

# L'ORTHOBIOLOGIE, UNE VALEUR AJOUTÉE À LA NACRE

S. BERLAND, C. MILET, E. LOPEZ

L'orthobiologie rapproche les progrès en bio-ingénierie, biotechnologie, science des matériaux et biologie tissulaire, dans l'objectif de substituer à la capacité de régénération et de réparation des tissus musculosquelettiques.

Il s'avère que, dans le domaine biotechnologique également, la nacre a des reflets attractifs.

Les activités de recherche développées sous la responsabilité d'Evelyne Lopez et de Christian Milet au Muséum National d'Histoire Naturelle visent à appréhender les mécanismes régissant la morphogenèse et la plasticité des composants des squelettes calcifiés.

Un volet des recherches aborde les mécanismes d'origine biogène du contrôle de la biominéralisation en comparant le modèle mollusque qu'est la biominéralisation de la nacre et un modèle vertébré à travers ses avatars, os et cartilage.

Par cet axe de recherche, un postulat se confirme : les matrices calcifiantes hébergent des signaux qui exercent des activités morphogènes sur les cellules responsables de la mise en place des structures biominéralisées. Ces propriétés morphogènes expliquent notamment le processus biologique d'auto-régénération des structures squelettiques. Corollaire important, il apparaît que la signalisation du contrôle de la biominéralisation utilise un langage partagé par des modèles aussi éloignés phylogénétiquement que le sont mollusques et vertébrés, reste à savoir dans quelle mesure ce langage est universel...

## LA NACRE, STRUCTURE SQUELETTIQUE ET SQUELETTE DE LA STRUCTURE

La nacre (figure 1) est une des composantes de la coquille de certains mollusques. Cette formation

squelettique est minéralisée, certes, mais comme nombre de minéralisation d'origine biogène, c'est une structure hybride, organique et minérale, chacun des composants apportant sa pierre à l'édifice : le minéral, la résistance, l'organique, la résilience.

Trois caractéristiques permettent de définir la nacre. En premier lieu son réseau cristallin : le carbonate de calcium qui la constitue, cristallise dans le système orthorhombique de l'aragonite.

En second lieu, la nacre a une structure tridimensionnelle hautement hiérarchisée. Les cristaux s'assemblent en tablettes, lesquelles se superposent en une structure architecturale feuilletée.

L'organisation de la nacre pavimentaire analysée jusqu'à l'échelle élémentaire, nanométrique en microscopie à force atomique révèle la structure du biocristal et montre qu'un réseau organique continu relie les cristallites d'aragonite d'une taille unitaire de 45 nm environ, pour former les tablettes.

Tant l'organisation de la structure cristalline que l'architecture tridimensionnelle sont orchestrées par un contrôle d'origine biologique. En effet la nacre se développe au sein d'un réseau de molécules organiques formant un treillis matriciel. Cette trame a pour origine certaines cellules sécrétrices spécialisées, localisées dans le tissu enveloppant les organes du mollusque, le manteau.

Une troisième caractéristique de la nacre est que les cellules responsables de sa formation demeurent hors de la structure minéralisée. La nacre est donc une structure organo-minérale, acellulaire dont la composante organique est essentielle à ses propriétés : non seulement la trame matricielle cimentant le réseau cristallin minéral forme un coussinage qui donne à la nacre sa compliance et participe à sa résistance mécanique, mais encore la composante organique renferme des molécules exerçant une activité biologique et impliquées dans le contrôle de la biominéralisation.

Un des rôles de la composante organique dans l'édification de la nacre est le contrôle exercé sur la

cristallisation du minéral. Cet effet a été reproduit expérimentalement : du carbonate de calcium mis en conditions de sursaturation en présence de protéines extraites de la matrice de la nacre, cristallise spécifiquement sous la forme aragonitique, alors que le principe d'économie thermodynamique conduirait à la cristallisation sous forme de calcite. Les molécules organiques biologiquement actives ciblent également les cellules effectrices responsables de la minéralisation.

## L'OS, TISSU MODELABLE ET AUTORÉPARABLE, LES LIMITES D'UN SYSTÈME HAUTEMENT CONTRÔLÉ

Le squelette des vertébrés est lui aussi mis en place par une batterie de cellules spécialisées : chondroblastes, ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse et ostéoclastes, ayant comme précurseur (en commun avec les macrophages) des cellules de la moelle hématopoïétique. Respectivement ces types cellulaires sont responsables de la formation du cartilage, de l'os et du remodelage des tissus squelettiques.

