

# Approche biologique : matériel et méthode

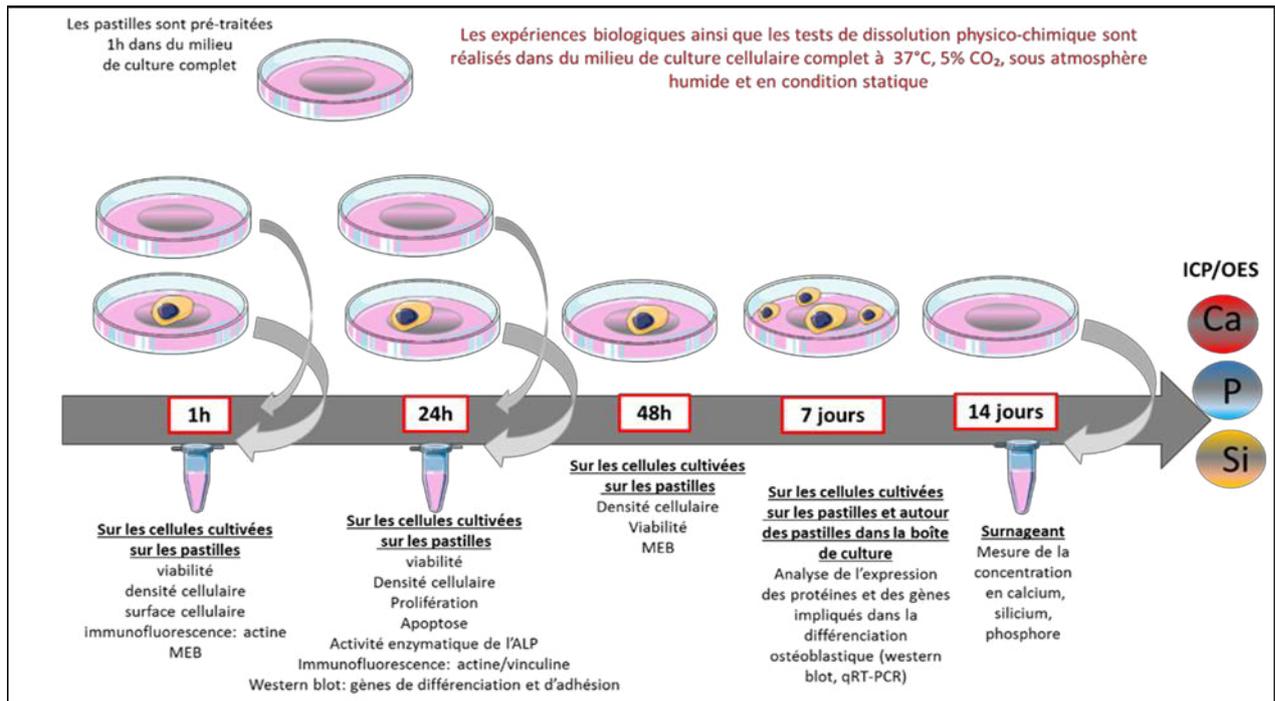
# Chapitre III. Approche biologique : matériel et méthode

## III.1. Plan expérimental

Afin d'évaluer l'influence de la microstructure et de la composition chimique des 6 variantes de biomatériaux sur la réponse cellulaire, deux lignées cellulaires ont été utilisées. La lignée cellulaire murine de monocytes/macrophages RAW 264.7 (Sigma-Aldrich, Germany), précurseur d'ostéoclastes et la lignée murine pré-ostéoblastique MC3T3-E1 (DSMZ, Germany). Différents critères et tests fonctionnels ont été réalisés sur ces deux lignées.

L'interaction des cellules au contact des pastilles a été analysée en étudiant l'adhésion cellulaire (densité cellulaire, surface cellulaire, adhésions focales). La biocompatibilité des biomatériaux a été vérifiée en étudiant la viabilité et le métabolisme cellulaire. Concernant les tests fonctionnels, la prolifération et la différenciation cellulaire ont été étudiées à travers différents points de cinétique.

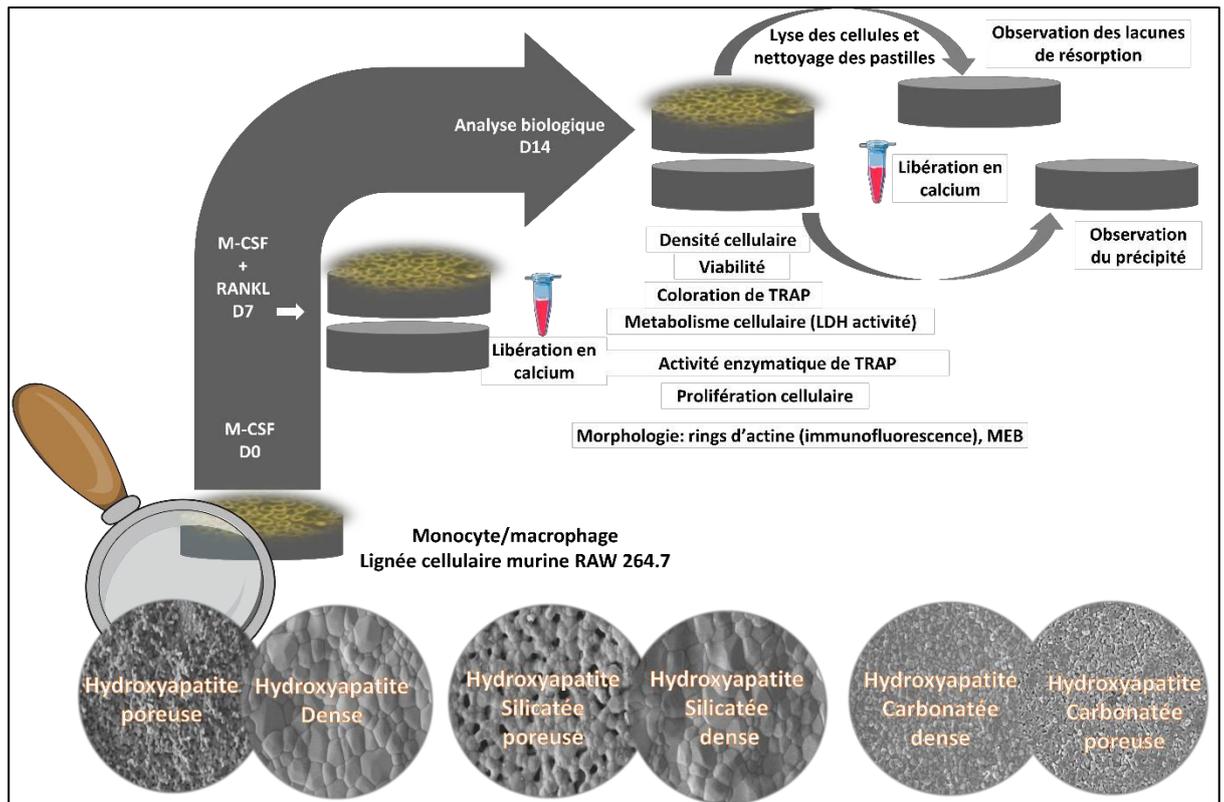
La lignée MC3T3-E1 étant une lignée pré-ostéoblastique, les tests biologiques ont été réalisés sur une cinétique de temps plutôt court, 1 h, 24 h ou 48 h (Figure 30). Des tests de différenciation à 7 jours ont également été réalisés (Figure 30).



