

UNIVERSITÉ DE NANTES
U.F.R. D'ODONTOLOGIE
École doctorale de Chimie - Biologie

DOCTORAT

Discipline: *Ingénierie tissulaire osseuse*

Spécialité: *Biomatériaux*

Hakim-Borhane FELLAH

**Etude des propriétés ostéogéniques
de céramiques phosphocalciques**

Présenté et soutenu publiquement
le 27 Mars 2008

devant le jury ci-dessous

Rapporteurs:

Mr Pierre HARDOUIN Professeur des Universités (Boulogne sur Mer)

Mr Philippe ROSSET Professeur des Universités (Tours)

Directeurs de thèse:

Mr Pierre LAYROLLE Directeur de Recherche INSERM (Nantes)

Mr Daniel CHAPPARD Professeur des Universités (Angers)

Examineur:

Mr Olivier GAUTHIER Maître de Conférences des Ecoles Vétérinaires (Nantes)

Membre invité:

Mr Guy DACULSI Directeur de Recherche INSERM (Nantes)

AVANT-PROPOS

Penser librement est grand, penser juste est plus grand !

Thomas Thorild (1759-1808)

Par délibération, en date du 6 Décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

LISTE DES PUBLICATIONS

Borhane H. Fellah, Pierre Layrolle. Sol-gel synthesis and characterization of micro macro porous calcium phosphate bioceramics. Acta Biomaterialia. *Soumis*.

Borhane H. Fellah, Olivier Gauthier, Pierre Weiss, Daniel Chappard, Pierre Layrolle. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. Biomaterials 29 (2008). 1177-1188

Borhane H. Fellah, Nicolas Josselin, Daniel Chappard, Pierre Weiss, Pierre Layrolle. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of Biphasic Calcium Phosphate micro particles. J Mater Sci: Mater Med (2007) 18:285–292.

Borhane H. Fellah, Bruno Delorme, Jérôme Sohier, David Magne, Pierre Hardouin, Daniel Chappard, Pierre Layrolle. Macrophages and osteoblasts responses toward biphasic calcium phosphate microparticles. JBMR. Part A. *Soumis*.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCP: phosphate de calcium biphasé
 α -TCP/ β -TCP: phosphate tricalcique alfa/phosphate tricalcique bêta
HA: Hydroxyapatite
 α -PP/ β -PP: pyrophosphate alfa/ pyrophosphate bêta
CDA: apatite déficiente en calcium
DCPD: phosphate dicalcium dihydrate
OCP: phosphate octocalcique
CA: apatite carbonatée
CaP: phosphate de calcium
ACP: phosphate de calcium amorphe
CHA: carbonate d'hydroxyapatite
PTFE: polytetrafluoroethane
DTC: défaut osseux de taille critique
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alfa
IL-6: interleukine 6
TGF- β : facteur de croissance transformant bêta
VEGF: facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
IGF-1: facteur de croissance proche à l'insuline
MO: Moelle osseuse
DBM: matrice osseuse déminéralisée
pHEMA : polyhydroxylethylmethacrylate
BMP: protéine morphogénétique osseuse
CSM: cellule souche mésenchymateuse
CSS: cellules souches sanguines
 μ -CT: micro tomographie
MEB: Microscopie Electronique à Balayage
BSEM: microscopie électronique par électrons rétro diffusés
RT-PCR: réaction en chaîne par polymérase par transcriptase inversée
PTHr1: récepteur 1 de l'hormone de la parathyroïde
RUNX2: facteur de transcription impliqué dans la maturation osseuse

Table des matières

Introduction générale.....	14
Chapitre I: Mise au point bibliographique sur les substituts osseux et l'ostéoinduction.....	16
I.1. Le tissu osseux.....	17
I.1.1. La formation et le remodelage du tissu osseux	21
a) <i>L'ossification endochondrale</i>	21
b) <i>L'ossification intra membranaire</i>	22
c) <i>Le remodelage osseux</i>	24
I.1.2. Les pertes de tissu osseux.....	25
I.1.3. La cicatrisation osseuse	27
I.1.4. Les défauts osseux de taille critique.....	29
I.2. Les propriétés du substitut osseux idéal.....	31
I.3. Les greffes osseuses	33
I.3.1. La greffe osseuse autologue	33
I.3.2. Les greffes osseuses allogéniques	36
I.3.3. Les xéno greffes	38
I.4. Les substituts osseux synthétiques	39
I.4.1. Les céramiques phosphocalciques biphasées	40
a) <i>Synthèse et propriétés physico chimiques</i>	41
b) <i>Les propriétés biologiques des céramiques phosphocalciques biphasées</i>	41
I.5. Les biomatériaux ostéoinducteurs	43
I.5.1. Rôle de la porosité et de la microstructure	45
I.5.2. Effet de la morphologie de l'implant : forme, taille, quantité.....	46
I.5.3. Corrélation entre le modèle animal et le site d'implantation	47
I.6. Les mécanismes possibles de l'ostéoinduction par les biomatériaux.....	48
Conclusion.....	51
Les objectifs de ce travail.....	53

Chapitre II: Synthèse et caractérisation de céramiques phosphocalciques macro et microporeuses	54
II.1. Introduction	55
II.2. Synthèse « sol-gel » et caractérisation de céramiques phosphocalciques macro microporeuses	58
II.3. Discussion	59
Chapitre III: Propriétés ostéogéniques de céramiques phosphocalciques biphasées comparées à l'autogreffe osseuse en site intramusculaire et fémoral chez la chèvre	63
III.1. Introduction	64
III.2. Ostéogénicité de céramiques phosphocalciques biphasées comparées à l'autogreffe osseuse chez la chèvre	67
III.3. Discussion	68
Chapitre IV: Effets des microparticules de céramique phosphocalcique biphasée <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	73
IV.1. Introduction	74
IV.2. Etude de la réaction inflammatoire dans les muscles de rats après implantation de microparticules de phosphate de calcium biphasé	77
IV.3. Etude de la réponse de cellules macrophagiques et d'ostéoblastes après culture avec des microparticules de phosphate de calcium	78
IV.4. Discussion	79
Discussion générale	84
Conclusions générales et perspectives	90
Références bibliographiques	94
Liste des figures et tableaux	112

Introduction générale

Introduction générale

La reconstruction des pertes osseuses constitue actuellement un défi majeur pour la santé publique. L'autogreffe osseuse est le matériau de référence pour combler les pertes du tissu osseux. Cependant, elle présente quelques inconvénients tels que : la nécessité d'un second site opératoire et est disponible qu'en quantité limitée. Dans le cadre du développement de nouveaux substituts osseux synthétiques, plus faciles à obtenir et disponibles en quantité suffisante, les céramiques phosphocalciques biphasées (BCP) constituent une alternative et sont utilisées dans diverses applications cliniques. Ces céramiques sont dotées de propriétés biologiques intéressantes : biocompatibles, bioactives, ostéoconductives et même ostéoinductives. Cette capacité à induire une néoformation osseuse en site ectopique prouve l'aptitude de ces matériaux à favoriser l'ostéogénèse. Il a été démontré que l'architecture de ces matériaux et plus précisément leur microporosité, jouait un rôle crucial dans l'ostéoinduction. L'impact de l'architecture poreuse (macro microporosité) sur le comportement de la céramique *in vitro* et *in vivo* est encore mal connu, et le phénomène de l'ostéoinduction n'est toujours pas élucidé.

