'Ihh (De Crombrugghe et coll., 2001).

Ihh se lie à son récepteur Patched-1 (Ptc-1). Cette liaison active une protéine membranaire appelée Smo (Smoothened), ce qui engendre une cascade qui mène à l'activation de gène tel que celui de la PTHrP (Parathyroïd Hormone-related Protéine) (Kronenberg HM, 2003).

Les souris *Ihh* -/- ont des os normaux jusqu'au stade de condensation mais développent des anomalies de croissance. On observe une diminution de la prolifération des chondrocytes, ce qui entraine des zones cartilagineuses courtes. Une seconde anomalie observé chez ces souris, est une augmentation du nombre de chondrocytes hypertrophiques, ce qui est dû au fait que les chondrocytes quittent prématuremment le stade prolifératif. En effet, ces souris ne synthétisent pas de PTHrP (exprimé normalement par les chondrocytes prolifératifs). Son rôle est de garder les chondrocytes dans la zone proliférative et donc de déterminer la longueur des colonnes prolifératives (Kronenberg HM, 2003). Une anomalie génétique humaine, la brachydactylie est due à une mutation de *IHH* qui s'accompagne de phalanges et métacarpes raccourcis.

Il existe donc une interaction entre Ihh et PTHrP. En effet, ces deux facteurs contrôlent le passage des chondrocytes prolifératifs vers le stade hypertrophique par un système de boucle d'autorégulation. PTHrP, secrété par les cellules du périchondre, se fixe sur son récepteur PPR (PTH/PTHrP receptor) au niveau des chondrocytes prolifératifs, ce qui permet de les garder à ce stade. Puis les chondrocytes ne sont plus suffisamment stimulés par PTHrP du fait de leur éloignement dans les colonnes, ils arrêtent donc de proliférer et synthétisent alors Ihh.

Ihh se fixe sur son récepteur (Ptc-1) présent dans la région proliférative basse pour augmenter le taux de prolifération. Ihh peut également stimuler la production de PTHrP par les cellules de la partie la plus distale de l'élément squelettique, c'est-à-dire la région qui forme le périchondre. Ihh joue aussi un rôle dans la conversion des cellules périchondriales en cellules ostéoblastiques de la virole osseuse (*Bone collar)*.

4) Modèle de culture d'ossification endochondrale

Le modèle de culture utilisé a été mis au point au sein du laboratoire (Sautier et coll., 1993). Il s'agit d'une culture primaire de chondrocytes isolés enzymatiquement à partir de septa nasaux d'embryon de rat. Ce modèle a la particularité de mimer les différentes étapes de l'ossification endochondrale jusqu'au stade hypertrophique et à la minéralisation de la matrice.

Aprés la mise en culture, les cellules perdent leur phénotype chondrocytaire, ont une morphologie fibroblastique et expriment le collagène de type I. Au troisième jour, on observe quelques regroupement de cellules polygonales. Ces cellules synthétisent du collagène de type II et l'agrécane. Au huitième jour de culture, les premiers nodules cartilagineux sont formés. Durant les jours suivants, les nodules augmentent en taille et en quantité et il y a synthèse d'une matrice dense qui minéralise. Ces observations indiquent que dans un environnement spécifique, des chondrocytes dédifférenciés sont capables de se redifférencier et de former des nodules qui possèdent la morphologie ultrastructurale du cartilage calcifé observé *in vivo* (Sautier et coll, 1993).

III Ingénierie du tissu cartilagineux par des matériaux biomimétiques

L'ingénierie tissulaire est un domaine très prometteur de la biologie reconstructive qui puise ses origines dans les récentes avancées de la médecine, de la chirurgie, de la biologie cellulaire et moléculaire et de la science des matériaux. L'ingénierie tissulaire consiste en la construction au laboratoire d'un dispositif médical constitué de cellules vivantes et de médiateurs biologiques

(adhésines, facteurs de croissance, etc.) sur une matrice synthétique ou biologique qui peut être implantée chez le patient pour faciliter la régénération d'un tissu. La logique de cette approche est basée sur la compréhension des mécanismes de régulations génétiques et moléculaires qui ont lieu au cours du développement et de la morphogenèse d'un tissu dans le but de fournir les clés permettant de reconstruire un organe ou un tissu dans l'organisme adulte.

Le cartilage, tissu avasculaire et à faible cellularité, a un mauvais potentiel à réparer spontanément ses propres lésions. Face aux nombreux échecs des greffes chondrales et ostéochondrales, des alternatives thérapeutiques ont été récemment proposées. Deux voies de recherche sont principalement développées : (1) les greffes autologues de chondrocytes, (2) les greffes de précurseurs chondrocytaires.

La technique de greffe de chondrocytes autologues consiste à prélever des fragments de cartilage dans une zone dite “non portante”. Les chondrocytes sont isolés des fragments cartilagineux et mis en culture *in vitro*. Après une phase de multiplication cellulaire, le greffon ainsi obtenu est implanté dans la zone lésée. Cependant, cette technique présente certains problèmes, tel qu'une distribution inégale des chondrocytes greffés au sein du défaut cartilagineux, ainsi qu'une perte importante de cellules implantées. Afin de parer à ces problèmes, certains chercheurs ont mis au point de nouveaux supports et ont trouvé une nouvelle source cellulaire : les cellules souches mésenchymateuses (Lee JW et coll., 2004).