**Figure 30** : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée pré-ostéoblastique MC3T3-E1

Concernant la lignée de monocytes/macrophages RAW 264.7, les analyses ont été réalisées à 14 jours afin de suivre la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes sous l'action du milieu de culture différenciant.

Les analyses biologiques avec les cellules RAW 264.7, ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut des biomatériaux d'Erlangen en Allemagne. Dans le cadre d'un stage de deux mois dans le laboratoire du Professeur Aldo R Boccaccini et supervisée par le docteur Rainer Detsch, j'ai pu cultiver cette lignée cellulaire sur l'ensemble de six variantes de biomatériaux et réaliser les différentes expériences biologiques présentées ci-dessous ([Figure 31](#)).



**Figure 31** : plan d'expérience des évaluations biologiques réalisées avec la lignée de monocytes/macrophages RAW 264.7

## III.2. Matériels et Méthodes

### III.2.1. Milieux de culture

#### III.2.1.1 Milieu de culture pour la lignée MC3T3-E1

Le milieu de culture utilisé était du milieu  $\alpha$ MEM (Gibco, United States) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF) (Biochrom, Germany), 50 UI/ml pénicilline/ 50  $\mu$ g/mL streptomycine (P/S) (Invitrogen, France) et 2mM de L-Glutamine (Invitrogen, France).

##### III.2.1.1.1. Milieu de culture de différenciation ostéogénique

Le milieu de différenciation utilisé était du milieu complet (décrit ci-dessus) auquel avait été ajoutés :

- 100 nM dexaméthasone (Sigma Aldrich, France)
- 10 mM beta-glycérophosphate (Sigma Aldrich, France)
- 50  $\mu$ M acide ascorbique (Sigma Aldrich, France)

### III.2.1.2 Milieu de culture pour la lignée RAW 264.7

Le milieu de culture complet utilisé pour la culture des cellules RAW 264.7 était du RPMI (Gibco, United States) supplémenté avec 10% de SVF (life technology, France), 1% de pénicilline/ streptomycine (ThermoFisher, France) dans lequel a été ajouté le facteur de différenciation de stimulation des macrophages/*macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF, 25 ng/ml, Biochrom, Germany) qui favorise la fusion cellulaire. Au bout des 7 premiers jours de culture, le milieu a été changé avec un milieu complet contenant les deux facteurs de différenciation: M-CSF mais aussi le facteur de différenciation activateur du récepteur du ligand NFκB/*receptor activator of the NFκB ligand* (RANK-L, 40 ng / mL, Biochrome, Germany) qui lui a spécifiquement induit la différenciation en ostéoclastes.

### III.2.1.3 Conditions de culture

Les cellules ont été cultivées en routine dans des flasques 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Germany), dans un incubateur à 37 °C, sous flux de 5% de CO<sub>2</sub> et atmosphère humide. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours. Les cellules ont été passées lorsque la confluence atteignait 80%. Les cellules utilisées pour les évaluations biologiques étaient de passage 3 à 7 maximum. Avant de réaliser l'évaluation biologique, les pastilles ont été nettoyées dans de l'éthanol absolu 1 min sous ultrasons. Elles ont ensuite été stérilisées dans un autoclave 21 min, 121 °C.

Il est important de souligner que pour favoriser l'interaction entre cellules et biomatériaux toutes les pastilles ont été préalablement traitées, c'est-à-dire immergées dans du milieu de culture complet pendant 1 h, avant d'êtreensemencées avec les cellules. Pour réaliser les évaluations biologiques, les cellules ont directement étéensemencées sur les pastilles.

## III.2.2. Interaction des cellules au contact des différents biomatériaux

Pour chaque lignée, l'évaluation de la densité cellulaire et de la morphologie des cellules ont été réalisées.

### **III.2.2.1 Densité cellulaire**

#### **III.2.2.1.1. Densité cellulaire des MC3T3-E1**

25 000 cellules/cm<sup>2</sup> ont étéensemencées pour chaque condition. Après 1 h, 24 h ou 48 h de culture, les cellules ont été fixées à la surface des pastilles avec du méthanol glacial pendant 7 min. Les pastilles ont été ensuite rincées avec du PBS 1X. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution de protéines albumine du sérum de bœuf, (BSA, Sigma Aldrich, France) 3% pendant 30 min. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du Hoechst 33342, (Thermofisher, France). Un nombre d'images en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany), significatif et représentatif de la densité cellulaire à la surface de chaque pastille a été réalisé. Le nombre de noyaux équivalent au nombre de cellules par champs a été rapporté au nombre de cellules par cm<sup>2</sup>. Les résultats ont été normalisés par rapport à un contrôle interne : la lamelle de verre, (Thermofisher, France).