La première partie de ce manuscrit, est un rappel sur les caractéristiques et les éléments impliqués dans la biologie du tissu osseux. La formation et la cicatrisation du tissu osseux sont décrites ainsi que les pertes osseuses (défauts de taille critique) qui nécessitent une substitution. Dans ce cadre, après un rappel sur les propriétés biologiques des autogreffes et allogreffes osseuses, le cahier des charges du substitut osseux dit « idéal » est défini. Les céramiques phosphocalciques biphasées sont présentées. Enfin, les matériaux ostéoinducteurs ainsi que les mécanismes possibles qui précèdent l'ostéoinduction sont amplement abordés.

Dans le deuxième chapitre, l'objectif était de préparer et de caractériser une céramique macro microporeuse en employant des poudres de phosphate de calcium amorphes avec des particules de l'ordre du nanomètre par frittage à des températures relativement basses. Des poudres de phosphate de calcium avec différentes compositions ont été précipitées dans l'éthanol à partir d'un mélange de calcium métallique et d'acide phosphorique. La composition chimique, les phases cristallines et le comportement thermique des précipités ont été étudiés en fonction de la température. Les poudres ont été mélangées avec des billes d'urée, compactées et frittées pour donner une céramique macro microporeuse.

Dans le troisième chapitre, les capacités ostéogéniques d'une autogreffe osseuse ont été comparées avec celles de biocéramiques de phosphate de calcium implantées dans les muscles et les fémurs chez la chèvre. Des granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) ont été frittés à différentes températures, afin d'obtenir différentes microporosités. Les différentes céramiques de BCP ainsi que l'autogreffe osseuse ont été implantées pendant 6 et 12 semaines dans des muscles lombaires et dans des défauts de taille critique au niveau des épiphyses fémorales. Afin d'éviter l'ostéoconduction, les granules de BCP ou l'autogreffe osseuse ont été placés dans des cylindres creux en polytetrafluoroéthane (PTFE). Ces cylindres ont été parsemés de trous pour permettre la diffusion des fluides biologiques ainsi que la colonisation par des cellules. Les réponses cellulaires et tissulaires aux matériaux implantés ont été étudiées par histologie. La quantité du tissu osseux minéralisé, de biocéramique et de tissus non minéralisé, ainsi que la résorption des biocéramiques et de l'autogreffe osseuse ont été mesurées.

Dans le dernier chapitre, l'objectif était de reproduire le microenvironnement à la surface d'une céramique de BCP après son implantation afin de comprendre les phénomènes biologiques conduisant à l'ostéoinduction. Les réactions tissulaires et cellulaires *in vivo* et *in vitro* ont été étudiées après implantation et culture cellulaire en présence de microparticules de BCP.

Dans un premier temps, l'étude décrit la réaction inflammatoire dans l'environnement proche des microparticules de BCP suivant l'implantation dans des muscles de rats après 7, 14 et 21 jours.

Dans une deuxième étude, l'effet des microparticules de BCP sur la libération de cytokines (TNF- α et IL-6) par des macrophages et leur effet sur la différenciation ostéoblastique ont été mesurés. La viabilité cellulaire a été analysée ainsi que la différenciation des cellules ostéoblastique par RT-PCR en présence des cytokines pro inflammatoires (TNF- α et IL-6).

Enfin, les résultats de ce travail sont discutés dans leur globalité et mis en relation avec des perspectives de recherche sur l'ostéoinduction.

Chapitre I:

**Mise au point bibliographique sur les
substituts osseux et l'ostéoinduction**

I.1. Le tissu osseux

L'ensemble des os forme le squelette et assure trois fonctions essentielles à l'organisme: biomécanique (locomotion), métabolique (réserve de calcium et de phosphore) et hématopoïétique (moelle osseuse). Le tissu osseux est caractérisé par une matrice extracellulaire prépondérante à son contenu cellulaire et riche en fibres de collagène minéralisé. Ces fibres de collagène sont le plus souvent orientées dans la direction des contraintes biomécaniques et renforcées par des nanocristaux de phosphate de calcium. La phase minérale du tissu osseux est proche de celle de l'hydroxyapatite (HA) de formule :



Le minéral osseux est généralement mal cristallisé et les ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^{3-}) de la structure apatitique ci-dessus sont substitués par des ions magnésium, sodium, carbonate et hydrogénophosphate, ainsi que par d'autres éléments à l'état de traces. La partie minérale peut représenter de 30 à 70% de la masse totale du tissu osseux. La matrice extracellulaire osseuse est également constituée d'une trame de fibres de collagène de type I, de protéoglycanes (environ 10%) et d'autres protéines non collagéniques [1]. Les fibres de collagène qui sont alternativement déposées sous forme dense puis sous forme lâche donnent l'aspect lamellaire de l'os. L'architecture osseuse se divise en deux groupes :

L'os cortical, ou os compact, occupe 80% de la masse osseuse. La matrice osseuse représente 95% du volume tissulaire. L'unité élémentaire du tissu osseux compact est constituée par un ostéon, ou système de Havers. Les fibres de collagènes y sont orientées formant des structures en lamelles disposées autour de canaux neuro-vasculaires ou canaux de Havers. L'os cortical est parsemé de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 1).

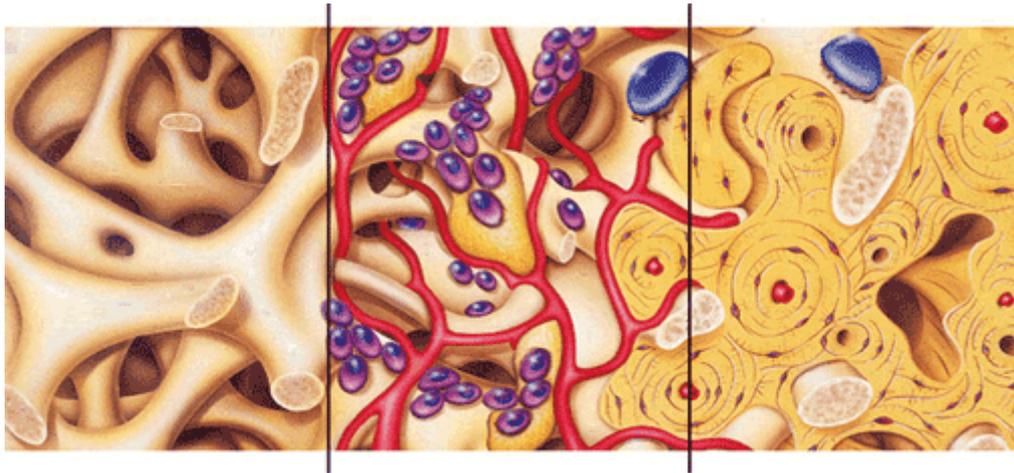


Figure 1 : Structure générale du tissu osseux

(Source : <http://nucleusinc.com>)

L'os trabéculaire représente 10% du squelette chez l'adulte. Il est constitué de travées osseuses anastomosées entre elles constituant un réseau tridimensionnel (Figure 2). La matrice osseuse représente en moyenne 20% du volume de ce tissu. Ces travées déterminent des cavités contenant la moelle osseuse riche en cellules souches hématopoïétiques desquelles dérivent les lignées cellulaires sanguines.

