HAL
open science

Influence des propriétés physicochimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire. Effect of the physicochemical characteristics of hydroxyapatite on the cell behaviour.

Patrice Laquerriere, Alexia Grandjean-Laquerriere, Edouard Jallot, Michel Nardin, Patrick Frayssinet, Jean-Marie Nedelec, Dominique Laurent-Maquin

To cite this version:

Patrice Laquerriere, Alexia Grandjean-Laquerriere, Edouard Jallot, Michel Nardin, Patrick Frayssinet, et al.. Influence des propriétés physicochimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire. Effect of the physicochemical characteristics of hydroxyapatite on the cell behaviour.. ITBM RBM, 2005, 1, pp.200-205. 10.1016/j.rbmret.2005.04.007 . inserm-00069792

HAL Id: inserm-00069792

https://inserm.hal.science/inserm-00069792

Submitted on 6 Jun 2006

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.

Author Manuscript Inserm

Hal-Inserm Author manuscript

Influence des propriétés physico-chimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire.

LAQUERRIERE Patrice[1#], GRANDJEAN-LAQUERRIERE Alexia[1], JALLOT Edouard[2], NARDIN Michel[3], FRAYSSINET Patrick[4], NEDELEC Jean-Marie[5], LAURENT-MAQUIN Dominique[1]

[1] INSERM – ERM 0203, Laboratoire de Microscopie Electronique, 21, rue Clément Ader, BP 138, 51685 Reims, Cedex 2, France.

[2] Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand CNRS/IN2P3 UMR 6533 Université Blaise Pascal - 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France

[3] Institut de Chimie des Surfaces et Interfaces, CNRS UPR 9069, 15, rue Jean Starcky, BP 2488, 68057 MULHOUSE Cedex - France

[4] Le Gaillard, Rte de St Thomas, 31470 St Lys.

[5]Laboratoire des Matériaux Inorganiques CNRS UMR 6002, Université Blaise Pascal - 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France

corresponding author : Patrice LAQUERRIERE, 21, rue Clément Ader, BP 138, 51685 REIMS cedex, France

Tel : (33) 3.26.05.07.50 Fax : (33) 3.26.05.19.00

e-mail : patrice.laquerriere@univ-reims.fr

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

ABSTRACT

Calcium phosphate bioceramics have been applied as bone substitutes for several decades. Aseptic loosening after total joint arthroplasty is a major problem in orthopaedic surgery. Hydroxyapatite particles from materials wear have been reported as the main cause of implant failure. For this reason, an investigation into possible wear particles from materials used in the implant may lead to longevity after arthroplasty. In the present paper, we discussed the cellular response (mainly monocytes/macrophages which are among the first cells to colonize the inflammatory site in addition to osteoblats and fibroblasts) after exposition to particles with different characteristics (size, sintering temperature, shape, and chemical composition). The most important characteristics are the shape and the size of the particles. The needle shaped particles induced the larger production of inflammatory mediators by cells and was more toxic. The sintering temperature appeared to be a less important characteristic even though it was involved in the dissolution/precipitation process. Little is known about the effect of ion containing hydroxyapatite (like zinc, strontium, …) on cellular response but this modification of the biomaterial seems benefic.

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

RESUME

Les biocéramiques phosphocalciques sont utilisées comme substitut osseux depuis de nombreuses décennies. Le descellement aseptique après une arthroplastie totale est un problème majeur en chirurgie orthopédique. Les particules d'hydroxyapatite issues du biomatériau ont été identifiées comme cause majeure de l'échec de l'implantation. Pour cette raison, des recherches dans le domaine de ces particules relarguées peut conduire à une augmentation de la longévité après une arthroplastie. Dans cet article, nous discutons de la réponse cellulaire (principalement des monocytes/macrophages qui sont parmi les premières cellules à coloniser le site inflammatoire) après exposition à des particules ayant des caractéristiques différentes (taille, forme, température de traitement et composition chimique). Les caractéristiques les plus importantes sont la forme des particules suivie par la taille. En effet, les particules sous forme d'aiguille induisent une plus grande production de médiateurs de l'inflammation et elles sont plus toxiques pour les cellules. La température de traitement semble être moins importante même si elle joue un rôle important dans les processus de dissolution/précipitation. Peu de choses sont connues sur l'effet d'ions dopant l'hydroxyapatite (comme le zinc, le strontium, …) sur la réponse cellulaire. Les premières données montre que le dopage semble bénéfique pour les cellules.