#### **III.2.2.1.2. Densité cellulaire des RAW 264.7**

1 000 000 de cellules / 1 mL de milieu de culture ont étéensemencées sur chaque pastille. Après 14 jours, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 1 h. Les cellules ont été rincées. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution de BSA 3% pendant 15 min puis les cellules ont été rincées au PBS 1X, (Gibco, United States). Les noyaux ont été marqués au SYTOX (Thermofisher, Germany) et la densité cellulaire a été estimée en comptant le nombre de noyaux par cm<sup>2</sup>.

### **III.2.2.2 Adhésion cellulaire**

#### **III.2.2.2.1. Adhésion des cellules MC3T3-E1**

Pour évaluer l'adhésion des deux types de cellules, le cytosquelette d'actine a été mis en évidence par immunofluorescence pour étudier la morphologie des cellules. La technique de dessiccation par contournement du point critique du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), une technique de préparation des échantillons, a permis d'étudier l'interaction des cellules avec le substrat. Les images ont ensuite été prises

respectivement avec un microscope à épifluorescence et un microscope électronique à balayage.

### **Approche immunocytochimique**

Après avoir fixé les cellules dans du méthanol glacial 7 min. Celles-ci ont été rincées 3 fois au PBS 1X -BSA 3%. Elles ont ensuite été rincées 3 fois au PBS 1X, puis un anticorps anti  $\beta$  actine dilué au 1/1000 dans une solution de PBS 1X / BSA 3% a été hybridé 1 nuit à 4°C, (anti  $\beta$  actine, Sigma Aldrich, France, référence : A5441, Tableau 26). Après avoir rincé 3 fois la solution contenant l'anticorps primaire avec du PBS 1X, une solution contenant l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome AlexaFluor 488 ou 594, dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du PBS 1X a été déposée sur les cellules pendant 30 min à l'obscurité (ThermoFisher, référence : SA5-10173, Tableau 27). Après avoir été monté dans un milieu de montage, les cellules ont été observées en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany), et 10 images sont réalisées sur plusieurs champs selon les biomatériaux sur lesquels les cellules étaient présentes. Les observations des cellules à la surface des pastilles ont été réalisées pour pouvoir analyser de façon qualitative la morphologie des cellules et leur cytosquelette. La quantification a été réalisée avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **Dessiccation par contournement du point critique**

Les cellules à la surface des pastilles ont été fixées à 4°C toute la nuit avec une solution de glutaraldéhyde 2,5%, puis elles ont subi une série de bains dans de l'acétone à concentrations successivement croissantes (30%, 50%, 70%, 80%,90% et 100%) pour commencer l'étape de déshydratation. L'étape de déshydratation des cellules à la surface des pastilles a continué dans un appareil de dessiccation. Les pastilles contenant les cellules à leur surface ont ensuite été placées dans cette chambre à pression. Plusieurs bains avec du CO<sub>2</sub> liquide ont été réalisés pour finaliser la déshydratation, puis l'étape de dessiccation par contournement du point critique du CO<sub>2</sub> a été réalisée pour sécher les cellules à la surface des pastilles en les maintenant à une pression >73,77 bar et à une température >30,98°C. Des images ont ensuite été réalisées par microscopie électronique à balayage (Jeol JSM-7400F, Japan). Cette

technique a été réalisée sur des cellules cultivées sur les pastilles pendant 1 h et pendant 48 h.

#### **III.2.2.2.2. Adhésion des cellules RAW 264.7**

De même que précédemment les caractéristiques morphologiques des cellules RAW 264.7 ont été analysées par la technique d'immunofluorescence et par dessiccation, contournement du point critique du CO<sub>2</sub>.

##### **Approche immunocytochimique**

Après 14 jours, les cellules ont été fixées 15 min dans du paraformaldéhyde (PFA), à 3,7%, perméabilisées 5 min dans du triton 0,1%, puis les noyaux ont été marqués avec du SYTOX, (Thermofisher, Germany dilution 1/1000), et la phalloïdine-FITC (Molecular probes, The Netherlands, dilution 1/1000) a permis de marquer les rings d'actine.

Les images ont été prises avec le microscope à épifluorescence (Axiovert Zeiss, Germany). Le nombre total de cellules a pu être analysé par traitement d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Le nombre de cellules multinucléées sur le nombre total de cellules a pu aussi être déterminé (30 champs: 10 champs sur 3 pastilles indépendantes, grossissement X20). Le périmètre des cellules a aussi été analysé (90 cellules au total prises au hasard, soit : 30 cellules sur 3 pastilles indépendantes) en traçant le contour des cellules par traitement d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

##### **Dessiccation par contournement du point critique**

Les cellules ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde (3%), de sodium cacodylate (0,2 M) et de paraformaldéhyde (3%), (Sigma Aldrich, USA) selon le protocole suivant : (1 mL de 50% de glutaraldéhyde (0,1%), 10 g de paraformaldéhyde, 25 g de sucrose, 500 mL de sodium cacodylate Trihydrate (solution 0,2 M)). Les cellules ont ensuite été déshydratées dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes : 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et 100%. Après la dessiccation par contournement du point critique dans la chambre de dessiccation (sigma aldrich), les cellules ont été analysées par un MEB (Auriga CrossBeam, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

### III.2.2.2.3. Adhésions focales des MC3T3-E1

Après 24 h de culture dans le milieu de culture complet, l'adhésion des cellules a été analysée en comptant le nombre d'adhésions focales formées. Deux protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire : l'actine et la vinculine ont été marquées avec les anticorps spécifiques (anti-vinculine, R&D, France, référence : MAB68961 et anti  $\beta$  actine, Sigma Aldrich, France, référence : A5441, [Tableau 26](#)).