La moëlle osseuse contient des cellules souches progénitrices pluripotentes capables de se différencier en chondrocytes ou en ostéoblastes (Lefebvre V et coll., 1998). L'engagement de ces cellules vers tel ou tel lignage est sous la dépendance de nombreux facteurs, parmi lesquels, des gènes qualifiés de “gènes maîtres” semblent jouer un rôle clé. Il s'agit de *Sox-9* pour la mise en route du programme de différenciation chondrocytaire prolifératives (Kronenberg HM, 2003) et de *Runx2* pour les ostéoblastes (Olsen BR et coll., 2000). Les cellules de moëlle, relativement faciles à prélever, ont un fort potentiel de prolifération et peuvent se différencier *in vitro* en chondrocytes dans certaines conditions de culture comme en ajoutant du TGFb (Lee JW et coll., 2004). C'est grâce à ces propriétés que les cellules souches sont préférablement utilisées par rapport aux cellules cartilagineuses. En effet, celles-ci sont difficilement prélevable et leur quantité plus réduite. Les cellules souches pourraient donc être utilisées pour des lésions étendues du cartilage, en réalisant des matériaux hybrides comportant des cellules cultivées sur un support tridimensionnel biocompatible et biodégradable et permettant une bonne adhésion, prolifération et différenciation cellulaires (Ohgushi et Caplan, 1999). Ainsi, le développement de matériaux biomimétiques laisse augurer de nouvelles applications cliniques en chirurgie osseuse. Une stratégie consiste à modifier la surface des biomatériaux par des processus biomimétiques afin d'améliorer leur intégration tissulaire.

IV Les verres bioactifs

Lorsqu'un défaut osseux dépasse une taille dite critique, il ne peut pas se régénérer spontanément. Depuis longtemps, des tentatives pour trouver le substitut idéal de l'os ont été réalisées dans le but de fabriquer des implants qui puissent remplacer non seulement la structure mais aussi la fonction du tissu osseux. Les procédures régénératrices incluent les greffes et les matériaux biocompatibles. Les greffes osseuses peuvent être des autogreffes, des allogreffes ou encore des xénogreffes. Les autogreffes représentent le matériau de choix puisqu'elles sont à la fois ostéogéniques, ostéoconductrices et ostéoinductrices. Cependant, face à la limitation quantitative du matériau ou souvent la nécessité d'un deuxième site chirurgical, de nombreux chirurgiens utilisent soit des allogreffes, xénogreffes, soit des matériaux synthétiques (Loty et coll., 1998, Sautier et coll., 1998). De nombreux substituts osseux ont été mis au point afin de contourner le problème des greffes. Ces substituts sont appelés biomatériaux.

Le chirurgien dispose actuellement d'une large gamme de matériaux alloplastiques implantables classés en quatre catégories : les polymères, les alliages métalliques, les céramiques et les matériaux composites (céramique-céramique, métal, céramique ou polymère-céramique).

Les données de la littérature montrent que les matériaux qualifiés de " bioactifs " sont parfaitement intégrés dans l'os en réalisant une véritable liaison. Divers travaux réalisés *in vivo* ou *in vitro* ont montré que certains matériaux, parmi lesquels les verres bioactifs, permettent non seulement une liaison avec l'os mais également stimulent la différenciation des cellules ostéogéniques (Ducheyne et coll., 1994, El-Ghannam et coll., 1997a, Yao et coll., 2005) . Cependant, bien que lors du processus d'ossification endochondrale, la formation d'os passe par une étape cartilagineuse, très peu d'études ont été effectuées sur le comportement des chondrocytes en présence de verres bioactfs. Or les qualités de ces matériaux en fond des supports interressants pour l'ingénierie du cartilage.

1) Classification des biomatériaux implantables en site osseux

Suivant leur comportement avec le tissu osseux, les biomatériaux implantables sont classés soit en matériaux biotolérés, bioinertes ou bioactifs. Tous ces matériaux sont biocompatibles, c'est-à-dire qu'ils n'exercent pas d'action défavorable sur les tissus (Loty et coll., 1998)

***Matériaux biotolérés* :** Ils sont incorporés dans l'os mais à distance, avec formation d'une couche fibreuse qui s'interpose entre l'os et le matériau. Exemples : Polyméthyl méthacrylate, alliages cobalt-chrome (vitallium) (Loty Cet coll ,1998a).

Matériaux bioinertes : Ce sont des matériaux non réactifs, qui ne subissent pas de modifications physico-chimiques pendant de longues périodes (Hulbert et coll., 1970). Ils n'induisent aucune réaction sur les tissus et inversement, ne subissent aucune dégradation de la part de ces tissus. De tels matériaux ne provoquent pas la formation de tissu fibreux interfacial, mais permettent un contact osseux, sans liaison chimique directe avec le tissu osseux néoformé. Exemples : zircone, titane, alumine.