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Introduction

L'hydroxyapatite (HA) est très utilisée pour recouvrir le métal des prothèses afin d'améliorer leur biocompatibilité. Les revêtements d'HA sont fabriqués à partir de particules cristallisées d'HA dispersées dans une matrice amorphe de phosphate de calcium. La dissolution rapide de la phase amorphe du revêtement pendant le remodelage osseux conduit au relargage de particules d'hydroxyapatite ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes [1-3], même en utilisant de l'hydroxyapatite dense [4].

L'analyse de tissus issus d'échec de prothèse suggère que la phagocytose des débris d'hydroxyapatite donne naissance à un important stimulus pour la production de divers médiateurs de l'inflammation [2]. Ces protéines sont en partie responsables de l'inflammation et de l'altération du remodelage osseux qui conduit localement au processus d'ostéolyse. Ceci peut potentiellement mener à une réaction inflammatoire locale liée aux particules qui modifierai l'intégrité de l'interface os-implant [5].

La phagocytose de ces particules de phosphate de calcium a attiré l'attention sur leur capacité à activer les monocytes/macrophages et ainsi provoquer la production de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines et les métaloprotéinases qui peuvent ensuite interagir avec d'autres types cellulaires tel que les ostéoclastes [6]. Les monocytes/macrophages sont parmi les premières cellules à coloniser un site inflammatoire [6-8]. L'interleukine–6 (IL-6), et du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF–α) produits par les monocytes/macrophages stimulés par des particules relarguées sont impliqués dans l'activation des ostéoclastes [10-12].

Dans cet article nous nous proposons de discuter les effets des caractéristiques physico-chimiques de particules d'hydroxyapatite (taille, forme, température de traitement et composition chimique) sur e comportement de cellule en culture.

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Discussion

Rapport de surface :

L'étude de l'interaction cellules-particules en fonction des propriétés des particules nécessite l'utilisation d'une méthode qui permet à la fois de comparer les résultats obtenus par différents auteurs et aussi de comparer les résultats obtenus à partir de différentes poudres. En effet, des cellules au contact de particules ayant des surfaces spécifiques différentes ne réagiront pas de la même manière suivant que l'on utilise une masse constante, un volume constant ou une surface de poudre constante.

Pour s'affranchir de ces problèmes, l'utilisation d'un rapport de surface constant entre les poudres et les cellules est privilégiée. Cette méthode a en plus l'avantage de pouvoir comparer différents résultats obtenus par différents auteurs. Pratiquement, il suffit de calculer quelle est la surface spécifique des matériaux à étudier et de calculer la surface d'une cellule [13]. Ensuite on choisit un rapport de surface (par exemple 1 pour 1) et on met en culture la quantité de poudre correspondante à la surface totale cellulaire.

Influence de la taille des particules d'hydroxyapatite

La taille des particules d'hydroxyapatite joue un rôle lors de l'interaction avec les cellules de type monocytes/macrophages. En effet ces cellules qui sont responsables, entre autre de l'élimination des corps étrangers, ont une capacité de phagocytose qui n'excède pas des particules dont la taille est de l'ordre du micromètre. La réaction des monocytes/macrophages (M/M) va donc être différente suivant que les particules seront ou non phagocytables. La

Hal-Inserm Author manuscript

production de cytokines est d'ailleurs différente en fonction de la taille des particules d'hydroxyapatite. Les particules sphériques phagocytables induisent une production de cytokines inflammatoires (Interleukine-6, Tumor Necrosis Factor-alpha) et anti-inflammatoires (Interleukine-10) environ trois fois plus importante que les particules sphériques non-phagocytables (figure 1) [14]. Ces mêmes particules phagocytables induisent également plus d'altérations cellulaires que les non-phagocytables [15]. L'étude de la production de métalloprotéinases (médiateurs de l'inflammation responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire) montre que les particules sphériques non-phagocytables génèrent une production de gélatinase B (MMP-9) plus importante [16]. Il est surprenant de noter que les résultats sont différents en utilisant des particules irrégulières phagocytables ou non. En effet, peu de différences dans la réponse cellulaire sont observées dans ce cas.

Dans la littérature, il y existe des résultats conflictuels sur l'effet de la taille des particules qui peuvent être expliqués par le fait d'une part que les auteurs ne se sont pas souciés de la forme des particules qu'ils ont utilisées et d'autre part que les auteurs n'ont pas utilisé une méthode de rapport de surface pour leurs expériences. Harada et al.[17] obtiennent des résultats comparables aux notres en exposant des monocytes/macrophages à des particules d'HA broyées ou non. *In-vivo*, Malard et al.[18] observent une diminution de la réponse inflammatoire en diminuant la taille des particules (qui semble irrégulière sur leurs images de microscopie électronique à balayage). D'autre part, sans préciser la nature des particules d'HA utilisées, Sun et al.[19] n'observent pas de différence de production de TNF-α par des ostéoblates au contact de particules d'hydroxyapatite de taille différente. Il a aussi été montré que la présence de grosses particules d'HA modifiait la prolifération de fibroblastes comparé à des particules plus fines [20].