Avec la même approche que citée précédemment : après la fixation des cellules au méthanol glacial et la saturation des sites non-spécifiques par la BSA 3%, les deux protéines ont été marquées avec un anticorps spécifiquement dirigé contre les protéines d'intérêt ( $\beta$  actine et vinculin). Deux anticorps secondaires appropriés (chèvre anti lapin IgG, dilution : 1/1000, ThermoFisher, France, référence : A11012 et chèvre anti souris IgG, dilution : 1 goutte/500  $\mu$ l, ThermoFisher, France, référence : R37120, [Tableau 27](#)) ont servi à visualiser la fluorescence. Un nombre significatif et représentatif d'images a été réalisé en microscopie à épifluorescence (Axio Zeiss, Germany) pour compter le nombre d'adhésions focales par champ. La superposition du marquage actine et vinculine a été considérée comme étant une adhésion focale. Le nombre d'adhésions focales par champ a été ramené au nombre de noyaux sur ce champ pour estimer le nombre moyen d'adhésions focales par cellule.

## III.2.3. Biocompatibilité des biomatériaux

### III.2.3.1 Viabilité des cellules ostéoblastiques

#### III.2.3.1.1. Principe de l'expérience du marquage à la calcéine

La calcéine AM (Thermofisher, France) a été utilisée pour mesurer le taux de viabilité des ostéoblastes après 1 h, 24 h et 48 h de culture. Ce test est basé sur le principe de clivage de la molécule de calcéine par les estérases intracellulaires des cellules vivantes. Ces estérases ont clivé le groupe acétométhoxy des molécules de calcéine et ainsi permis le piégeage de la molécule à l'intérieur des cellules vivantes ainsi que l'émission d'une forte fluorescence verte. Le ratio cellules fluorescentes vertes sur noyaux totaux bleus a permis d'estimer le taux de viabilité cellulaire.

### **III.2.3.1.2. Protocole du marquage à la calcéine**

Les cellules cultivées sur les biomatériaux ont été immergées pendant 15 min dans du milieu de culture basal (sans sérum de veau fœtal) supplémenté avec 10  $\mu$ M de calcéine AM. En effet, les protéines du sérum de veau fœtal peuvent complexer la calcéine, c'est pourquoi il est important de faire attention à ne pas utiliser de milieu contenant du sérum de veau fœtal pour cette expérience. Les cellules sont restées au contact de la calcéine 15 min dans l'incubateur à 37°C, puis, le milieu a été enlevé. Les cellules ont été fixées avec du méthanol glacial 7 min. Les noyaux ont ensuite été marqués avec du Hoechst 33342 (Thermo scientific, France, dilution 1/1000) pendant 5 min. Les images ont été effectuées avec le microscope à épifluorescence Axio Zeiss. Le traitement d'image a été réalisé sur un nombre significatif et représentatif d'images avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), en comptant tous les noyaux marqués en bleu avec du Hoechst 33342 et les cellules vivantes fluorescentes vertes.

### **III.2.3.2 Viabilité des cellules ostéoclastiques**

#### **III.2.3.2.1. Test WST-8**

Le test WST-8, (Sigma, Germany), a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Ce test diffère du test usuel MTT couramment utilisé dans la mesure où il n'est pas toxique et que les sels de formazan produits sont directement solubles dans le milieu de culture. Le principe demeure néanmoins le même. La molécule WST-8 est directement ajoutée sur les cellulesensemencées sur les pastilles (1 000 000 cellules/1 mL/ pastille dans un puits de 4 cm<sup>2</sup>). Les cellules vivantes vont réduire WST-8 grâce à leur déshydrogénase en sel de formazan orange. L'absorbance directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes a été mesurée dans un lecteur de plaque à 450 nm, (Phomo, Anthos Mikrosysteme, Germany).

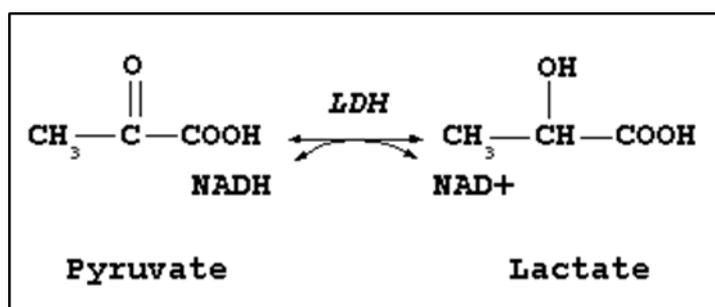
## **III.2.4. Étude de la mort des cellules MC3T3-E1**

Le taux d'apoptose à la surface des biomatériaux a été calculé. A la suite de toutes les étapes d'immunocytochimie citées précédemment, à savoir : fixation des cellules avec du méthanol glacial, saturation avec de la BSA 3% et rinçage des cellules au PBS 1X ; les éventuelles cellules apoptotiques ont été marquées avec un anticorps anti caspase

3 clivée diluée au 1/400 dans la BSA 3% (Ozyme, France), Tableau 26). Un anticorps secondaire spécifique a également été utilisé pour révéler la fluorescence (chèvre anti lapin IgG, dilution : 1/1000, ThermoFisher, référence : A11012 Sigma Aldrich, France, Tableau 27). L'ensemble des noyaux a été marqué au Hoechst 33342 (Thermo scientific, France, dilution 1/1000) pendant 5 min. Le ratio cellules apoptotiques sur cellules totales a permis d'estimer le taux d'apoptose à la surface d'un biomatériau.