Matériaux bioactifs : Au sens large du terme, un matériau bioactif est un matériau destiné à une fonction biologique spécifique. Bien que le terme de bioactivité puisse être appliqué à la réponse tissulaire à la fois des tissus mous et durs, il concerne essentiellement des biomatériaux destinés à être implantés dans un tissu osseux en implantologie orale ou en orthopédie (Loty Cet coll ,1998a).

C'est pourquoi, selon Hench, la bioactivité d'un matériau est définie par sa propriété de réaliser une liaison chimique avec les tissus environnants, sans interposition d'une couche fibreuse.

Cette liaison est possible grâce aux réactions physico-chimiques qui se déroulent à la surface et qui sont déterminées par la composition des matériaux et les caractéristiques de surface. La liaison biologique dépend de la formation d'une couche riche en calcium et phosphate (Hench et coll., 1971).

Cette couche serait équivalente aux lignes cémentantes présentes dans l'os mature et exercerait un effet chémotactique sur les ostéoblastes (Hench et Paschall, 1973). Les ostéoblastes s'attacheraient à la surface, se différencieraient et synthétiseraient des fibres de collagène, suivi de la minéralisation au sein du réseau collagénique (Hench, 1990).

La qualité de cette liaison a été évaluée par des tests mécaniques de détachement qui consistent à essayer de séparer l'implant de l'os en exerçant des forces de traction. Les résultats ont provoqué des fractures au niveau du verre ou de l'os mais jamais au niveau de l'interface (Hench et Andersson, 1993).

Il existe deux types de matériaux bioactifs :

Matériaux résorbables : Le mécanisme de dégradation est le résultat de processus cellulaires ou extracellulaires. Après implantation dans le tissu osseux, le matériau disparaît progressivement par phagocytose, par dissolution chimique ou par l'action d'ostéoclastes et est remplacé par du tissu osseux. La vitesse de résorption doit être similaire à la vitesse de formation osseuse, afin d'avoir une interface stable et une liaison constante. De plus les produits de résorption doivent être biocompatibles et être assimilés par les systèmes lymphatique et vasculaire. Les matériaux les plus souvent utilisés sont les phosphates tricalciques (TCP), certaines hydroxyapatites synthétiques (HA) qui ont des taux de résorption différents et enfin, des mélanges biphasés (Daculsi, 1998 ; LeGeros et Daculsi, 1990 ; Daculsi et coll., 1990).

-

Matériaux à surfaces réactives : Une liaison chimique directe se forme entre la surface du matériau et le tissu osseux par l'intermédiaire d'une couche d'apatite, le cœur du matériau restant intact. Ce sont des matériaux non résorbables, destinés à rester en site osseux. C'est la raison pour laquelle les qualités biologiques, chimiques et mécaniques de la liaison obtenue à l'interface os-implant sont primordiales pour assurer la pérennité de l'implant. Exemple : les hydroxyapatite, biovitrocéramiques, bioverres, matériaux composites.

.*Hydroxyapatites*

Les HA synthétiques sont des céramiques de phosphates de calcium, qui peuvent se présenter sous forme dense ou poreuse. Leurs structures et propriétés physiques varient suivant la méthode de fabrication mais leur cristallinité et leur composition peuvent influer leurs capacités bioactives. Lorsque ces matériaux sont au contact de fluides biologiques, une attaque de surface provoque une dissolution partielle de cristaux, ce qui entraîne une sursaturation ionique en surface. Dans un deuxième temps, on assiste à une reprécipitation de microcristaux ayant incorporé des ions Ca, Mg, Carbonates, etc ; dont le résultat est la formation d'une couche d'apatite carbonatée très proche du minéral osseux.

.*Biovitrocéramiques*

Inventées par des équipes japonaises, ce sont des matériaux obtenus par le traitement thermique d'un verre dans lequel sont incorporés des agents de nucléations comme des cristaux d'apatite ou de wollastonite ($CaO\text{-}SiO_2$), afin d'améliorer les propriétés mécaniques. Pour cela, elles ont trouvé des applications en chirurgie orthopédique (Yamamuro T, 1995 ; Sedel et coll., 1992). Les échanges ioniques à la surface débutent par des phénomènes de dissolution de la matrice vitreuse et des cristaux de wollastonite, ainsi que des reprécipitations des ions phosphates et calcium à partir des fluides biologiques. Les cristaux d'apatite restent intacts. Ces matériaux possèdent des propriétés mécaniques supérieures aux verres mais la bioactivité est diminuée, Exemples : Cerabone® A/W Glass ceramic, Ceravital®.

.*Verres bioactifs*

Le concept de verres bioactifs fut introduit par Hench. Il a émis l'hypothèse qu'un verre contenant du calcium et du phosphate pouvait être biocompatible et qu'il formerait un lien chimique avec les tissus hôtes.