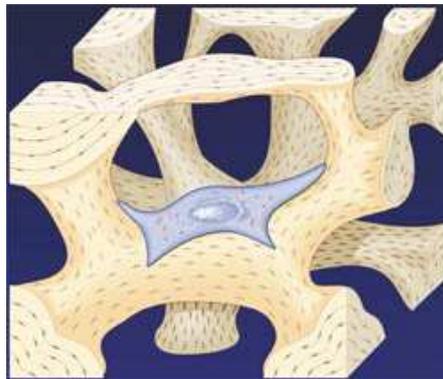


Figure 2 : Structure osseuse d'une zone trabéculaire

(Source : www.spineuniverse.com)

L'os contient des protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine, les sialoprotéines, l'ostéonectine, ou les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs). Actuellement, 15 BMPs ont été recensées (BMP1-15) [2]. Mise à part la BMP1 qui est une métalloprotéine [3], les BMPs font partie de la superfamille des TGF- β [4, 5]. Elles régulent une gamme diverse de processus de développement pendant l'embryogenèse et en période postnatale. Elles commandent la différenciation de plusieurs tissus musculo-squelettiques comprenant l'os, le cartilage, les tendons et les ligaments. Les BMPs sont produites principalement par les cellules osseuses et interviennent dans la formation, la minéralisation, la cicatrisation ou le remodelage du tissu osseux [6]. La plupart des BMPs possèdent un potentiel ostéoinducteur.

En effet, l'induction du cartilage et de l'os a été observée *in vivo* avec BMP2, 3, 4, 5, 6 et 7, soit avec des extraits osseux purifiés ou avec des molécules recombinantes [5, 7, 8]. Certaines d'entre elles, telles que les BMP2 et 7 sont déjà utilisées en clinique pour la régénération osseuse [9]. L'ostéoinduction induite par les BMPs a été considérée pendant longtemps de type endochondrale [10]. Mais des études récentes ont montré que selon le support utilisé pour implanter les BMPs, ces dernières induisent soit une formation osseuse endochondrale ou une ossification intra membranaire. Ainsi, lorsqu'elles sont associées à des éponges à base de fibres de collagène [11], de l'hydroxyapatite [12] ou à des revêtements phosphocalciques, une ossification endochondrale est observée [13]. Par contre, l'ostéoinduction est de type intra membranaire lorsqu'elles sont implantées avec des supports à base de fibres de verre ou des matrices osseuses insolubles [11, 12]. En plus de leur capacité d'initier la formation du cartilage et du tissu osseux, il a été démontré que les BMPs jouent un rôle dans la promotion et l'entretien des phénotypes cartilagineux et osseux [14, 15].

L'ostéocalcine est une protéine spécifique du tissu osseux qui présente une grande affinité pour l'hydroxyapatite, mais sa fonction physiologique exacte reste encore inconnue [16]. Les sialoprotéines comme l'ostéopontine facilitent l'adhésion des cellules ostéoclastes à la matrice [17]. L'ostéonectine est une protéine d'adhérence de la substance pré-osseuse (substance ostéoïde) au tissu osseux et interviendrait dans la minéralisation par la liaison du collagène à la fraction minérale de l'os [18].

Au niveau cytotologique, les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes caractérisent le tissu osseux (Figure 3).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) se retrouvent dans la moelle osseuse et jouent un rôle prépondérant dans la formation, la cicatrisation et le remodelage du tissu osseux. Les CSM peuvent se différencier en cellules ostéoprogénitrices puis en cellules plus spécialisées telles que les ostéoblastes et les ostéocytes.

Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées, de forme cubique, disposées en couches monocellulaires sur les surfaces osseuses. Les ostéoblastes assurent en premier lieu la synthèse de la matrice osseuse extracellulaire (collagène de type I et les protéines non collagéniques) puis le tissu ostéoïde. Ces cellules produisent des enzymes (phosphatase

alcaline) qui permettent le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite et assurent ainsi la calcification de la matrice.

Les ostéocytes proviennent d'ostéoblastes (1 cellule sur 40) intégrés dans la matrice osseuse calcifiée dans une logette appelée ostéoplaste. Les ostéocytes possèdent de long prolongements et sont connectés entre eux, avec les ostéoblastes et les cellules bordantes. Ces cellules jouent vraisemblablement un rôle de mécanorécepteurs et sont indispensables au maintien du tissu osseux.

Les cellules bordantes sont des cellules aplaties et allongées qui séparent l'espace osseux de l'espace médullaire. Les cellules bordantes n'ont pas d'activité de synthèse, néanmoins, il est actuellement admis qu'elles sont capables, sous l'influence de stimuli, de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs.

Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique. Elles sont issues de la fusion des prémonocytes. Ces précurseurs peuvent se différencier en monocytes/macrophages, en cellules dendritiques ou en ostéoclastes suivant les facteurs présents dans leur environnement. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées de grande taille (50-100 μm). Ce sont des cellules ostéorésorbantes capables de dégrader la matrice minéralisée. L'ostéoclaste adhère à la matrice osseuse calcifiée par une zone claire périphérique 'clear zone' où des intégrines membranaires se lient à des protéines matricielles. La zone centrale est constituée de nombreux replis membranaires 'ruffled border' sous laquelle se trouve la chambre de resorption "lacunes de Howship" à l'intérieur de laquelle l'ostéoclaste va dégrader la matrice minéralisée. Puis, l'ostéoclaste se détache de la surface.

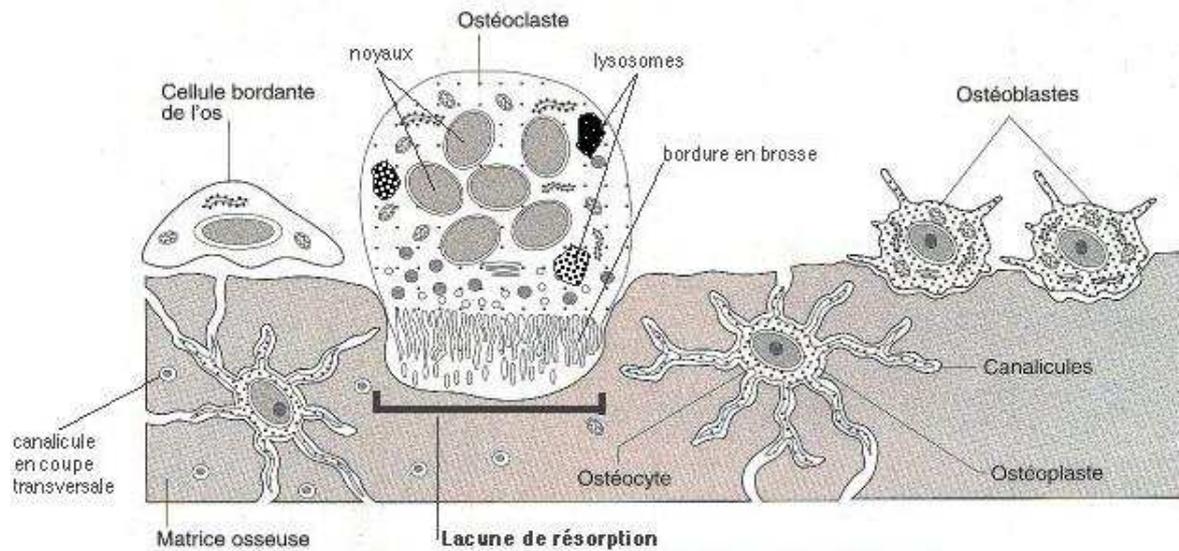


Figure 3 : Les cellules du tissu osseux

(source : <http://homepage.mac.com/danielbalas>)

1.1.1. La formation et le remodelage du tissu osseux

Durant le développement embryonnaire, la formation de l'os se fait soit par un processus d'ossification endochondrale (Figure 4), soit par un processus d'ossification intramembranaire (Figure 5).

a) L'ossification endochondrale

Lors du développement embryonnaire et de la croissance, l'ossification endochondrale 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 tissu cartilagineux transitoire avec la formation d'un cal cartilagineux minéralisé se résorbant secondairement pour être remplacé par du tissu osseux. Elle se déroule suivant plusieurs étapes :

Première étape : production d'un modèle cartilagineux et spécificité des cellules selon leurs emplacements,

Seconde étape : différenciation des chondrocytes hypertrophiques et vascularisation,

Troisième étape : résorption des modèles cartilagineux et ostéogenèse.