### III.2.5. Test d'activité métabolique des RAW 264.7

Le métabolisme cellulaire a été estimé en quantifiant l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase, (LDH), des cellules adhérant aux biomatériaux. Un kit (Sigma, Germany) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après avoir enlevé le surnageant cellulaire et par conséquent les cellules mortes n'adhérant plus aux biomatériaux, les cellules vivantes adhérant aux biomatériaux ont été lysées avec une solution de lyse non dénaturante : (TRITON-1X, sucrose 5 % dans du PBS). Le lysat cellulaire a directement été mélangé au substrat. L'activité enzymatique a été réalisée par la conversion chimique du lactate en pyruvate (Figure 32). Le changement de forme par oxydation de la molécule se caractérise par le changement d'absorbance de la molécule. La quantité de réaction enzymatique a donc été estimée par le niveau d'absorbance mesuré à 490-690 nm dans un spectrophotomètre UV-VIS spectrometer (SPECORD 40 BU, analytik jena AG, Germany).



**Figure 32** : principe de la réaction enzymatique de la lactate déshydrogénase.

L'enzyme LDH a converti la formation réversible par oxydation/réduction du pyruvate/lactate sous l'action de cofacteur/coenzyme : la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

## **III.2.6. Tests fonctionnels**

### **III.2.6.1 Prolifération des cellules MC3T3-E1**

Après 24 h de culture, le kit d'imagerie EdU (thermofisher, France) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Le réactif a été mis à incuber pendant 4 h avec les cellules. Le principe est basé sur l'intercalation de base analogue à la Thymine : EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé par les cellules en prolifération. L'émission de fluorescence a été permise grâce à une réaction de chimie-click, dans le noyau des cellules proliférantes ayant intégré cette base dans leur ADN. Un nombre significatif et représentatif d'images a également été réalisé par microscopie à épifluorescence, (Axio Zeiss, Germany). L'ensemble des noyaux a été compté et le rapport noyaux totaux (bleus et verts) et noyaux de cellules en prolifération (verts) a permis d'estimer le taux de prolifération.

### **III.2.6.2 Prolifération des cellules RAW 264.7**

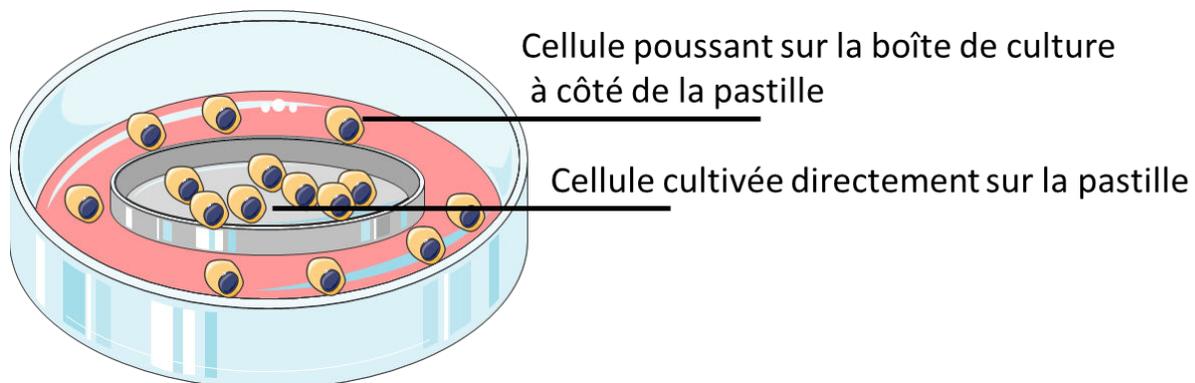
La prolifération des cellules ostéoclastiques a été estimée par l'incorporation de la molécule BromodeoxyUridine, (5-Bromo-2-DeoxyUridine, BrdU), anticorps analogue à la base thymidine dans l'ADN en répliation (phase S) du cycle cellulaire. Un kit a été utilisé, selon les recommandations du fabricant, (Roche Molecular diagnostics, Germany). Les réactifs ont directement été ajoutés sur les cellulesensemencées sur les pastilles, ( $1 \times 10^6$  pour 1 mL par pastille) et après 30 min, l'absorbance a été mesurée à 450 nm, dans un lecteur de plaque, (Phomo, Anthos Mikrosyteme, Germany). Le taux de prolifération est proportionnel à la quantité de coloration mesurée.

### **III.2.6.3 Différenciation des cellules ostéoblastiques**

La différenciation cellulaire a été estimée en mesurant l'activité enzymatique de l'alcaline phosphatase et en étudiant l'expression des protéines et de gènes exprimés spécifiquement au cours de la différenciation : ALP, ostéopontine, collagène I, RUNX 2, ostéoclastine (Beck et al., 2001) ([Figure 4](#)).

Afin de réaliser ces expériences d'études d'expression génique et protéique, des pastilles ( $\varnothing 18$  mm) ont été utilisées dans des boîtes de culture de 6 puits. L'objectif

était de récupérer les protéines et les ARN des cellules ensemencées directement sur la pastille mais aussi les protéines au fond des puits sur des cellules qui n'étaient pas en interaction directement sur la pastille (Figure 33).



**Figure 33** : plan de recherche pour étudier la différenciation cellulaire ostéoblastique

Une méthode efficace d'extraction a été utilisée pour extraire en une fois les protéines et les ARNs du même échantillon expérimental selon les travaux de Morse *et al*, (Morse et al., 2006).

Cette méthode permet de réduire la quantité de matériel biologique ainsi que le nombre de biomatériaux utilisés. En plus de réduire les efforts expérimentaux et du gain de temps, elle permet également de simplifier l'interprétation des résultats en évitant les biais dus aux variations expérimentales. L'extraction d'ARNs a été réalisée avec un kit commercial (RNeasy, Sigma Aldrich) mais au lieu de jeter l'éluat comme d'habitude, il a été récupéré et congelé à -20°C pour faire précipiter les protéines. Les protocoles sont détaillés ci-dessous.