Dans son ensemble, le squelette est un assemblage ordonné et adapté d'os articulés entre eux. Il en résulte la fonction mécanique de soutien et de protection à laquelle s'ajoute une fonction métabolique essentielle de stockage et de mise à disponibilité du calcium, élément nécessaire à bien des mécanismes biologiques depuis la conduction nerveuse, la contraction musculaire à la transduction.

Le remodelage osseux est le mécanisme par lequel l'os assure l'ensemble de ses fonctions, mécaniques et métaboliques. Le remodelage permet la trilogie : développement, croissance et réparation qui régit l'histoire de l'os corrélativement à celle de l'organisme. Mais le remodelage osseux relaie également la régulation des taux de calcium circulant, rendant disponible cet élément crucial pour le métabolisme.

Les phases de formation et de résorption se déroulent au sein des unités de remodelage, les BMU pour Basic Multicellular Units. Ainsi que leur nom l'indique, au sein de ces unités coexistent les familles de cellules osseuses : ostéoclastes et ostéoblastes déclinés en cellules bordantes quiescentes et ostéoblastes actifs, sécrétisseurs de la matrice ostéoïde apte à la minéralisation. Chaque BMU est le théâtre où se joue, en une unité de lieu et de temps, la séquence couplée d'une phase de résorption suivie d'une étape de formation osseuse. Le nombre de ces unités de remodelage diffère selon le type d'os. Elles sont plus nombreuses au sein de l'os trabéculaire que dans l'os cortical, en moyenne 4/mm<sup>3</sup> dans l'os trabéculaire contre 0,2/mm<sup>3</sup> dans l'os cortical. Ainsi 25% de l'os trabéculaire environ sera renouvelé annuellement pour seulement 3 à 4% de l'os cortical.

Les deux modalités architecturales du tissu osseux, os compact et os spongieux, sont donc inégales quant à leur potentiel intrinsèque de remodelage qui néanmoins assure le nécessaire réajustement de la forme de la pièce osseuse à la fonction au cours de la croissance ou du vieillissement de l'individu. L'ajustement se fait par le biais des contraintes mécaniques qui s'appliquent sur la pièce osseuse. Ces forces induisent, en réponse, un remodelage qui peut engendrer la modification du galbe osseux. Les ostéocytes développent, à mesure qu'ils sont enchâssés dans la matrice minéralisée, un réseau de prolongements cytoplasmiques qui relaie la communication cellulaire entre les cellules intra-osseuses et avec les cellules bordantes, à la périphérie des travées ou à la limite endoste/périoste. Les ostéocytes sont des mécanorécepteurs sensibles aux variations de pression transmises par les déplace-

ments liquidiens autour des prolongements cytoplasmiques des cellules osseuses. Les vibrations transmises provoquent la rétraction des cellules bordantes quiescentes et l'activation des ostéoclastes ainsi que, par voie de conséquence, l'initiation d'un site de remodelage.

Lorsqu'il subit une contrainte mécanique qui dépasse son seuil de résistance, l'os se fracture. Le tissu osseux est en mesure de réparer lui-même les dommages causés par traumatisme. Il met en place un processus de consolidation qui se déroule en trois étapes. La première est une phase inflammatoire qui provoque un afflux de précurseurs ostéoclastiques et macrophagiques. La seconde correspond à une condensation cellulaire en un foyer ostéoprogéniteur et à la formation d'un cal : une ébauche cartilagineuse transitoire puis un tissu osseux primaire, dont on dit qu'il est "fibreux". Cet os est riche en moelle hématopoïétique donc à fort potentiel de remodelage.

Le traumatisme augmente le potentiel naturel de l'os à se reformer à la suite d'une destruction. L'ébauche cartilagineuse dont la cinétique de mise en place est rapide, amorce une large réparation tissulaire. Cependant, aux cellules mésenchymateuses recrutées pour la réparation s'offrent deux choix de différenciation cellulaire : chondrocyte ou fibroblaste. La voie de cicatrisation par un tissu conjonctif banal constitue une alternative qui stérilise le processus de régénération osseuse. La taille critique d'un défaut osseux entraînant la fibrose, le remplissage par un conjonctif lâche inapte à la minéralisation et inaccessible au remodelage, dépend du type d'os et de l'état général de l'organisme notamment. Il est donc du plus grand intérêt thérapeutique de développer des outils orthobiologiques visant la caractérisation de biomatériaux de substitution et la potentialisation de la capacité naturelle du tissu osseux à se régénérer (figure 2), en ciblant les acteurs directement impliqués dans le processus de remodelage osseux, ostéoclastes, ostéoblastes et chondroblastes.