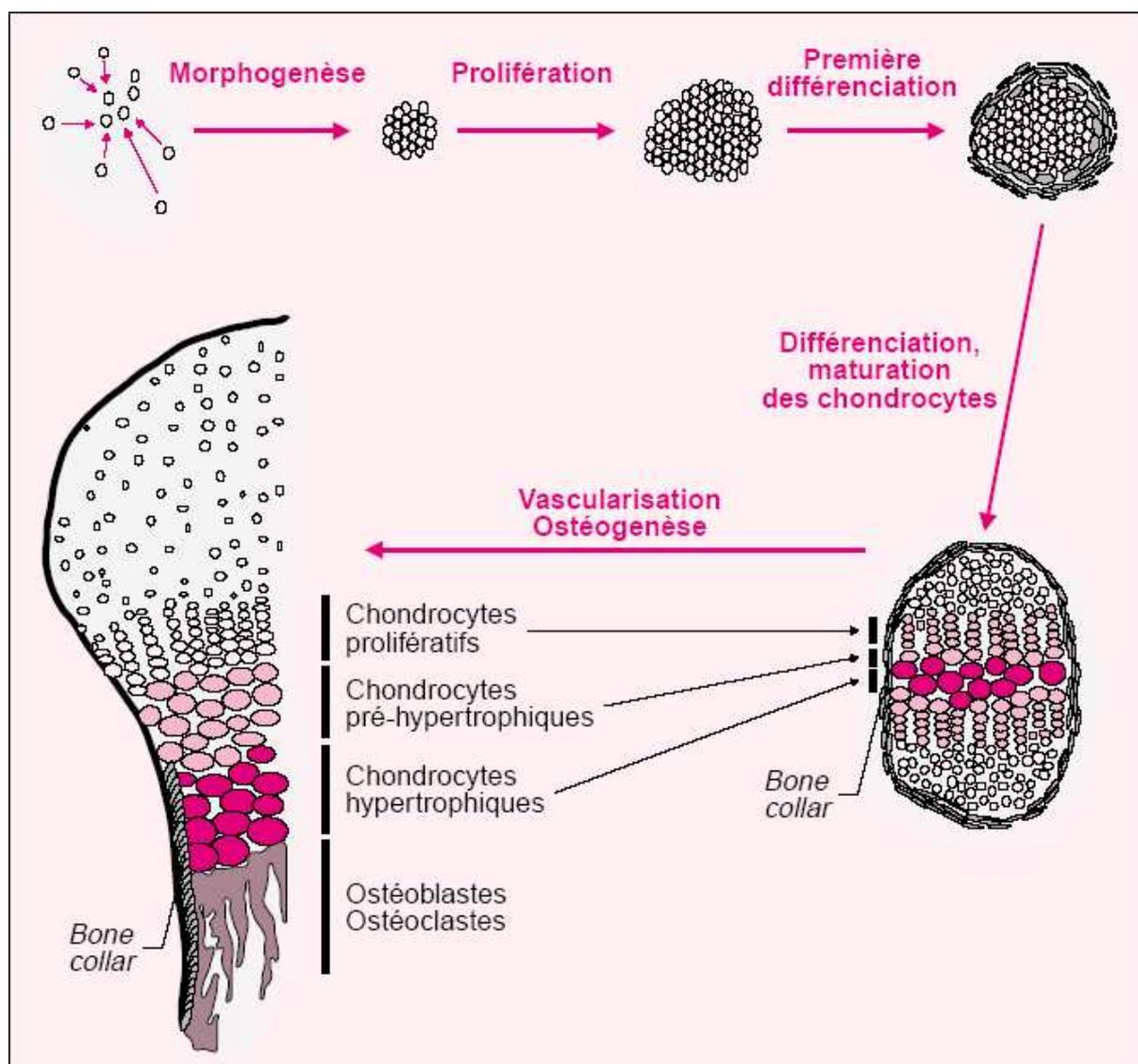


Figure 4 : Ossification endochondrale

(Source : [Médecine/Science](#))

b) L'ossification intra membranaire

Le processus d'ossification intra membranaire survient lors du développement des os plats. Elle intéresse les os dits « 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 ostéoprogénitrices, sans passage cartilagineux intermédiaire.

Il s'agit de la formation d'os *de novo* à partir des structures membraneuses environnantes. Elle débute par la condensation de tissu mésenchymateux. Au départ, les cellules mésenchymateuses baignent dans une substance amorphe homogène. Progressivement, ces cellules, dotées d'un grand pouvoir de différenciation, se transforment en fibroblastes qui

élaborent des fibres de collagène entre les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes. Ces fibres se condensent en une lame au sein de laquelle des cellules ostéoprogénitrices se rangent le long des travées conjonctives. Une partie de ces cellules se transforme en ostéoblastes actifs. Ceux-ci synthétisent de l'ostéoïde qui sera par la suite progressivement minéralisé.

L'ossification progresse par continuité à partir du centre et il y a formation d'un réseau de travées osseuses qui donne à l'os son aspect spongieux. L'os formé au niveau de ces sites d'ossification est de l'os fibreux qui sera totalement résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire. Le tissu conjonctif qui entoure l'os spongieux se transforme en périoste; sa face profonde élaborera, chez l'adulte, des lamelles osseuses de tissu osseux compact qui formeront les tables internes et externes de l'os.