#### III.2.6.3.1. Etude de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique par qRT-PCR

L'ARN des cellules a été extrait avec un kit d'extraction d'ARN RNeasy® Plus Micro (Qiagen, France). Les cellules ont été rincées une fois en PBS 1X. Selon les recommandations du fabricant, un tampon de lyse enrichi en  $\beta$ -mercaptoéthanol a permis de lyser les cellules tout en protégeant les ARN de la dégradation.

Le lysat récupéré a été placé sur des colonnes « gDNA eliminator » et centrifugé à 17 000g pendant 50 s. L'ADN génomique a été ainsi piégé et l'éluat contenant les protéines a été sauvegardé pour étudier l'expression protéique des cellules.

Un volume identique d'éthanol 70% a été rajouté à l'éluat pour faire précipiter les acides nucléiques. Le mélange a été placé sur une colonne « RNA microspin » et le tout a été centrifugé à 17 000g pendant 30 s (à cette étape les éluats contenant les protéines ont été conservés à -20°C). L'ARN ainsi piégé dans ces colonnes a été lavé 3 fois puis élué à l'aide de 14 µL d'eau distillée. Les ARNs ont été dosés par spectrophotométrie à 230, 260 et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop2000, (ThermoFisher, France) et conservés à -20°C.

L'étape de qPCR se réalise à partir de l'ADNc. Après l'extraction d'ARN, une étape intermédiaire de RT-PCR a permis d'obtenir les ADN complémentaires, (ADNc), de l'ARN extrait. Cette réaction a été réalisée avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France), dans un thermocycler, (Techne Prime Thermal cyclers, UK). La qPCR a ensuite été réalisée avec des sondes Taqman spécifiques (Applied Biosystem) ([Tableau 25](#)) et un Kit Taqman Fast Universal PCR Master mix 2X (Applied Biosystem) sur la base du protocole du fabricant.

Nom des gènes	références sondes et amorces TaqMan
<i>RUNX2</i>	Mm00501584_m1
<i>Col1a2</i>	Mm004833888_m1
<i>ALP</i>	Mm00475834_m1
<i>18S</i>	Mm039228990_g1
<i>Actb</i>	Mm00607939_s1
<i>GAPDH</i>	Mm99999915_g1

**Tableau 25** : liste des gènes utilisés pour la qPCR (TaqMan Applied Biosystem).

**18S, Actb et GAPDH sont les gènes de ménages utilisés pour normaliser l'expression génique**

### **III.2.6.3.1.1. Méthode de quantification de l'expression génique**

Premièrement, les cycles seuils « *cycle threshold* » (Ct) des gènes ont été soustraits au Ct du gène de ménage variant le moins entre les conditions : c'est le  $\Delta Ct$ . Deuxièmement, le Ct d'une référence interne (la lamelle de verre), a été soustrait au  $\Delta Ct$  obtenu précédemment : c'est le  $\Delta\Delta Ct$ . La quantification relative (RQ) des gènes d'un échantillon est déterminée par la formule  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Le gène choisi comme gène

de ménage pour normaliser les échantillons est le gène 18S qui ne varie pas quelque soit les conditions.

### **III.2.6.3.2. Etude de l'expression des protéines impliquées dans la différenciation ostéoblastique par western blot**

Le premier éluat récupéré lors de l'extraction d'ARN a été congelé au minimum 24 h à -20°C pour faire précipiter les protéines. Un culot blanchâtre s'est formé témoignant de la présence des protéines. Après centrifugation (17 000g - 15 min à 4°C), le surnageant a été jeté et selon le protocole de (Morse et al., 2006), de l'éthanol absolu à -20°C a été ajouté sur les culots précipités pour les laver. Cette étape de lavage a été réalisée 3 fois. Le surnageant a été jeté et le culot mis à sécher toute une nuit à température ambiante.

Quant aux cellules autour de la pastille, elles ont été lysées avec du tampon Laemmli (1X)\* (Laemmli, 1970).

Tous les lysats cellulaires ont ensuite été resuspendus dans du tampon de charge\* pour visualiser la migration des protéines sur gel d'acrylamide (Biorad, France).

Les extraits protéiques en tampon Laemmli 1X ont été passés au sonificateur pour casser l'ADN et dosés par la méthode de Lowry\*, (une méthode de dosage insensible aux détergents), avec un kit, (Dc protein assay, Biorad, France), selon les recommandations du fabricant.

Les protéines issues de l'éluat n'ont pas été dosées car il a été estimé que les cellules ont étéensemencées de façon identique sur toutes les pastilles et que cette méthode ne permet pas un résultat précis de la quantification, du fait de la difficulté de resuspension du culot protéique. Pour pouvoir comparer les conditions entre elles, un contrôle interne, la détection d'une protéine dite de ménage, ( $\beta$ -actine), a été utilisé pour normaliser les résultats.

Les lysats protéiques dilués au 1/4 dans le tampon de charge ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Precision plus protein™ dual color standard biorad) ont été chargés dans des gels de polyacrylamide (gradient 4-15% - Biorad) et séparés par électrophorèse dans du tampon de migration (1X)\* (Biorad) à 110 V - 5 min puis 130 V - 55 min.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinyl difluoride), de porosité 0,45 µm, préalablement activée dans de l'éthanol absolu pendant 2 min, selon le principe en semi sec dans du tampon de transfert\*, (Biorad), pendant 7 min à 25 V.

Le transfert des protéines sur membrane a été vérifié avec du rouge ponceau\*. Les sites antigéniques aspécifiques ont été saturés en TBS 1X\* - Tween 20 à 0.05%v/v - BSA 5%<sub>m/v</sub>. Les membranes ont ensuite été hybridées avec les anticorps primaires\* d'intérêt (Tableau 26), pendant une nuit à 4°C, sur un agitateur à rouleau. Les membranes sont rincées 3 fois au TBS 1X et hybridées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires correspondants (Tableau 27). Certaines membranes ont été déshybridées avec du tampon de déshybridation\* pour la révélation d'autres protéines d'intérêt.

Les protéines d'intérêt ont été révélées par une réaction chimioluminescente avec un réactif, (clarity western ECL substrate Biorad), selon les recommandations du fabricant.