Les travaux engagés depuis une décennie par le professeur E. Lopez et son équipe établissent le

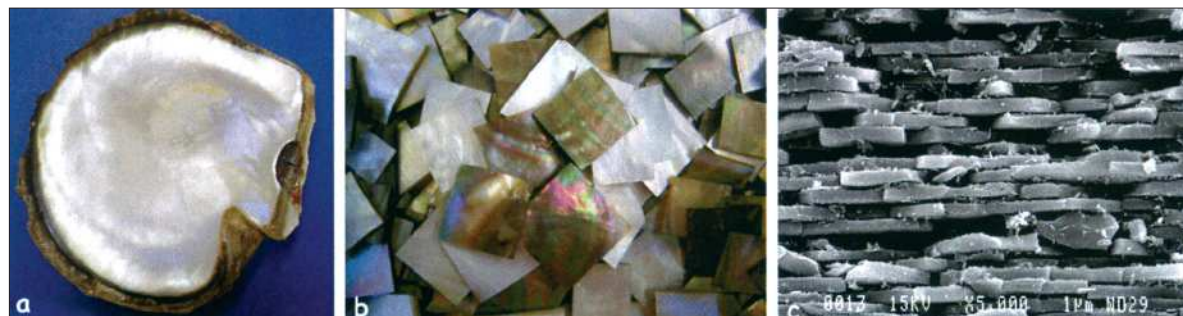
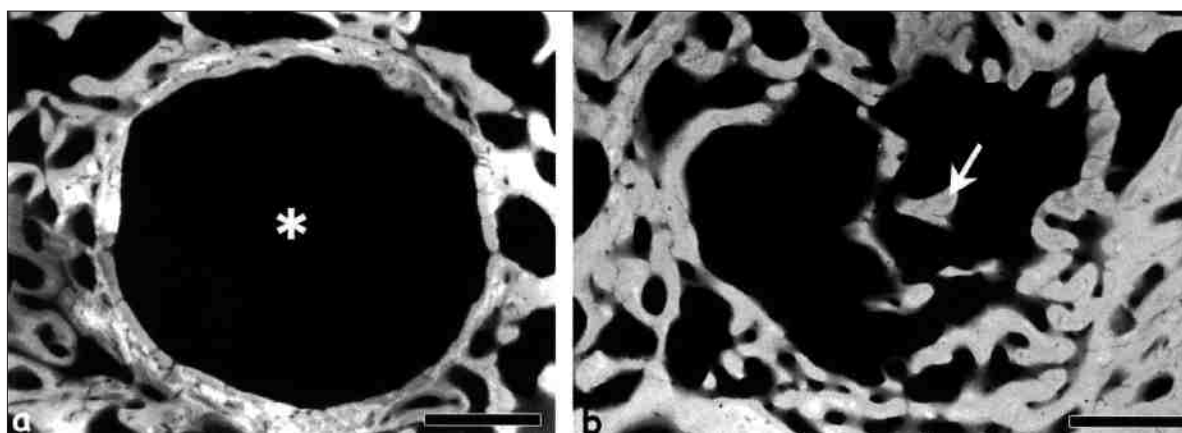
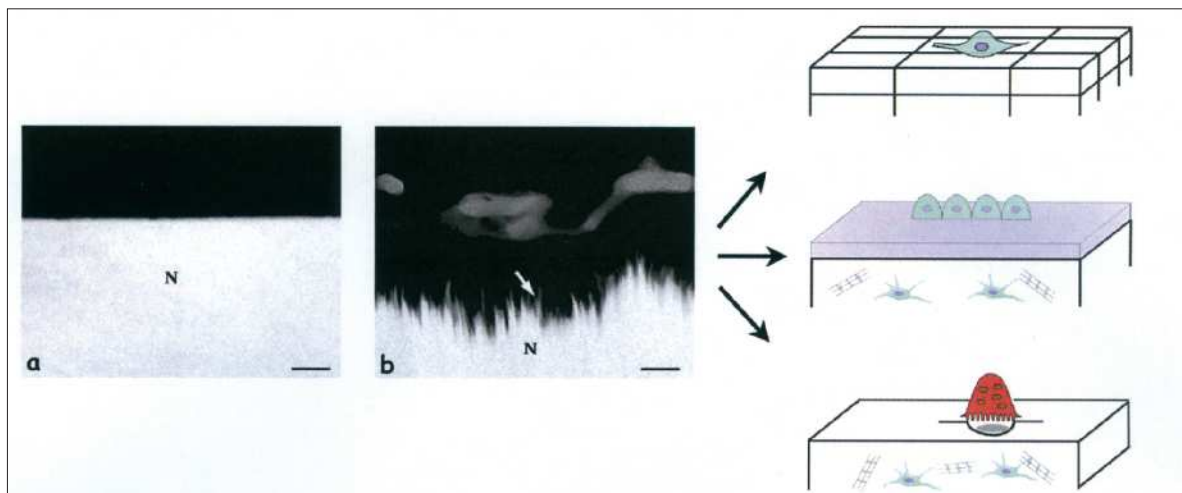