La caractéristique commune de l'ensemble de ces matériaux est liée à une modification cinétique de la surface suivant leur implantation en milieu biologique. Les échanges ioniques entre le matériau et les tissus environnants aboutissent à la formation en surface d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée très proche des apatites biologiques, qui est responsable de la liaison interfaciale.

L'os est un microcomposite constitué de petites particules d'apatite renforcées par des fibres de collagène (Kokubo, 1991). La formule stochiométrique de l'apatite est $Ca_{10}(PO_4)_6 OH_2$. Cependant, dans l'os, l'apatite contient des impuretés sous forme de carbonate, c'est pourquoi elle est appelé "hydroxyapatite carbonatée". La couche qui se forme à l'interface entre le biomatériau et l'os est une couche d'apatite carbonatée similaire à celle composant l'os.

-

2) <u>Principe de la bioactivité des bioverres</u>

-

Les bioverres furent mis au point par Hench (Hench, 1973) Ce sont des matériaux amorphes, non cristallins et sans périodicité atomique. Ils contiennent trois composants essentiels de l'os : des phosphates, du calcium et du sodium. Cependant, les bioverres sont des matériaux amorphes et possèdent des propriétés mécaniques médiocres : ils n'ont pas la possibilité de déformations élastiques ou plastiques, ce qui limite leur usage pour des comblements osseux dans des sites où il n'y a pas de contraintes mécaniques.

Ils sont composés de deux types d'oxydes : les oxydes *formateurs* tels que SiO_2, P_2O_5, B_2O_3 et les oxydes *modificateurs* tels que Na_2O, CaO, MgO, CaF_2, K_2O ; leurs fonctions étant de diminuer la température de fusion. Ces verres sont obtenus par fusion à haute température d'une poudre constituée d'un mélange de ces oxydes en pourcentages (en poids)

Afin de rendre bioactif un verre il faut diminuer la quantité la quantité de l'oxyde formateur, ici le SiO_2.

La technique de fabrication de base consiste à mélanger une poudre de modificateur de réseau (Na_2O ou CaO) associé à un oxyde formateur de réseau (SiO_2). Les oxydes principaux sont ensuite élaborés à haute température par fusion dans un creuset entre 1200-1400°C pendant une heure, l'ensemble se transformant en liquide. Le liquide devient homogène lorsque la température dite de fusion est maintenue suffisamment longtemps. Puis a lieu la phase dite de moulage, pendant laquelle la poudre est maintenue à une température fixe de 400°C pendant 4 heures. Si cette phase se déroule lentement et que la quantité initiale de formateur de réseau est suffisante, un verre est obtenu. La viscosité du liquide augmente de façon importante au cours du refroidissement, jusqu'à une température critique dite de transition vitreuse, à partir de laquelle le matériau devient solide. Si ces conditions ne sont pas satisfaites, la résultante sera la production non pas d'une structure vitreuse, mais d'une microstructure polycristalline.

En fait, 3 oxydes constitutifs ont un rôle primordial dans la liaison matériaux / tissu osseux : SiO_2, CaO, Na_2O. Hench et Wilson (1984) et Hench (1991) ont montré que la proportion en poids de ces oxydes influait sur le comportement bioactif des bioverres. Le nom des différents bioverres est fonction de la quantité de SiO_2 : les verres bioactif 45S 5 sont donc constitués de 45 % de silice et les verres 60S de 60 % de silice.

Principe de la bioactivité des bioverres

La cinétique de formation de la couche bioactive a été décrite après immersion du 45S 5 bioverre dans un tampon Tris (0,05 M, pH7,8) ne contenant ni calcium ni phosphate.

Première étape : Immédiatement après l'incubation, se déroule des échanges rapides entre les ions K^+ ou Na^+ du bioverre et les ions H^+ de la solution. Cette fuite des ions est rendue possible car les cations ne font pas partie du réseau de

matériaux.

Deuxième étape : La réaction précédente produit un environnement alcalin, ce qui entraîne une élimination progressive de la silice en surface dans les 15 premières minutes. La coupure des liaisons Si-O-Si induit la formation de groupes silanol (agents de nucléation). Cette dissolution se déroule en surface (le cœur de matériau est protégé) et est suivie par la condensation et la repolymérisation d'une couche riche en silice.

Troisième étape : Formation en surface d'une fine couche riche en calcium et en phosphore, amorphe dans un premier temps et cristallisant dans un second temps sous la forme d'une couche d'apatite.

Quatrième étape : La couche en silice augmente en épaisseur jusqu'à une certaine limite déterminée par la composition du verre. Le processus de dissolution cesse, bloqué par la formation d'une couche riche en silice se situant sous la couche d'apatite.

L'ensemble de ces deux couches protège l'implant, empêchant sa dissolution plus profonde et assurant sa liaison avec le tissu osseux néoformé. Le temps d'établir la liaison, les mécanismes de liaison, l'épaisseur de la zone de liaison, la résistance mécanique de la liaison diffèrent selon les matériaux. Cependant, dans tous les cas, la surface forme une couche bioactive qui est une hydroxyapatite carbonatée très proche des apatites osseuses et qui est responsable de la liaison interfaciale.