Marque	Espèce productrice	Espèce reconnue	Poids moléculaire (KDa)	Protéine reconnue	clonalité	dilution
<b>Western Blot</b>						
R&D system	Chèvre	Souris	75	ALP	polyclonale	1/200
Sigma Aldrich	Souris	Souris	45	Actine	monoclonale (AC10)	1/10000
ABCAM	Lapin	Souris	35	Ostéopontine	monoclonal (EPR3688)	1/1000
ABCAM	Lapin	Souris	57	RUNX2	polyclonale	1/1000
<b>Immunocytochimie</b>						
R&D, France, MAB68961	Lapin			Vinculine	M (728513),	1/300
Sigma Aldrich A5441	Chèvre			β actin	M (AC-15)	1/1000
Ozyme #9661	Lapin			Caspase 3 clivée (Asp175)	Polyclonale	1/400

**Tableau 26** : liste des anticorps primaires utilisés

Marque	Espèce productrice	Espèce reconnue	Anticorps secondaires	dilution
<b>Western Blot</b>				
DAKO	Lapin	Chèvre	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
DAKO	Chèvre	Souris	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
DAKO	Chèvre	Lapin	Immunoglobuline polyclonale/HRP	1/3333
<b>Immunocytochimie</b>				
ThermoFisher, A11012	Chèvre	Lapin IgG	conjugaison : AF594P	1/1000
ThermoFisher, SA5-10173	Chèvre	Souris IgG	AlexaFluor 488 ou 594	1/2000
ThermoFisher, R37120	Chèvre	Souris IgG	conjugaison : AF488P	1 goutte/500µL

**Tableau 27** : liste des anticorps secondaires utilisés

Les western blots ont été quantifiés par traitement d'images en mesurant l'intensité de chemiluminescence avec le logiciel Mac biophotonics ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les résultats sont normalisés par la protéine d'intérêt, la  $\beta$ -actine.

#### III.2.6.3.3. **Activité enzymatique de l'alkaline phosphatase au cours de la différenciation des cellules ostéoblastiques**

Après 24 h de culture, les protéines totales des 25 000 cellules / cm<sup>2</sup> de chaque condition d'analyses ont premièrement été extraites avec un tampon non dénaturant (PBS triton 0.1%). Le test a été réalisé selon les instructions du fabricant avec quelques modifications apportées (Sigma Aldrich). Le substrat p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) a été ajouté sur les protéines totales. La réaction a été mise à métaboliser à l'abri de la lumière et à 37°, 12 h. Le lendemain, la réaction a été stoppée avec de la soude 37%. L'absorbance a été mesurée dans un lecteur de plaque, (OPTIMA Reader), à 405 nm. Pour être en mesure de comparer tous les résultats et avoir des quantités comparables de protéines analysées pour chaque condition, chaque résultat obtenu pour l'activité enzymatique a été normalisé par la concentration en protéines totales correspondante.

### **III.2.6.4 Différenciation des cellules ostéoclastiques**

#### **III.2.6.4.1. Coloration des cellules positives à la phosphatase acide résistante à l'acide tartrique (TRAP)**

L'état de différenciation des cellules a été mesuré de façon qualitative avec un marquage de l'enzyme TRAP exprimé par les ostéoclastes. Un kit, (Sigma Aldrich), a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ensemencées sur les pastilles, (1 000 000 cellules/1mL/pastille/dans un puits de culture 4 cm<sup>2</sup>), ont été fixées avec le réactif fixateur à température ambiante, rincées trois fois à l'eau distillée, puis incubées avec le substrat chromogène. Les cellules ont été rincées à l'eau distillée, puis, la coloration marron reflétant l'expression de TRAP a été analysée au microscope optique, (Axiovert Zeiss).

#### **III.2.6.4.2. Activité enzymatique de TRAP 5b des cellules ostéoclastiques**

L'état de différenciation des cellules a également été mesuré de façon quantitative, en réalisant des tests de quantification de l'activité enzymatique de TRAP.

Premièrement, la quantité de protéine totale a été mesurée. Après lyse des cellules avec un tampon non dénaturant (TRITON-1X, sucrose 5 % dans une solution de PBS 1X), les protéines totales contenues dans le lysat ont été détectées et quantifiées par la méthode de Bradford \* (Sigma Aldrich). Pour réaliser le test enzymatique, 50 µL du lysat protéique ont été incubés avec le substrat spécifique de TRAP, à savoir, 2,5 mM de naphthol-ASBI-phosphate dissout dans 100 mM d'acétate de sodium et 50 mM de tartrate dissodium, (Sigma, Germany). Différents tests ont été réalisés à différents pH : 6,1 ; 4,9 et 5,5. Cependant, le mélange a été ajusté à pH 6,1 pour améliorer la spécificité de la réaction pour l'isoforme 5b de l'enzyme selon les travaux de Janckila (Janckila et al., 2001). En effet, cet isoforme réagit à un pH optimum plus élevé avoisinant les valeurs de 6 et est retrouvé dans l'os et le sérum agissant comme un marqueur de l'activité ostéoclastique et donc de la résorption osseuse, contrairement à l'isoforme TRAP5a. Après incubation du mélange réactionnel à 37°C, 12 h, à l'abri de la lumière, la réaction a été stoppée avec 0,1 mM de NaOH et l'absorbance mesurée à 405 nm dans un lecteur de plaque. Le résultat obtenu a été normalisé par la concentration totale en protéine préalablement mesurée pour chaque échantillon.