Figure 1 : La nacre est une des composantes du squelette externe de certains mollusques. Chez l'huître *Pinctada*, la face interne de la coquille calcifiée est tapissée d'une couche composée exclusivement de nacre (a). Sa structure est hybride : le minéral cristallise sur une trame organique. Cette dualité de composition, associée à une architecture hautement organisée, confère à la nacre sa résistance mécanique et ses propriétés physiques dont ses reflets (b). La microscopie électronique à balayage (c) révèle l'architecture stratifiée des tablettes unitaires d'aragonite dans l'épaisseur de la nacre (barre d'échelle = 1 μm).

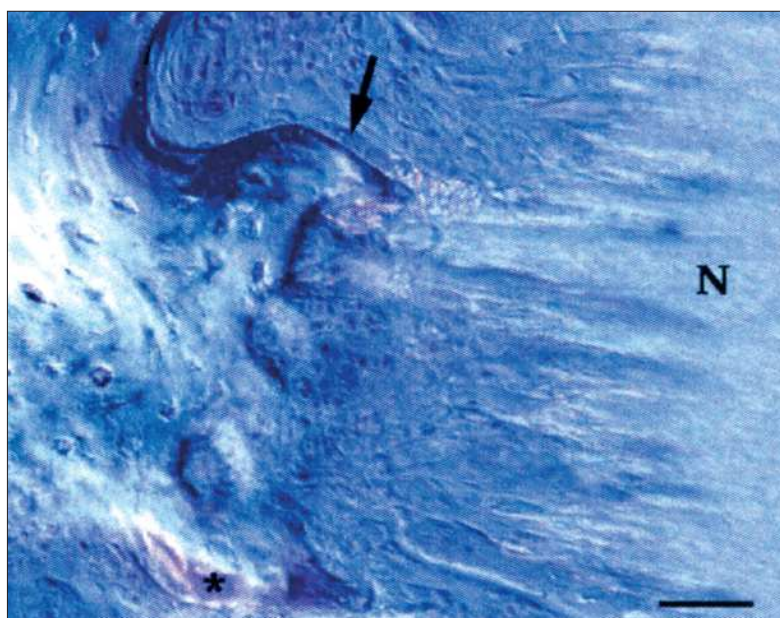




**Figure 2 :** L'aptitude d'auto-réparation de l'os a ses limites. Lorsque la surface osseuse détruite dépasse le seuil de taille critique (a), la régénération est incomplète et un tissu cicatriciel inapte à la minéralisation (apparaissant comme une cavité vide (\*) sur cette microradiographie), comble le tissu osseux. L'implantation de nacre a conduit à potentialiser la capacité naturelle de l'os à se régénérer : des travées d'os néoformé minéralisé (→) se sont développées au sein de la cavité osseuse. (barre d'échelle = 1 mm).



**Figure 3 :** L'implant de nacre dont la microradiographie montre la surface initialement lisse (a), subit, in site osseux, un processus de biodissolution partielle qui lui confère une rugosité (→), état de surface favorable pour l'ancrage de l'os sur l'implant (b). (barre d'échelle = 50µm). Les expérimentations *in vivo* et *in vitro* montrent que la nacre constitue un système naturel de relargage de molécules biologiquement actives sur les intervenants de la formation et du remodelage osseux : chondroblastes, ostéoblastes et ostéoclastes. La nacre cumule ainsi les atouts d'un biomatériau à visée orthobiologique.