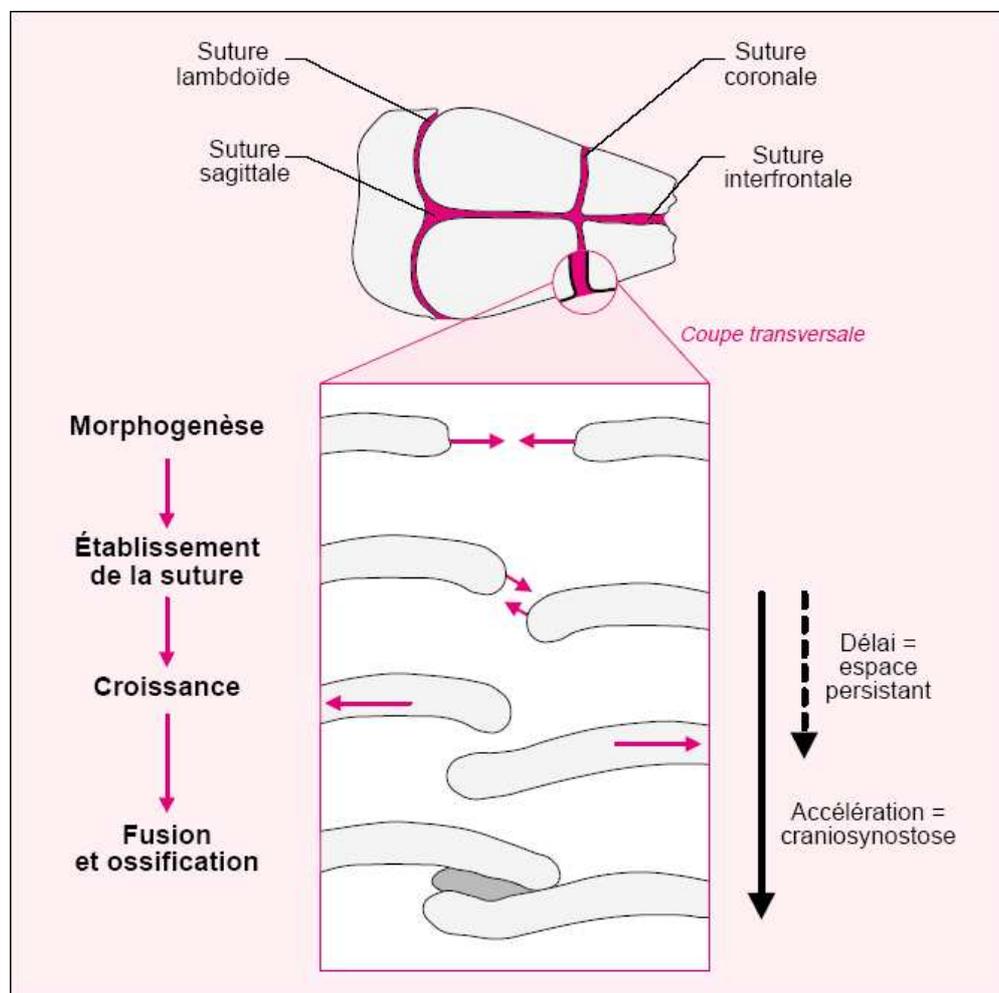


Figure 5 : Ossification intra membranaire (crâne de souris 16 jours)

(Source : [Médecine/Science](#))

c) Le remodelage osseux

Au cours de la vie, le tissu osseux passe par des phases de formation et de résorption. Ce processus de remodelage est essentiel pour le renouvellement de la matrice osseuse et contribue à améliorer les fonctions mécaniques et métaboliques du tissu osseux. Que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire, il existe une unité fonctionnelle de remodelage constituée de deux types de cellules comprenant un sous groupe ostéoclastique et un sous groupe ostéoblastique dont les activités métaboliques sont étroitement liées. Les phases de résorption et de formation assurées par l'unité fonctionnelle de remodelage donnent lieu à une unité structurale appelée « Ostéon ».

Phase de résorption : l'os ancien est résorbé par les cellules ostéoclastiques provoquant la formation de lacunes le long de la surface inactive d'une travée osseuse. Au niveau de cette zone de résorption, le pH est acide ce qui induit la dissolution de l'hydroxyapatite et par conséquent la libération des minéraux (calcium et phosphate). À la fin de l'activité ostéoclastique, les cellules macrophagiques interviennent sur les surfaces des lacunes et la phase d'inversion commence par une invasion ostéoblastique pour entamer la formation de la matrice osseuse (Figure 6).

Phase de formation : le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune permet une apposition d'une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice non minéralisée appelée « ostéoïde » sera secondairement minéralisée ce qui lui confèrera sa solidité. Les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme, des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines (interleukine, facteurs stimulant la formation ou l'activité des ostéoclastes).

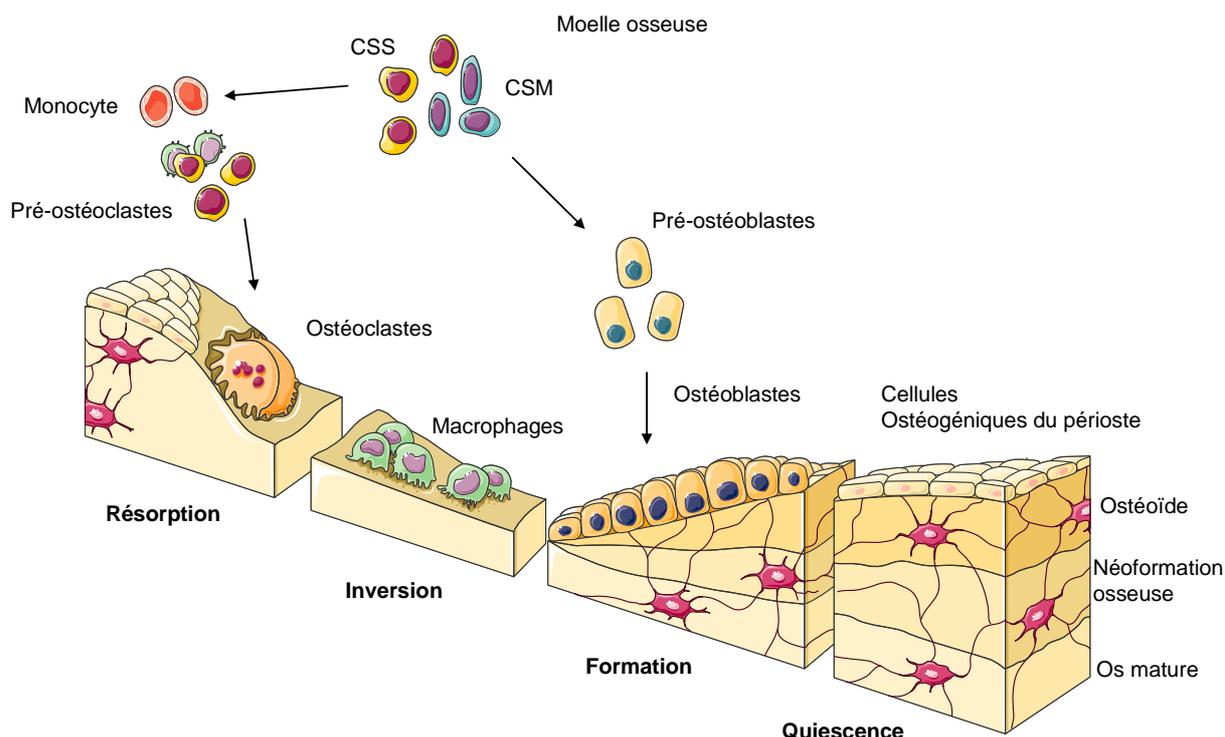


Figure 6 : Les cycles du remodelage osseux

(Source : [Servier Medical art](#))

1.1.2. Les pertes de tissu osseux

Les pertes de tissu osseux ont diverses origines : traumatismes (fractures), résection de tumeurs osseuses, chirurgie du rachis, infections (ostéomyélites). Elles peuvent également résulter de certains déséquilibres métaboliques ou de développements pathologiques du squelette (Maladie de Paget, ostéoporose).

En traumatologie, les os sont parfois rompus à cause d'impacts accidentels ou parfois subissent des forces lors de pratique de certaines activités sportives qui aboutissent à des microfissures qui fragilisent la structure osseuse [19-21]. Dans de nombreux cas, l'immobilisation permet une cicatrisation et une consolidation sans intervention chirurgicale (Figure 7). Cependant, les fractures des os longs (tibia, fémur) avec retard de consolidation (pseudarthroses) représentent environ 10 000 cas par an en France [22-24]. Le traitement de référence de ces fractures est la greffe osseuse autologue mais cette dernière présente des complications au niveau du site de prélèvement et une approche chirurgicale plus large.