La cinétique des réactions des surfaces a été décrite par Hench en 1990 et comporte les étapes suivantes :

1 - Formation de liaison SiO_2
2 - Polycondensation de SiOH+SiOH => Si-O-Si
3 - Adsorption de Ca, PO_4, CO_3, OH amorphe
4 - Cristallisation de la couche d'apatite carbonatée
5 - Action des macrophages
6 - Adsorption des molécules organiques
7 - Attachement des cellules souches
8 - Différenciation des cellules souches
9 - Synthèse de la matrice
10 - Minéralisation de la matrice

Concept de verres bioactifs

Des différences dans les mécanismes de liaison avec le tissu osseux (dont la matrice extracellulaire est calcifiée) et les tissus mous ont conduit à distinguer deux types de matériaux bioactifs (Hench et West, 1996). Les matériaux bioactifs de ***Classe A,*** qui induisent l'ostéoproduction, est définie par Wilson comme "le processus par lequel une surface bioactive favorise la différenciation des cellules ostéoprogénitrices". Des matériaux bioactifs de ***Classe B*** qui permettent l'ostéoconduction (Schepers et Ducheyne, 1997 ; Hench et Paschall, 1974) où l'implant représente une simple surface le long de laquelle les cellules osseuses peuvent migrer. La différence des réponses tissulaires est due au fait que les matériaux de Classe A engendrent non seulement une réaction extracellulaire *(fournir un environnement qui est compatible à l'adhésion des protéines et des facteurs de croissance)* mais provoquent aussi des changements intracellulaires *(tels que la stimulation de la prolifération des cellules ostéoprogénitrices, Hench et Wilson, 1998).* Les matériaux de classe B présentent un faible taux de dissolution et donc libèrent une quantité moindre de silice soluble.

Les bioverres ont des taux de liaison aux tissus différents en fonction de leurs compositions chimiques. Les plus rapides étant les bioverres comportant 45-52% de silice qui ont aussi une capacité de liaison aux tissus mous (Wilson et coll., 1981 ; Schepers et coll., 1988 ; Wilson et Noletti, 1990). A l'inverse, les verres comportant 55-60% de silice ont un indice de bioactivité plus faible et ne se lient jamais aux tissus mous. Enfin, les verres comportant un taux de silice >60 % sont des verres bioinertes. C'est ainsi qu'un indice de bioactivité a été défini comme étant inversement proportionnel au temps requis pour que 50 % de la surface du matériau soit lié à l'os (Hench et West, 1996).

Suivant la chimie de surface, les verres sont divisés en 5 types. Surface de type 1, la plus inerte et qui ne subit aucun changement lors de l'incubation dans des fluides biologiques ; jusqu'au type 5 qui est totalement soluble. La quantité de SiO_2 (oxyde formateur majeur), diminue progressivement du type 1 à 5 et détermine la stabilité du verre.

Applications cliniques

Depuis les années 1980, les verres bioactifs ont été utilisés dans de nombreuses situations cliniques. La première application clinique des bioverres débuta en 1984 en tant que prothèse de l'oreille moyenne (Merwin G, 1986).

Les bioverres ont connu un vif intérêt depuis l'introduction et la commercialisation de PerioGlas® en 1993, pour le traitement des pertes osseuses d'origine parodontale. D'autres compositions de bioverres ont été utilisées aussi en dentisterie (Schepers et coll., 1991). L'utilisation de verre bioactif a entraîné une réparation plus rapide et plus complète du défaut. Les granules de bioverre ont montré une bonne ostéoconduction, mais également une ostéostimulation. De façon

intéressante, en plus de leurs capacités régénératrices, il s'est avéré qu'ils possèdent aussi des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires (Allan et coll., 2001).

Plus récemment, des bioverres (Bioglaze®) ont trouvé des applications en tant que revêtement d'implants (Aldini et coll., 2004 ; Stanic et coll., 2002). Cette utilisation est en voie d'exploitation afin de permettre une meilleure intégration des implants. En revanche, il existe encore des problèmes inhérents tels que la mauvaise cohésion entre l'implant et le revêtement.

L'utilisation des verres bioactifs n'est pas limitée aux applications cliniques classiques et l'avenir est en faveur de l'ingénierie tissulaire. Les verres bioactifs semblent répondre aux exigences d'une matrice adéquate pour la formation tissulaire *in vitro* (Roether et coll., 2002).

BIBLIOGRAPHIE

Aldini N, Fini M, Giavaresi G, Martini L, Dubini B, Ponzi Bossi M, Rustichelli F, Krajewski A, Ravaglioli A, Mazzocchi M, Giardino R (2004) Osteointegration of bioactive glass coated and uncaoted zirconia in osteopenic bone : an *in vitro* experimental study. J Biomed Mater Res **68A** : 264-272

Allan I, Newman H, Wilson M (2001) Antibacterail activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. Biomaterials **22** : 1683-7

Althoff J, Quint P, Krefting ER, Höhling HM (1982) Morphological studies on the epiphyseal growth plate combined with biochemical and X-ray microprobe analysis. Histochem **74 (4)** : 541-552.