**Figure 4 :** Détail en microscopie optique de l'interface entre un implant endo-osseux en nacre (N) et le tissu osseux, dans le fémur chez le mouton. La surface de la nacre montre un aspect en dents de scie. L'ancrage de l'os sur celle-ci est un processus dynamique qui résulte du remodelage du tissu osseux interfacial. La présence d'un liseré bordant l'os minéralisé, d'ostéoblastes activés (→) qui mettent en place une matrice ostéoïde apte à la minéralisation, en rose sur cette préparation (\*), témoigne de l'activité physiologique de néoformation osseuse sur le site receveur de l'implant de nacre. (barre d'échelle = 50µm).

potentiel de la nacre à constituer un biomatériau à visée orthobiologique.

Les travaux pionniers ont montré la biocompatibilité *in vivo* de l'os et de la nacre. Utilisée en implant endo-osseux, la nacre est acceptée par le tissu osseux, os spongieux ou cortical, et induit le recrutement des intervenants de la réparation osseuse (figure 3). Un processus de régénération osseuse, passant par la voie endochondrale, aboutit à la mise en place d'un os physiologiquement actif et remodelé qui montre un ancrage sur le biomatériau nacre (figure 4).

L'activité biologique ostéopromotrice est portée par des molécules

de la matrice organique de la nacre, molécules diffusibles et solubles dans le milieu interstitiel, agissant comme des facteurs locaux et reconnues par les cellules osseuses.

Aujourd'hui, les recherches portent sur la caractérisation de ces molécules actives et de leurs cibles cellulaires.

Les enjeux de ces travaux sont à fort potentiel de valorisation dans le domaine des biotechnologies. Aussi un plateau de recherche a été mis en place avec l'aide d'un partenaire industriel et bénéficie du soutien du Ministère de la Recherche depuis 2003 sous la forme d'un label reconnu Equipe

de Recherche Technologique pour la "Valorisation des molécules bioactives d'origine marine".

### L'ENTENTE CORDIALE

L'activité biologique des molécules extraites de la nacre est établie à l'aide de tests biologiques sur des lignées cellulaires mammariennes représentant des modèles de cellules cartilagineuses et de précurseurs des cellules osseuses ostéoblastiques. L'étude de l'interaction de la nacre avec la population de cellules ostéoclastiques est également appréhendée dans le cadre d'une modélisation *in vitro* de l'effet biologique des molécules de la matrice organique de la nacre sur les ostéoclastes ainsi que l'activité des cellules résorbantes de l'os sur le biomatériau nacre lui-même.

La matrice organique de la nacre contient des signaux moléculaires morphogènes reconnus par les cellules des lignées osseuses et cartilagineuses. Des molécules organiques de la nacre de *Pinctada* agissent sur le recrutement des cellules souches et l'activation cellulaire. Les cellules cartilagineuses (lignée ATDC5) et les précurseurs ostéoblastiques (lignée MC3T3) constituent des cellules cibles pour les signaux moléculaires contenus dans la matrice organique de la nacre qui déclenchent la capacité de la matrice extracellulaire à minéraliser. Cet effet est mis en évidence en analyse protéomique par la synthèse et le dépôt des collagènes spécifiques de chacun des tissus de soutien : collagène de type II spécifique du tissu cartilagineux, collagène de type I et protéines non collagéniques associées pour la matrice de l'os, compétente pour la minéralisation.

L'effet biologique d'un biomatériau sur la stimulation osseuse ne peut faire l'impasse de l'analyse de son interactivité avec la population cellulaire ostéoclastique. Ainsi, une activité de résorption ostéoclastique de la nacre a-t-elle été mise en évidence *in vitro*. Des ostéoclastes obtenus à partir de la moelle osseuse hématopoïétique de lapin sont déposés à la surface d'une lamelle de nacre. Après 48 heures, des lacunes de résorption sont observées en microscopie électronique à balayage (figure 5). Cependant, *in vitro*, les cellules responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes, sont rapidement inhibées dans leur activité de dégradation de la nacre. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus *in vivo* lors des études d'implants chez le mouton. En effet, la structure observée de l'interface os/nacre s'explique par un mécanisme de résorption modifiant l'état de surface de l'implant de nacre. L'étude cinétique des variations de l'état de surface d'implants endo-osseux durables en nacre montre également que le processus de résorption de la nacre *in vivo* n'est pas constant dans le temps.