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Tableau 1
caractéristiques des poudres étudiées par notre équipe

Forme des particules	Taille (µm)	Taille moyenne (µm)	Température de frittage (°C)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	Taille des cristaux (nm)	Facteur de forme
	1–30	3 ± 2	600	23,95	190	1,20 ± 0,29
	1–30	3 ± 2	1180	5,38	350	1,20 ± 0,26
sphérique	10–70	44 ± 15	1180	1,56	350	1,16 ± 0,30
	110–190	140 ± 49	1180	0,63	350	1,22 ± 0,17
	170–300	217 ± 65	1180	0,50	350	1,27 ± 0,20
	1–30	3 ± 2	20	38,06	80	1,30 ± 0,35
	1–30	3 ± 2	600	26,72	180	1,24 ± 0,26
irrégulière	1–30	3 ± 2	1180	6,08	350	1,30 ± 0,36
	100–250	166 ± 39	1180	0,70	420	1,30 ± 0,36
	150–300	196 ± 61	1180	0,70	350	1,27 ± 0,18

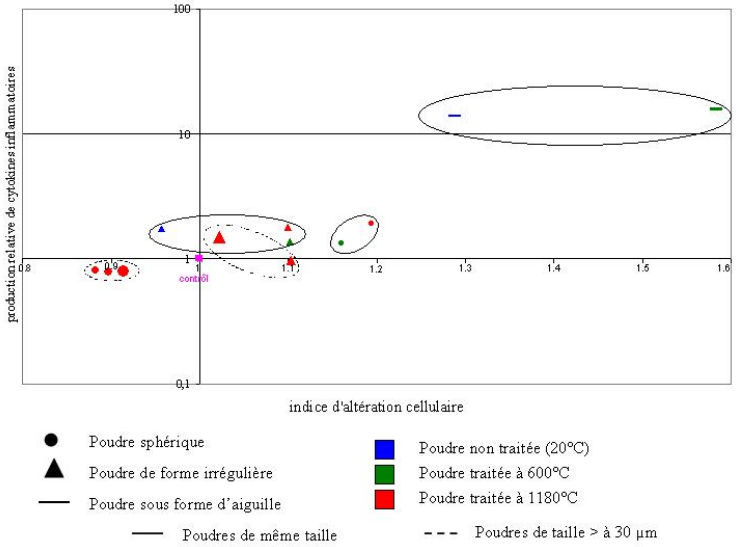

Fig. 1

Les particules phagocytables semblent donc néfastes pour les cellules. Il semble aussi que la seule taille des particules n'explique pas le comportement cellulaire puisque des particules phagocytables ou non, de forme sphérique ou irrégulière induisaient des réactions différentes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence de la forme des particules sur les cellules.

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Influence de la forme des particules d'hydroxyapatite

Les particules d'hydroxyapatite peuvent prendre différentes formes lors de leur production pendant les processus de dissolution et/ou de précipitation. L'influence de ce facteur sur les interactions cellulaires nous donne des informations sur le devenir des implants. L'utilisation de particules sphériques, irrégulières et sous forme d'aiguille, toutes phagocytables nous permet de mieux comprendre certains phénomènes de rejet prothétique.

En effet, en exposant des monocytes/macrophages à ces particules de formes différentes, celles sous forme d'aiguille sont de loin celles qui induisent la plus forte production de cytokines inflammatoires (environ trente fois plus) (figure 1) [X]. Elles induisent aussi le plus d'altérations cellulaires [X] et elles provoquent la plus forte production de MMPs, toujours par les M/M.

Il existe peu d'autres études qui se soient intéressées à ce paramètre dans le domaine des biomatériaux. Seuls des travaux sur l'inhalation de particules de verres ou de minéral ont montré la toxicité de ces particules sous forme d'aiguille [32-33]. Dans ce cas, Guthrie a supposé que les fibres pouvaient modifier l'interaction cellules/particules en causant des dommages mécaniques à la surface de la cellule.

La forme des particules joue un rôle prépondérant dans la réponse inflammatoire ainsi que dans la toxicité. Parmi les particules étudiées, celles sous forme d'aiguille sont les plus nocives pour les cellules.