Ayad S, Marriott A, Morgan K, Grant ME (1989) Bovine cartilage type VI and XI collagens. Biochem J **262** : 753-761.

Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Piluka J, Buchet R (2003) The role of annexins and alkline phophatase in mineralization process. Act Bioch Polonica. **50 (4)** : 1019-1038.

Baron R (1993) Organisation et biologie du tissu osseux. implant : 61-75

Bateman JF, Freddi S, McNeil R, Thompson E, Hermanns P, Savarirayan R, Lamandé SR (2004) Identification of flour novel COL10A1 missense mutations in Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia : further evidence that collagen X NC1 mutations impair trimer assembly. Mutation in Brief. **693** : 1-7

Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B. (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. Proc Natl Acad Sci U S A. **98 (12)** : 6698-703.

Boissy P, Malaval L, Jurdic P (2000) Ostéoblastes et ostéoclastes : une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques. Hématologie **6 (1)** : 6-16.

Britt JC, Park SS (1998) Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124** : 671-677.

Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Barra C Arevalo C, Vacanti CA (1998) Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologus porcine cartilage. J Biomater Sci Polym Ed **9** : 475-487.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem **162** : 156-159

Corvol M (1996) Biologie du cartilage de croissance. Medecine thérapeutique **2** : 46-53

Daculsi G (1998) Biphasic calcium phosphate concept applies to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. Biomaterials **19** : 1473-1478.

Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I (1990) Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. Calcif Tissue int **46 (1)** : 20-27.

De Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Constantini P, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricki C, Moro L, Panfilli E, Polleslo P, Stagni N, Vittur F (1986) Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca^{++}-binding protein. J Cell Biol **103** : 1615-1623.

De Crombrugghe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. Curr Op Cell Biol **13** : 721-727.

Ducheyne P, El-Ghannam A, Shapiro I (1994) Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue. J Cell Biochem **56** : 162-167.

Ducy P, Geoffroy V, Karsenty G (1996) Study of osteoblast-specific expression of one mouse osteocalcin gene : characterization of the factor binding OSE2. Connective Tissue Res **35 (1-4)** : 7-14.

Ducy P (2000) Cbfa1 : a molecular swicht in osteoblast biology. Dev Dyn **219** : 461-71.

Ducy P (2001) Contrôle génétique de la squelettogenèse. Médecine / Science **12 (17)** : 1242-1251.

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1997a) Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expresssion of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. Biomaterials **18** : 295-303.

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1997b) Porous bioactive glass and hydroxyapatite ceramic affect bone cell function in vitro along different time lines. J Biomed Mater Res **36** : 167-180.

Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. Arthritis Res **4** : 30-35

Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, Koida M (2001) Phosphate provides an extracellular sigtnal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. Biochem Biophys Res Commun **280** : 348-352.

Hardingham T, Bayliss M (1990) Proteoglycans of articular cartilage : changes in aging and in joint disease. Semin. Arthritis Rheum. **20 (3 suppl 1)**: 12-33.

Hattar S, Berdal A, Asselin A, Loty S, Greenspan DC, Sautier JM (2002) Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. Europ Cells and Mater **4** : 61-69.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK (1971) Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. Part 1. J Biomed Mater Res Symp **2** : 117-141.

Hench LL, Paschall HA (1973) Direct chemical bond of bioactive glass ceramic materials to bone and muscle. J Biomed Mater Res **7 (3)** : 25-42.

Hench LL, Paschall HA (1974) Histochemical responses at a biomaterial's interface. J Biomed Mater Res **8 (3)** : 49-64

Hench LL, Wilson J (1984) Surface active Biomaterials. Science **226 (4675)** : 630-636.

Hench LL (1990) Bioactive glasses and glass ceramics : a perspective. Dans : Handbook of bioactive ceramics. Volume 1 : Bioactive glasses and glass ceramics. Yamamuro T., Hench L.L., Wilson J., eds. Boca Raton : CRC Press : 7-23.

Hench LL (1991) Surface reaction kinetics and adsorption of biological moieties : a mechanistic approach to tissue attachment. In : The Bone-Biomaterials interface. Davies J.E. (ed), University Of Toronto : 33-48.

Hench LL, Anderson OH (1993) Bioactive glasses. In : An introduction to bioceramics. Hench LL, Wilson J, eds Singapore : Reed Heathcare Communications : 41-62.

Hench LL, West JK (1996) Biological applications of bioactive glasses. Life Chemistry Reports **13** :

187-241.

Hench LL, Wilson J (1998) Bioactive glasses present and future. Dans : Bioceramics **(11)** LeGeros RZ , LeGeros JP, eds : 31-35.

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talber CD, Stelling FH (1970) Potential of céramic matérials as permanently implantable skeletal prostheses. J Biomed Mater Res **4 (3)** : 433-456.

Iwamoto M, Kitagaki J, Tamamura Y, Gentili C, Koyama E, Enomoto H, Komori T, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M (2003) Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). Osteoarthritis Cart **11** : 6-15.

Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP (2000) Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent patways. Development **127** : 543-548.

Kergossien N, Sautier J-M, Forest N (1998) Gene and protein expression during differentiation and matrix mineralization in a chondrocyte cell culture system. Calcif Tissue Int **62** : 114-121.

Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. Cell Dev Biol **12 :** 69-78

Kokubo T, Ito S, Huang T, Huyashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro (1990) Ca,P-rich layer formed on high strength bioactive glass ceramic A-W. J Biomed Mater Res **24** : 331-343.

Kokubo T (1991) Bioactive glass ceramics : properties and applications. Biomaterials **12** : 155-163

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamagushi A, Sasaki K, Degushi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell **89** : 755-764.

Komori T (2000) A fundamental transcription factor for bone and cartilage. Bioch Bioph Res Com **276** : 813-816.

Komori T (2002) Runx2, a multifonctional transcription factor in skeletal development. J Cell Biochem **87** : 1-8.

Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. Nature (Bone and cartilage) **423** : 332-336.

Kwan AP, Dickson IR, Freemont AJ, Grant ME (1989) Comparative studies of type X expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. J Cell Biol **109 (4 Pt1)** : 1849-1856.

Leboy PS, Vaias L, Uschmann B, Golub E, Adams SL, Pacifici M (1989) Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen and calcium deposition in cultured chicken chondrocytes. J Biol Chem **264** : 17281-17286.

Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB (2004).Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. Yonsei Med J**. 45 Suppl** : 41-7.

Lefebvre V, De Crombrugghe B (1998) Toward understanding SOX9 fonction in chondrocyte différenciation. Matrix Biol. **16** : 529-540

Lefebvre V, Li P, De Crombrugghe B (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5) Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. EMBO J **17** : 5718-5733.

LeGeros RZ, Daculsi G (1990) In vivo transformation of biphasic calcium phosphate ceramics : ultrastructural and physicochemical characterizations. Handbook of bioactive ceramics **2** Boca Raton (FL) : CRC Press : 1-398.

Loty C, Loty S, sautier JM (1998a) Interface os/matériaux bioactifs implantables. Implant **4 (2)** : 101-109.

Loty S, Sautier JM, Bouleckbache H, Kokubo T, Forest N (1998b) Cartilage formation by fœtal rat chondrocytes cultured in alginate beads : A proposed model for investigating tissue-biomaterial interactions. J. Biomed. Mater. Res. **39** : 213-222.

Loty S, Sautier JM, Loty S, Bouleckbache H, Kokubo T, Forest N (2000) Stimulation *in vitro* de l'ostéogénèse par la formation d'une couche d'apatite carbonatée à la surface d'une céramique bioactive. Act Biomat **V** 237-243

Loty S, Foll C, Forest N, Sautier JM (2000) Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of fetal rat septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation. Arch Oral Biol **45** : 843-856.

Loty C, Sautier JM, Tan MT, Oboeuf M, Jallot E, Boulekbache H, Greenspan D, Forest N (2001) Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. J Bone Miner Res **16 (2)** : 231-239.

Mallein-Gerin F, Van Der Rest M (1996) La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. Médecine / Sciences **10 (12)** : 1087-

1096.

Merwin GE (1986) Bioglass middle ear prothesis : preliminary report. Ann Otology Rhinol Laryngol **95 (1)** : 78-82

Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai T, Tabata S, Okunaga K, Shibuya T (1996) Osteogenic differentiation of cultured marrow stem cells on the surface of bioactive glass ceramic. J Biomed Mater Res **32** : 341-348.

Ohgushi H, Caplan AI. (1999) Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. J Biomed Mater Res. **48 (6) :** 913-27.

Olsen BR (1997) Collagen IX. Int J Biochem Cell Biol **29 (4)** : 555-558.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W (2000) Bone development. Annu Rev Cell Dev Biol **16** : 191-220.

Ortega N, Behonick DJ, Werb Z (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. Trends Cell Biol 14(2) : 86-93

Otto F, Thornell A, Crompton T, Denzel A, Gilmour K, Rosewell I, Stamp G, Beddington R, Mundlos S, Olsen B, Selby P, Owen M (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differenciation and bone development. Cell **89** : 765-771

Poole AR (1986) Proteoglycans in health and desease : structure and functions. Biochem. J. **236** : 1-14.

Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA (1994) Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. Biomaterials **15** : 774-778.

Reynolds ES (1963) J Biophys Biochem Cytol **17 :** 208

Roether JA, Boccaccini AR, Hench LL, Maquet V, Gautier S, Jerjme R (2002) Development and *in vitro* characterization of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polyactile foams and bioglass for tissue engineering applications. Biomaterials **23 (18)** : 3871-8

Rosen V, Thies RS (1992) The BMP proteins in bone formation and repair. Trends in genetic **8 (3)** : 97-102.

Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA (2001) Age dependence of cellular

properties of human septal cartilage. Implications for tissue engineering. Arch Otolaryngol Head Neck Surg **127** : 1248-1252.