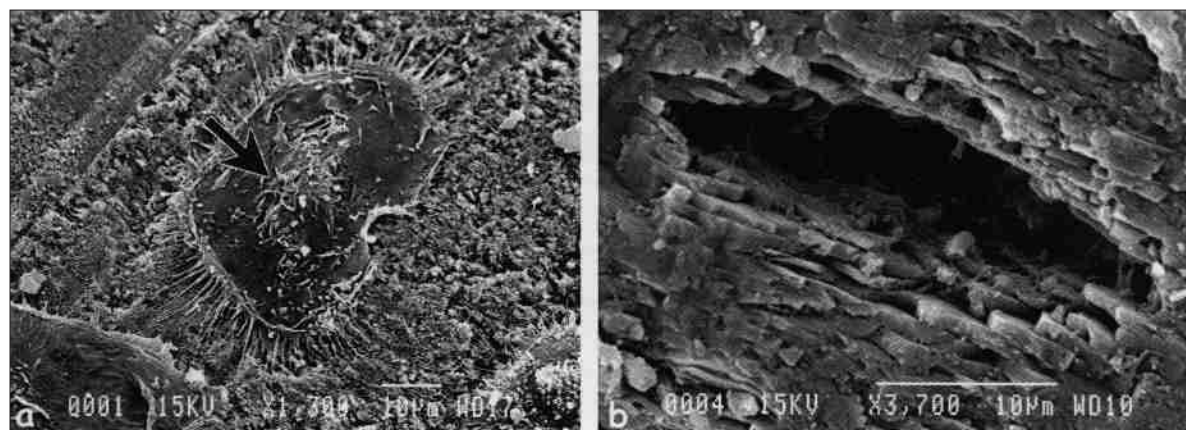
La composante organique de la nacre est extraite en conditions non dénaturantes, afin de conser-

ver la structure moléculaire et l'analyse, par spectrométrie de masse après fractionnement et extraction des composants organiques, établit la diversité des molécules hydrosolubles, diffusibles, de la matrice de la nacre. Celle-ci est majoritairement composée (plus de 60%) de molécules organiques de faible poids moléculaire. L'agencement des molécules constitutives de la matrice semble hautement structuré et forme un réseau par association supramoléculaire, conférant un comportement chimique paradoxal et rendant complexe la purification en composants unitaires.

L'identification des protéines matricielles est actuellement abordée à l'aide des outils de la biologie moléculaire et de la bio-informatique. Des banques de gènes spécifiques, exprimés par les cellules du manteau responsables de la synthèse des composants protéiques de la matrice organique de la nacre, ont été constituées et sont en cours d'analyse. Ainsi une quinzaine de protéines, présentant des motifs moléculaires, signature de domaines connus liés au contrôle de la minéralisation ou à des facteurs de croissance ou des cytokines, sont aujourd'hui en phase de caractérisation.

Les résultats obtenus *in vitro* démontrent que l'os et le cartilage constituent des tissus cibles pour les molécules de la matrice organique de la nacre, actives sur le contrôle de la biominéralisation. Or, le remodelage osseux est la résultante d'un équilibre dynamique entre formation osseuse, avec potentiellement la mise en place d'un modèle transitoire de cartilage dans la voie endochondrale, et résorption de l'os.

La nacre démontre par conséquent un fort potentiel d'application et de valorisation en orthobiologie. Des études *in vivo* d'implantation de nacre en site osseux et cartilagineux, entreprises chez le mouton, replacent les résultats obtenus *in vitro* dans un contexte physiologique. Une analyse histologique et morphométrique caractérise les interactions dynamiques à l'interface os/nacre. Celles-ci sont initiées par un processus de biodégradation limitée des implants de



**Figure 5 :** La modélisation *in vitro* met en évidence une activité de résorption de la nacre par les ostéoclastes. (a) Au contact de la nacre, l'ostéoclaste se polarise (→), ce qui témoigne de son activation biologique. (b) Après 48 h, des lacunes de résorption sont observées à la surface de la nacre, comme le montre cette image en microscopie électronique à balayage. (barre d'échelle = 10µm).