Les tumeurs osseuses primitives (ostéosarcomes) ou secondaires (métastases) nécessitent parfois l'exérèse chirurgicale de masses importantes de tissu osseux [25, 26]. Les tumeurs

osseuses primitives malignes ont une prévalence estimée à 1,5 million de patients par an dans le monde, environ 300 cas par an en France, et affectent essentiellement une population jeune (<40 ans). Les métastases osseuses sont particulièrement fréquentes (60 à 80 % des cancers). Les traitements actuels font appel à la chirurgie (exérèse large sans comblement) et à la chimiothérapie avec de nombreux effets secondaires [27].

Les ostéopathies vertébrales ont diverses origines : traumatismes, infections, malformations, parfois suite à des complications de traitements ou d'interventions chirurgicales ou orthopédiques. Elles se présentent sous différentes formes : fractures, arthrose vertébrale, discarthrose, hernies discales, etc. Les traitements des ostéopathies vertébrales évoluent de plus en plus allant de la kinésithérapie (lombalgies) jusqu'aux cas les plus complexes qui nécessitent de interventions chirurgicales lourdes. Ces dernières requièrent des dispositifs de fixation (arthrodèses vertébrales) pour la consolidation des fractures incluant souvent une substitution osseuse.

Les infections osseuses : les ostéites ou ostéomyélites, surviennent surtout après des complications de traumatismes (fractures ouvertes), chirurgie osseuse (plaies surinfectées). Les infections osseuses sont d'origine bactérienne, mycotique ou parasitaire [28, 29]. Le terme d'ostéomyélite est réservé pour les infections d'origines hématogènes. Cette dernière nécessite des traitements lourds et fastidieux pour les patients atteints : traitements antibiotiques par voie intra veineuse et parfois des interventions chirurgicales lourdes (pose de drain au niveau des articulations) qui imposent de longues périodes de traitement et d'hospitalisation [30].

Certaines pertes osseuses résultent de pathologies : maladie de Paget [31], l'ostéoporose [32], maladies auto-immunes [33]. L'exemple le plus connu est l'ostéoporose qui touche surtout les femmes à la ménopause mais des cas ont également été observés chez les hommes [32]. Cette pathologie se caractérise par une perte de la masse osseuse et l'altération de l'architecture osseuse et par conséquent une importante fragilisation du squelette et augmentation du risque de fractures [34].

D'autres maladies du squelette sont dues à des facteurs génétiques, mutagènes (substances toxiques) et donnent lieu à des malformations osseuses (hypertrophique, atrophique, déformations, etc.) [35, 36].

I.1.3. La cicatrisation osseuse

Après une perte osseuse, le processus de la réparation physiologique se déroule en plusieurs étapes. Au départ, il se forme un épanchement et évolue par la formation d'un hématome accompagné par une invasion cellulaire (Figure 7 et 8). Par la suite, cette réaction évolue par une phase d'inflammation pour résorber les éléments apoptotiques (cellules, organites et éléments tissulaires) et les débris osseux. Pendant cette étape, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages envahissent le site pour retirer les débris et les microorganismes. Ces cellules vont libérer des médiateurs biochimiques qui agissent sur les cellules avoisinantes (fibroblastes, cellules souches). L'épanchement liquidien évolue par la suite en cal osseux pour lier les extrémités osseuses, une néovascularisation apparaît et une matrice collagénique extracellulaire riche en cellules ostéoprogénitrices est ainsi formée. Ces cellules donnent naissance à des ostéoblastes qui se différencient et forment le tissu ostéoïde, qui se minéralise et le cal osseux acquiert sa rigidité.

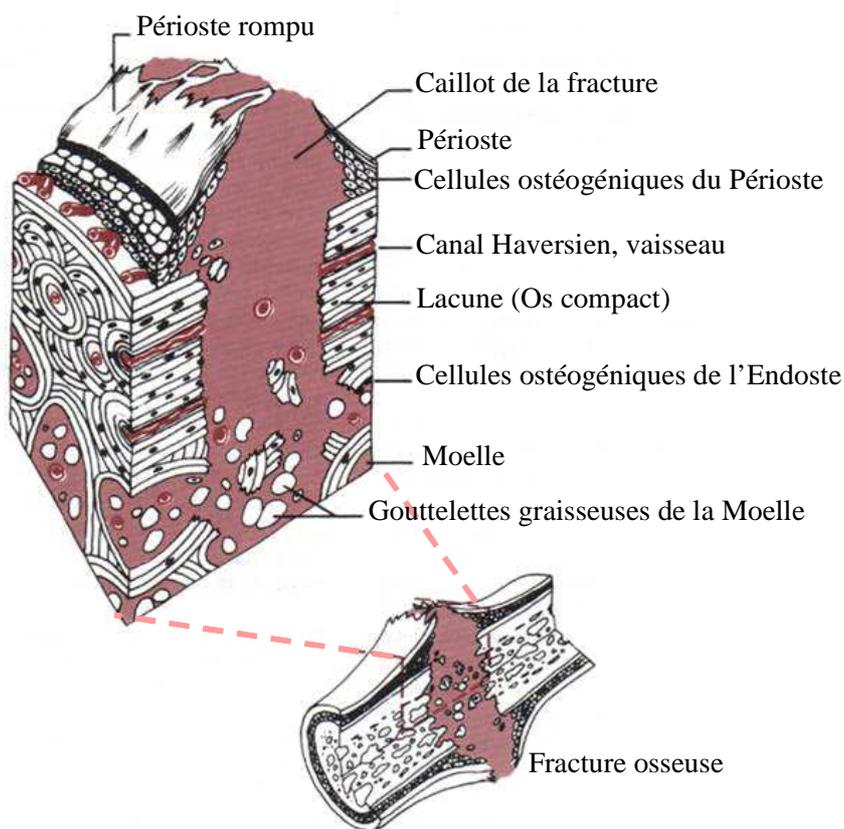


Figure 7 : Schéma d'une fracture (1 à 10 jours)