Salminen H, Vuorio E, Säämänen AM (2001) Expression of Sox9 and Type IIA Procollagen During Attempted repair of Articular Cartilage Damage in a Transgenic Mouse Model of Osteoarthristis. Arthritis and Rheumatism. **44 (4)** : 947-955.

Sautier JM, Nefussi JR, Forest N (1993) In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. Biol Cell **78** : 181-189.

Sautier JM, Loty C, Loty S (1998) Les bioverres et leurs applications cliniques dans la régénération osseuse. J parodonto implanto orale **17 (4)** : 431-439

Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R (1991) Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. J Oral Rehabil **18** : 439-452

Schepers E, Ducheyne P (1997) Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects : a 1-24 month experiment with several materials and particle size and size ranges. J Oral Rehabil **24** : 171-181.

Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P (1988) Histological and histomorphometrical analysis glasses and fiber-reinforced bioactive glass dental root implant. J Oral rehabil **15 (5)** : 473-487.

Schmid TM, Linsenmayer TF (1985) Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. J Cell Biol **100** : 598-605.

Schmid TM, Bonen DK, Luchene I, Linsenmayer TF (1991) Late events in chondrocyte differentiation, hypertrophy, type X collagen synthesis and matrix calcification. In vivo **5** : 533-540.

Sedel L, Fumery P, Yamamuro T (1992) Apatite-wallastonite glass ceramic (AWGC) used as shelf procedure for recurrent shoulder dislocation stabilization (a preliminary clinical trial). In : Yamamuro, Kokubo, Nakamuro, editors. Bioceramics 5. Kobunshi Kankokaï : 427-434

Silver IA, Deas J, Erecinska M (2001) Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects fo 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentration and cell viability. Biomaterials **22** : 175-185.

Simmons DJ (1985) Fracture healing perspectives. Clin Orthop Rel Res. **200** : 100-113

Stanic V, Aldini N, Fini M, Giavaresi G, Giardino R, Krajewski A, Ravaglioli A, Mazzocchi M,

Dubini B, Bossi MG, Rustichelli F (2002) Osteointegration of bioactive glass cated zirconia in healthy bone : an *in vivo* evaluation. Biomaterials **23 (18)** : 3833-41

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. Genes Dev **13** : 2072-2086.

Vacanti JP, Morse MA Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg **23 (1 pt 2)** : 3-9.

Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP (1991) Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast Reconstr Surg **88** : 753-759.

Van Der Rest M, Rosemberg LC, Olsen BR, Poole AR (1986) Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. Biochem J **237** : 923-925.

Van Osch G, Marijnissen W, Van der Veen S, Verwoerd-Verhoef H (2001) The potency of culture-expended nasal septum chondrocytes for tissue engineering of cartilage. Am J Rhinol **15 (3)** :1 87-192.

Vertel BM, Grier BL Li H, Schwartz NB (1994) The chondrodystrophy, manomelia : biosynthesis and processing of the defective aggrecan precursor. Biochem J **301** : 211-216.

Vrouwenvelder WC, Groot CG, Groot K (1992) Behavior of fetal rat osteoblasts cultured *in vitro* on bioactive glass and non reactive glasses. Biomaterials **13 (6)** : 382-392.

Vrouwenvelder WC, Groot CG, Groot K (1994) Better histology and biochemistry for osteoblasts cultured on titanium doped bioactive glass: 45S5 compared with iron, titanium, fluoride and boron containing bioactive glasses. Biomaterials **15 (2)** : 97-106.

Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE (1998) Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engeering. Biotechnol Prog **14** : 193-202.

Wang D, Canaff L, Davidson D, Corluka A, Liu H, Hendy GN, Henderson JE (2001) Alterations in the Sensing and Transport of Phosphate and Calcium by Differentiating Chondrocytes. J Biol Chem **276 (36)** : 33995-34005.

Watanabe H, Yamada Y, Kimata K (1998) Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. J Biochem **124 (4)** : 687-693.

Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, hench LL (1981) Toxicology and biocompatibility of bioglasses. J Biomed Mater Res **15** : 805.

Wilson J, Noletti D (1990) Bonding of soft tissues to bioglass. Dans : Handbook of bioactive ceramics **(1)** Yamamuro T, Hench LL, Wilson J, eds Boca Raton (FL) : CRC Press : 283-302.

Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2000) Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro : implication and applications for bone tissue engineering. Calcif Tissue Int **67 (4) :** 321-329

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2001) Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. J Biomed Mater Res **55 (2)** : 151-157

Yamamuro T (1995) AW glass ceramic in spinal repair. In : Wilson, Hench, Greenspan, editors. Bioceramics 8. New york : Elsevier Science : 123-127

Yao J, Radin S, Leboy PS, Ducheyne P (2005) The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-*co*-glycolic acid) / bioactive glass substrate for tissue engineering. Biomaterials **26** : 1935-1943

Zuscik MJ, D'Souza M, Ionescu AM, Gunter KK, Gunter TE, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN (2002) Growph plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. Exp Cell Res **276** : 310-319