Influence de la température de traitement

Grâce au traitement thermique des particules, il est possible de modifier la taille des cristaux et donc leur surface spécifique ce qui rend tout particulièrement important l'utilisation du

Hal-Inserm Author manuscript

rapport de surface pour les expériences. En effet la surface accessible aux cellules peut varier d'un facteur 30 en fonction de la température de traitement. Il a aussi été montré que le traitement thermique modifie le potentiel de charge nulle des particules d'hydroxyapatite [X]. Toutes ces modifications peuvent donc changer l'interaction entre les cellules et les particules. En utilisant des particules d'hydroxyapatite non traitées, traitées à 600 °C et 1180 °C, on montre que la production de cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires est relativement peu modifiée (figure 1) [X] de même que la production de métaloprotéinases [X]. Par contre, plus le traitement thermique est important et plus les cellules sont altérées [X].

D'autres auteurs, sans utiliser la méthode du rapport de surface ont étudié l'effet de la température sur la réaction inflammatoire en démontrant un effet similaire à celui observé précédemment, c'est le cas de Prudhommeaux et al.[28], Nagase et al.[29]. De plus, Kukuchi et al.[30] ont demontré que le frittage des hydroxyapatite etait plus adapté en terme de biocompatibilité. Par contre Harada et al.[22] montrent aussi un effet de la température mais celui ci va à l'encontre des résultats présentés ci-dessus.

L'ensemble de ces résultats peuvent aussi être expliqués par les phénomènes de dissolution/précipitation qui ont lieu en périphérie des particules d'hydroxyapatite et qui dépendent de la cristallinité des biomatériaux, donc de leur température de traitement [31].

L'augmentation de la température de traitement des particules d'hydroxyapatite, en plus de modifier leurs caractéristiques physicochimiques, augmente leurs toxicités en altèrant les cellules.

Influence de la composition chimique des hydroxyapatite

Les propriétés des hydroxyapatites peuvent être améliorées en dopant les HA avec des ions naturellement dans l'os tels que le zinc, le strontium ou encore le magnésium.

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Le dopage en zinc apporte des propriétés intéressantes : au niveau matériaux, il modifie les processus de dissolution/précipitation et accélère la dégradation de l'hydroxyapatite (Jallot et al., 1999). Au niveau cellulaire il modifie l'expression de certaines cytokines (Bao et al., 2003) et inhibe les fonctions ostéoclastiques en favorisant la formation osseuse (Kawamura et al., 2000). Le zinc semble donc apporter des bénéfices comparé à l'utilisation d'une hydroxyapatite non-dopée. Cependant, une trop forte concentration en zinc peut entraîner une diminution de la solubilité de l'apatite (Ito et al., 2000). Pour la fabrication des hydroxyapatites dopées, notre groupe de recherche s'est tourné vers une technique prometteuse : l'élaboration par chimie douce, la méthode sol-gel. Brièvement, ce procédé utilise des précurseurs moléculaires (sels ou alkoxydes métalliques) en solution qui vont, par un processus d'hydrolyse/condensation, conduire à la formation d'un gel amorphe qui après traitement thermique adéquat permettra d'obtenir le matériau. L'utilisation de tels précurseurs permet d'assurer une excellente pureté au produit final mais aussi de modifier facilement la composition du matériau. La céramique est obtenue à des températures modérées et le contrôle des paramètres de synthèse (solvant, catalyse, rapport eau/alkoxydes,…) ainsi que des conditions de traitement thermique permettent de moduler la texture du matériau (porosité, taille des pores, surface spécifique,…).

Concernant le strontium, même si il améliore l'adhésion cellulaire, il diminue la croissance des ostéoblastes en culture et augmente la production de LDH (Sun et al., 1994). Il a été montré que le strontium aurait une influence sur la solubilité des apatites (Christoffersen et al., 1997).

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Bien que le rôle du magnésium dans l'os soit mal connu, plusieurs auteurs se sont intéressés à son influence sur l'ostéoconduction et sur les processus de dissolution/reprécipitation. Le magnésium est présent en quantité importante dans l'os jeune, où il joue un rôle dans la minéralisation (Wiesmann et al., 1997), bien qu'il soit toxique à concentration élevée (>2,5 mM) (Serre et al., 1998). *In vitro*, le magnésium déstabilise l'apatite au profit de la formation de TCP (Bertoni et al., 1998) et augmente le temps de formation de l'HA (TenHuisen et al., 1997). Martin et al. (1997) ont également montré que le rôle du magnésium dépendait de sa forme en solution ($MgCl_2$ ou $Mg_3(PO_4)_2$).

D'autres auteurs ont aussi étudié les effet biologique d'ions qui ne sont pas naturellement dans l'os comme le cadmium ou l'yttrium.