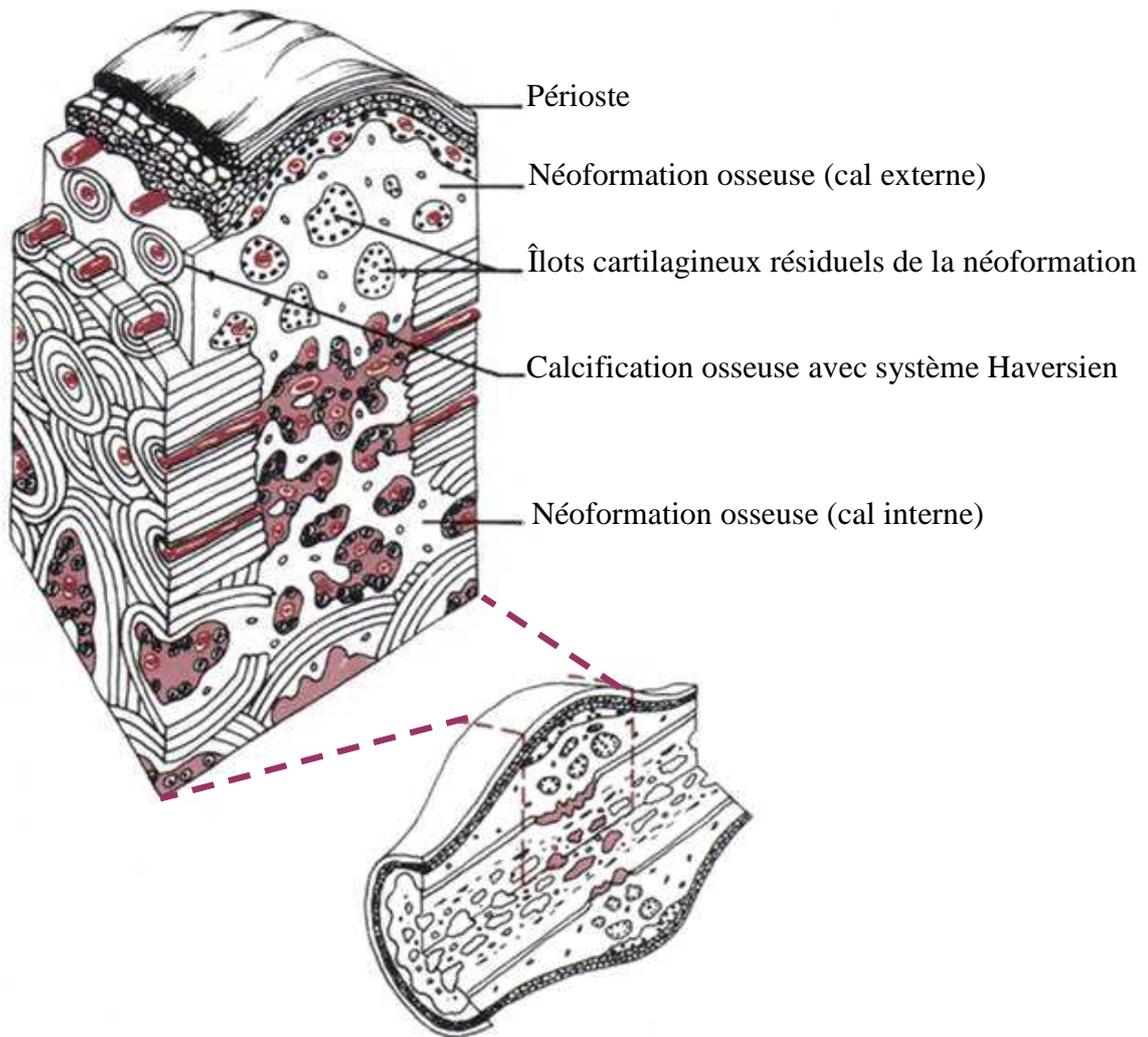


Figure 8 : Cicatrisation suite à une fracture

1.1.4. Les défauts osseux de taille critique

Dans certains cas, la perte osseuse est excessivement importante et ne peut cicatriser spontanément à cause de l'éloignement des berges du défaut. Dans ces cas, on parle de défaut de taille critique (Figure 9, Tableau 1). Schmitz et Hollinger, ont définis le défaut osseux de taille critique, par la plus petite fracture osseuse qui ne cicatrise jamais par la formation osseuse durant la vie d'un individu [37]. Cette définition a été revue par Hollinger *et al*, elle a été comparée aux défauts dont les berges sont éloignées et qui cicatrisent par une combinaison d'os et de tissu fibreux et par conséquent occasionne la perte de la fonction osseuse. Ils ont conclu que le défaut de taille critique cicatrise avec un tissu fibreux mais pas avec de l'os [38].

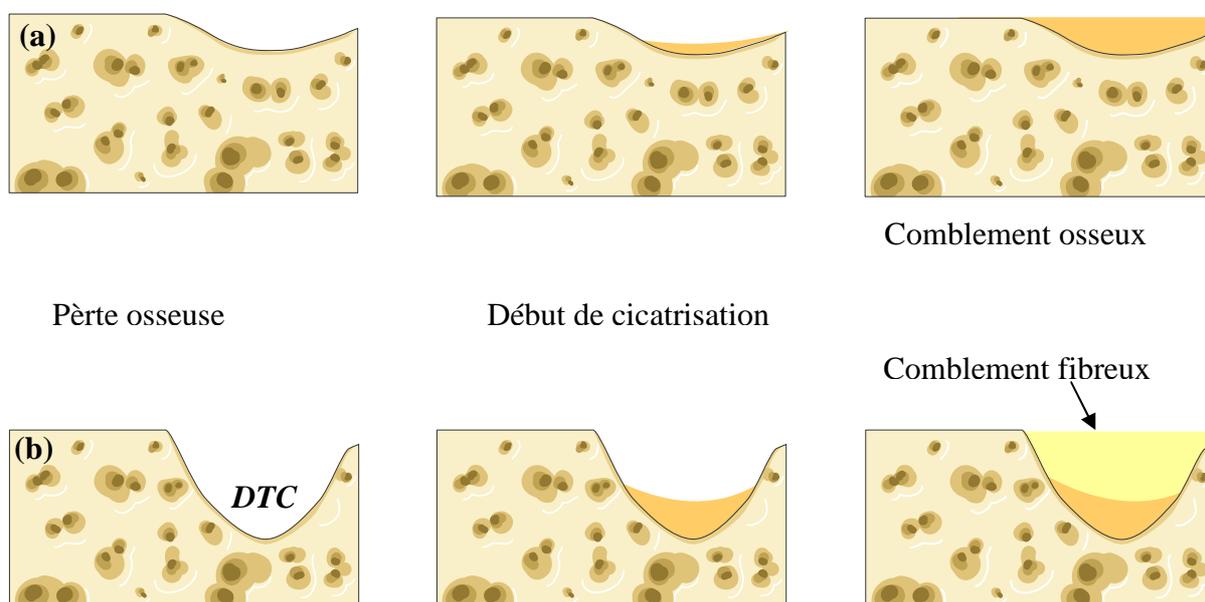


Figure 9 : Comblement de défauts osseux.
(a) défaut cicatrisable, (b) défaut de taille critique (*DTC*)

La classification d'un défaut osseux dans la catégorie de perte non cicatrisable dite « défaut de taille critique » varie selon :

La morphologie osseuse : la cicatrisation varie selon le type d'ossification (intra-membranaire ou endochondrale) qui dépend de la structure corticale ou trabéculaire de l'os.

Le site : un défaut osseux de 5 à 10 mm cicatrise naturellement au niveau des membres (os longs) ne pourra pas cicatriser seul au niveau d'un os de la main ou en région maxillaire et nécessitera l'apport d'un matériau de comblement (autogreffe, allogreffe, substitut osseux).

Les contraintes mécaniques exercées sur le squelette (création de microfissures), retardent la cicatrisation osseuse. Aussi, les fractures instables (cal osseux fragilisé) conduisent à des défauts non comblés par le tissu osseux.

L'individu : l'état de santé, le sexe ou l'âge du patient sont des éléments qui jouent un rôle important sur la capacité de l'os à cicatriser. En effet, un défaut d'une taille donnée peut cicatriser naturellement chez un enfant, par contre ce défaut ne cicatrisera pas spontanément chez un sujet âgé ou atteint d'une pathologie (ostéoporose).