nacre par des cellules de la lignée ostéoclastique. L'analyse de la mise en place de l'interface os/nacre établit la cinétique de la séquence des phases de résorption et d'apposition osseuse, compatibles avec un processus physiologique de réparation osseuse et de remodelage. De plus, la nacre est la cible de l'activité de résorption ostéoclastique, ce qui confère un état de surface microporeux, favorisant l'ancrage de l'os néoformé à l'interface de la nacre. L'érosion de surface provoque la dissociation de l'assemblage cristal-matrice et permet la diffusion des facteurs biologiques. La structure macroscopique de la nacre lui confère une résistance à l'érosion et limite son degré de biodégradabilité. Le résultat s'apparente à un "surfaçage" biologique.

Le paramétrage de la corrélation entre la biodégradabilité in situ de la nacre et de son réseau tridimensionnel peut conduire au développement biomédical d'empreinte transitoire et active sur le processus de régénération osseuse.

La caractérisation des principes actifs et des mécanismes responsables de la bioactivité de la nacre est l'objectif qui dynamise les recherches pour les développements du biomatériau nacre en orthobiologie. L'enjeu est un bénéfice humain durable. ■

#### ONT CONTRIBUÉ À CES ÉTUDES

**P. Antonietti**, MD (Clinique Jouvenet), **O. Delattre**, MD, (CHRU de Fort de France) - Chirurgie orthopédique interventionnelle en modèle animal, mouton et lapin.

**X. Bourrat**, PhD (Institut des Sciences de la Terre. Université d'Orléans), **M. Rousseau**, PhD (Muséum National d'Histoire Naturelle. ERT "Valorisation des molécules bioactives d'origine marine") - Analyse nanostructurale de la nacre.

**D. Duplat**, Doctorant, **M. Lamghari**, PhD, **L. Pereira-Mouriès**, PhD (Muséum National d'Histoire Naturelle. DMPA UMR CNRS 5178) - Analyse des effets biologiques de la nacre et de ses constituants organiques en biologie moléculaire, cellulaire et intégrative.

**L. Bédouet**, PhD (Muséum National d'Histoire Naturelle. ERT "Valorisation des molécules bioactives d'origine marine") - Physico-chimie des matrices dédiées aux biominéralisations.

**F. Lallier** (Muséum National d'Histoire Naturelle. DMPA UMR CNRS 5178) - Gestion et traitement des données et des échantillons.

#### RÉFÉRENCES

**Berland S., O. Delattre, S. Borzeix, Y. Catonné, E. Lopez.** Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. *Biomaterials*, 2005, 26 (15) : 2767-2773.

**Rousseau M., E. Lopez, A. Couté, G. Mascarel, D. C. Smith, R. Naslain, X. Bourrat.** Sheet nacre growth mechanism: a Voronoi model. *Journal of Structural Biology*, 2005, 149 : 149-157.

**Milet C., S. Berland, M. Lamghari, L. Mouriès, C. Jolly, S. Borzeix, D. Doumenc, E. Lopez.** Conservation of signal molecules involved in biomineralization control in calcifying matrices of bone and shell. *Comptes-rendus PALEVOL*, 2004, 3 : 493-501.

**Pereira-Mouriès L., M. J. Almeida, C. Milet, S. Berland, E. Lopez.** Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types : fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 132 ; 217-229.

**Bédouet L., M. J. Schuller, F. Marin, C. Milet, E. Lopez, M. Giraud.** Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata* : extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2001, 28 (3) : 389-400.

**Lamghari M., P. Antonietti, S. Berland, A. Laurent, E. Lopez.** Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, 16 (12) : 2232-2237.

# LIBÉRER LE MOUVEMENT

## Restaurer le contrôle

### Système d'infusion intrathécale

#### SYNCHROMED® EL



Amélioration de la qualité de vie

Thérapie efficace et réversible



**Medtronic**  
Quand la vie dépend de la technologie médicale

**MEDTRONIC FRANCE S.A.S**  
122, avenue du Général Leclerc  
92514 BOULOGNE-BILLANCOURT Cedex  
Internet : [www.medtronic.com](http://www.medtronic.com)  
Téléphone : (33) 1 55 38 18 55  
Télécopie : (33) 1 55 38 18 85

## LE RACHIS

Si vous souhaitez connaître nos prochains sommaires, consultez notre blog :

[www.blog.ca/main/index.php/lerachis](http://www.blog.ca/main/index.php/lerachis)