Des études physico-chimiques sur le cadmium ont permis de montrer qu'il diminuait la taille des cristaux d'apatite et donc sa formation (Blumenthal et al., 1995) et qu'une fois incorporé dans l'hydroxyapatite, il diminuait sa dissolution (Christoffersen et al., 1988).

Une récente étude sur le rôle de l'yttrium a montré que les ostéoblastes adhéraient mieux sur une HA dopée en yttrium et que l'adsorption de vitronectine et de collagène était aussi favorisée (Wehster et al., 2002).

Conclusion

En conclusion, les particules d'hydroxyapatite peuvent être plus ou moins toxiques selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Elles doivent être phagocytées pour provoquer une réaction cellulaire quantifiable. Les particules qui sont relarguées pendant la dégradation du

Hal-Inserm Author manuscript

biomatériau et le remodelage osseux, peuvent avoir une influence sur la biocompatibilité du matériau. Bien qu'il existe des résultats contradictoires qui peuvent s'expliquer par les méthodes pour déterminer les quantités de poudre à mettre en culture, de récentes études ont montré que les plus petites particules et particulièrement celles sous forme d'aiguille, induisaient la plus forte réponse inflammatoire et étaient les plus toxiques pour les cellules. Donc le relargage de ce type de particules doit être évité par les fabricants pour augmenter l'espérance de vie des prothèses.

Hal-Inserm Author manuscript
Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

Bibiographie

[1] Bloebaum RD, DuPont JA. Osteolysis from press-fit hydroxyapatite-coated implant. J Arthroplasty 1993;8:195-202.

[2] Bloebaum RD, Beeks, Dorr LD, Savory CG, DuPont JA, Hofmann AA. Complications with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthoplasty. Clin Orthop 1994;298 : 19-26

[3] Bloebaum RD, Zou L, Bachus KN, Shea KG, Hofmann AA, Dunn HK. Analysis of particulates in acetabular components from patient with osteolysis. Clin Orthop 1997;338:109-118.

[4] Benhayoune H, Jallot E, Laquerriere P, Balossier G, Bonhomme P, Frayssinet P. Integration of HA dense rods into cortical bone. Biomaterials 2000;21 : 235-242.

[5] Haynes DR, Roger SD, Hay S, Pearcy MJ, Howie DW. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. J Bone Joint Surg 1993;75A : 825-834.

[6] Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. Biomaterials 1984;5 : 5-10.

[7] Anderson, JM. Inflammatory response to implants. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 1988;34 : 101-107.

[8] Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. Histol Histopathol 1999;14 : 871-877.

[9] Jiranek WA, Machado M, Jasty M. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. J Bone Joint Surg 1993;75A : 863-884.

Hal-Inserm Author manuscript

[10] Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanisms of bone resorption : a review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. Clin Orthop. 1988;231 : 239-271.

[11] Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. Pathol Res Pract 1992;188 : 1104-1121.

[12] Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resoption. Calc Tissue Int 1993;53(suppl 1) : S94-S98.

[13] Shanbhag AR, Jacobs JJ, Galante JO, Glant TT. Macrophages/particles interactions: effect of size, composition and surface area. Journal Biomed Mater Res 1994;28: 81-90.

[14] Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P and Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes *in vitro.* Biomaterials 2003, 24: 2739-2747.

[15] . Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Killian L, Beorchia A, Guenounou M, Jallot E, Frayssinet P, Balossier G. Influence of Hydroxyapatite Particle Characteristics on the [K]/[Na] ratio : a Human Monocytes *In Vitro* Study. Colloid Surf B 2004, 33 : 49-55

[16] Laquerriere P, Grandjean- Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, Jallot E, Lauernt-Maquin D, Frayssinet P, Guenounou M. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes *in vitro* in presence of differents hydroxyapatite : importance of particle physical characteristics. Biomaterials 2004, 25: 2515-2524.

[17] Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR. Differential effects on different formes of hydroxyapatite and htdroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in-vitro. J Biomed Mater Res 1996;31 : 19-26.

[18] Malard O, Bouler JM, Guincheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resoption

Hal-Inserm Author manuscript

Hal-Inserm Author manuscript

and inflammatory reactions : preliminary in vitro and in vivo study. J Biomed Mater Res 1999;46 : 103-111.

[19] Sun JS, Lin FH, Hung TS, Tsuang YH, Chang W HS, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. J Biomed Mater Res 1999;45, 311-321.

[20] Sun JS, Tsuang YH, Chang W HS, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. Biomaterials 1997, 18 : 686-690

Hal-Inserm Author manuscript