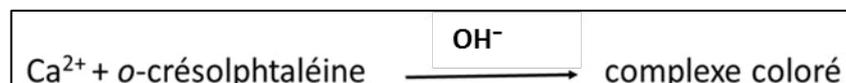
## III.2.7. Dissolution et précipitation

### III.2.7.1 Mesure de la quantité en calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoblastique

Pour évaluer l'influence de la libération en ions calcium, phosphore et silicium dans le milieu sur l'activité cellulaire, des mesures en éléments calcium, phosphore et silicium dans le milieu de culture ont été effectuées par la technique ICP/OES, (ICP/OES, Optima DV 8300). Cette opération consiste à collecter au bout d'1h, 24h ou 14 jours, le surnageant de milieu de culture dans lequel ont baigné soit des pastilles sans cellule, ou des pastilles sur lesquelles ont été cultivées des cellules (25 000 cellules/cm<sup>2</sup>). Le surnageant a été dilué au 1/10 dans de l'eau distillée et passé sous flamme, dans l'appareil ICP/OES. Les résultats obtenus sont analysés et comparés avec une courbe étalon de concentrations connues en éléments calcium, phosphore ou silicium.

### III.2.7.2 Mesure de la quantité en calcium dans le milieu de culture des pastilles cultivées avec ou sans cellule ostéoclastique et mesure du pH

La quantité de calcium présent dans le milieu de culture a été mesurée aux cinétiques de 7 et 14 jours. Un kit de quantification du calcium, fondé sur l'interaction du calcium avec la crésolphtaléine a été utilisé, (Sigma, Germany), selon les recommandations du fabricant. Le principe repose sur la formation d'un composé coloré formé en milieu alcalin, lorsque le calcium va se lier à la crésolphtaléine.



L'intensité de la couleur a été mesurée à 540 nm, dans un lecteur de plaque (platye reader Phomo, Anthos) et estimée selon une courbe étalon, réalisée avec une solution standard de concentration connue. L'intensité de la couleur formée est directement proportionnelle à la concentration de calcium présente dans l'échantillon testé.

Le pH du surnageant de culture cellulaire collecté après 7 et 14 jours à également été mesuré avec une microsonde, (Mettler Toledo apparatus), aussitôt après la collecte, pour éviter l'oxydation du milieu de culture.

### **III.2.8. Test ELISA en vue de la détection de la protéine VEGF-A sécrétée par les cellules RAW 264.7**

Les surnageants des cultures cellulaires contenant les pastilles et les cellules RAW 264.7 ont été récoltés pour réaliser un test ELISA afin de détecter la sécrétion de protéines VEGF-A par les cellules RAW 264.7. Brièvement, Les tests « ELISA » (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilisent des plaques de microtitrage à puits multiples, revêtues d'anticorps de capture, pour capturer des protéines solubles. Les protéines liées sont ensuite détectées avec un anticorps de détection subséquent, qui est typiquement marqué avec une enzyme, ou biotinylé, puis suivi d'un conjugué streptavidine-enzyme. Un substrat colorimétrique est alors ajouté, ce qui entraîne un changement de couleur basé sur la quantité d'antigène capturé. En utilisant un lecteur de plaques et en traçant les valeurs résultantes sur une courbe standard, des valeurs quantitatives précises peuvent être obtenues. Le test a été réalisé selon les recommandations du fabricant (Test ELISA VEGF-A, Biolegend, United States). La lecture de l'absorbance a été réalisée à 450 nm. La quantification a ensuite été réalisée par régression linéaire à l'aide de logiciel Origin Pro 8.

## **III.3. Analyses statistiques**

### **III.3.1. Anova**

L'ANOVA permet de comparer les paramètres biologiques entre eux selon les conditions de culture.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel origine pro 8.

Un test statistique d'analyse entre groupes a été réalisé : le test ANOVA ONE WAY suivi du test *post hoc* de Fisher.

Les différences sont estimées significatives pour  $p < 0,05$  (\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*) ; et  $p < 0,001$  (\*\*\*) .

### III.3.2. Analyses en composantes principales (ACP)

Les analyses en composantes principales ont été réalisées à partir du logiciel PAST version 2.73.

#### Design de l'analyse ACP

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des évaluations biologiques MC3T3-E1 a été réalisée avec les 12 variables suivantes :

- Apoptose 24h (n=30 minimum)
- Viabilité 1 h (n=30 minimum)
- Viabilité 24 h (n=30 minimum)
- Viabilité 48 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 1 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 24 h (n=30 minimum)
- Densité cellulaire 48 h (n=30 minimum)
- Contact focaux 24 h (n=30 minimum)
- Prolifération 24 h (n=30 minimum)
- ALP 24 h (n=6)
- Surface cellulaire 1 h (n=30 minimum)
- Concentration protéique totale 24 h (n=6)

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des évaluations biologiques RAW 264.7 a été réalisée avec les 11 variables suivantes :

- Nombre de cellules à 2 noyaux (n=30 minimum)
- Nombre de cellules à 3 noyaux (n=30 minimum)
- Nombre de cellules à 4 noyaux (n=30 minimum)
- Concentration en VEGF-A 7 jours (n=6)
- Concentration en VEGF-A 14 jours (n=6)
- Viabilité LDH (n=6)
- Viabilité WST-8 (n=6)
- Prolifération (n=6)
- Densité cellulaire (n=30 minimum)
- Différenciation TRAP 5b (n=6)
- Périmètre des rings d'actine

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des concentrations calciques du milieu de culture des MC3T3-E1 en fonction des propriétés physico-chimiques a été réalisée avec les 13 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)
- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)
- Calcium 1 h avec cellules (n=3 minimum)
- Calcium 1 h sans cellule (n=3 minimum)
- Calcium 24 h avec cellules (n=3 minimum)
- Calcium 24 h sans cellule (n=3 minimum)
- Calcium 14 jours sans cellule (n=3 minimum)

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse des concentrations calciques du milieu de culture des RAW 264.7 en fonction des propriétés physico-chimiques a été réalisée avec les 12 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)
- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)
- Calcium 7 jours avec cellules (n=6 minimum)
- Calcium 7 jours sans cellule (n=6 minimum)
- Calcium 14 jours sans cellule (n=6 minimum)
- Calcium 14 jours avec cellules (n=6 minimum)