Tableau 1 : Défauts osseux de « taille critique » chez différentes espèces

Espèce/Site		Calvaria	Mandibule	Os Longs		
Rat	<i>Jeune</i>	8 mm (56*)	4 mm (24*)	Fémur 6 mm (12*)	Fibula 6 mm (12*)	
	<i>Adulte</i>	8 mm (12*)				
Lapin		15 mm (36*) 10% d'os en 48*	5 mm	Fémur 6Øx10 mm (12*)	Radius 6 mm (20*)	
Chien		20 mm (24*)	> 45 mm	Ulna 1,5 fois > Ø de l'os		
Chèvre/Mouton		-		Iliaque 17Øx3 mm	Fémur 9Øx10 mm	Métatarse (Distraction) 25 mm
Cheval		-		4 ^{ème} Métatarse Distraction de 4 mm (16*)		
Primates		> 15 mm (24*)	Au moins 25 % De la longueur mandibulaire	-		
Homme		-		Carpe/Métacarpe/Maxillaire 5-10 mm		

Mesure de la cicatrisation osseuse après création des défauts (*semaines)

(D'après Hollinger *et al.* 1990)

I.2. Les propriétés du substitut osseux idéal

Le substitut osseux idéal doit permettre le comblement de pertes importantes du tissu osseux et assurer toutes ses fonctions. Afin d'atteindre ces objectifs, ce substitut osseux doit posséder certaines propriétés.

Initialement, le substitut doit pouvoir combler des défauts osseux de formes complexes en assurant un contact intime avec les tissus adjacents. Il doit s'adapter au site anatomique à combler et est généralement disponible sous différentes formes : granules, formes anatomiques adaptées ou injectables. Il ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire chronique ni de rejet, donc il doit être « biocompatible ». Il doit s'intégrer parfaitement et favoriser la repousse osseuse en fournissant un support aux cellules qui synthétisent la matrice osseuse extracellulaire. La matrice formée, minéralise et constitue à son tour un support pour la néoformation osseuse. Cette apposition osseuse sans tissu fibreux d'interposition est appelée « ostéoconduction ». Le substitut doit également permettre la libération ou la concentration de facteurs ostéogéniques ainsi que des médiateurs cellulaires tels que les BMPs, cytokines, etc. Ces molécules sont nécessaires pour le recrutement de cellules souches, leur différenciation en cellules ostéoprogénitrices permettant à des cellules spécialisées (ostéoblastes) de produire une matrice osseuse extracellulaire. Le substitut doit donc induire une néoformation osseuse, c'est la propriété « d'ostéoinduction » [39]. Idéalement, le substitut osseux doit présenter des propriétés mécaniques proches de celles du site osseux à reconstituer afin d'assurer sa fonction de soutien. Le matériau de comblement idéal doit être totalement substitué par un tissu osseux mature. Ses propriétés de résorption doivent donc être en adéquation avec la néoformation osseuse. Enfin, il doit être disponible en quantité suffisante pour permettre la reconstruction de défauts osseux de grande taille.

En résumé, les propriétés du substitut osseux idéal peuvent être définies comme suit :

L'Ostéogenèse : Selon Friedenstein en 1966, c'est la formation osseuse par des cellules ostéoprogénitrices spécifiques [40].

L'Ostéoconduction : Damien 1991, décrit l'ostéoconduction comme la capacité d'un substitut (greffe ou matériau) à favoriser un développement vasculaire ainsi que des cellules ostéoprogénitrices à partir du site receveur [41].

Davies en 1998, définit l'ostéoconduction comme le processus par lequel l'os est dirigé dans la structure du matériau : pores, canaux. Ou la diffusion de l'os à partir de la surface du matériaux précédé par une invasion de cellules ostéogéniques différenciées [42]. Cette intégration spécifique de la surface d'un substitut par liaison directe avec l'os sans l'interposition d'un tissu fibreux, est appelée ostéogénèse par liaison [42].

En 2001, Albrektsson décrit l'ostéoconduction par la repousse osseuse sur une surface. La surface ostéoconductive, est celle qui permet une repousse osseuse dans les pores, les canaux et sur sa surface [43].

L'Ostéoinduction : Après l'identification de l'ossification ectopique vers la fin du 19^{ème} siècle par Senn [44]. Plusieurs chercheurs se sont intéressés au sujet et différentes études ont été menées jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle [45-49].

En 1967, Urist définit l'ostéoinduction comme le mécanisme conduisant à la différenciation cellulaire d'un tissu donné en phénotype ostéoblastique suite au contact ou d'effets physicochimiques d'un autre tissu [50]. À cette période seuls quelques tissus ont été reconnus avoir cette capacité : la matrice osseuse déminéralisée et l'épithélium urinaire.

En 1968, Friedenstein donna la définition suivante : « l'ostéoinduction est la capacité d'un matériau à recruter des cellules souches non différenciées pour induire une lignée ostéogénique afin de former des cellules ostéoprogénitrices » [51].

Wilson-Hench (1987) proposa une définition pour l'ostéoinduction comme étant le processus par lequel l'ostéogénèse est induite [52].

Albrektsson (2001), décrit le terme « ostéoinduction » par des cellules primaires pluripotentes non différenciées qui sont stimulées d'une manière ou d'une autre pour se développer en lignée ostéoprogénitrices [43].

I.3. Les greffes osseuses

Les pertes de tissu osseux nécessitent une substitution pour conserver l'intégrité et assurer les fonctionnalités mécaniques et biologiques du squelette. Le comblement et la régénération des pertes osseuses est un déficit majeur dans la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, du rachis ou en traumatologie. Actuellement, il existe un éventail très varié de greffes osseuses d'origine biologique ou de substituts osseux synthétiques. Nous présenterons ici un aperçu des matériaux et des techniques utilisés dans la substitution osseuse.

Les greffes osseuses d'origine biologique occupent une part prédominante dans le domaine de la chirurgie osseuse [53]. Elles demeurent aujourd'hui le substitut le plus utilisé dans le comblement des défauts osseux [54, 55]. Les greffes osseuses sont utilisées dans la régénération du tissu osseux et peuvent provenir du patient lui-même (autogreffe) ou d'un donneur (allogreffes). Elles permettent de rétablir la fonction et de maintenir l'intégrité tissulaire osseuse en favorisant la cicatrisation et la revascularisation [56, 57]. Les substituts osseux synthétiques développés ou en cours de développement sont conçus de manière à mimer le comportement des greffes biologiques [58, 59].

1.3.1. La greffe osseuse autologue

L'autogreffe osseuse est considérée comme le « modèle de référence » dans la reconstruction et le comblement des défauts osseux grâce à l'absence de réaction immunogène [41, 60-63]. Elle est « ostéogénique » car elle apporte des éléments intrinsèques tel que les cellules ostéoprogénitrices et des facteurs de croissance qui assurent une continuité tissulaire [55]. Elle est « Ostéoconductrice » par sa structure trabéculaire puisqu'elle permet l'adhésion et la différenciation des cellules ostéogéniques et assure une diffusion du tissu osseux. Elle est considérée « Ostéoinductrice » car les greffes osseuses favorisent une différenciation des cellules souches vers des cellules ostéoprogénitrices qui donnent la formation du tissu osseux par la présence de protéines osseuses (Tableau 2) [41].

L'autogreffe osseuse a été initialement utilisée pour la reconstruction osseuse en chirurgie craniofaciale puis plus largement dans les autres chirurgies osseuses (orthopédie, arthrode

vertébrales, etc.). L'autogreffe osseuse se présente sous différentes formes selon le besoin (blocs, fragments, morcelée ou semi liquide par aspiration iliaque). Elle peut être utilisée seule ou associée à des substituts synthétiques. Le principe de l'autogreffe osseuse consiste en la transplantation d'un prélèvement osseux là où le comblement est nécessaire. Le greffon est prélevé soit en zone trabéculaire, soit en zone corticale ou encore cortico-trabéculaire si on a besoin d'un greffon qui possède également des propriétés mécaniques [64].

L'autogreffe osseuse est généralement prélevée au niveau de la crête iliaque, condyles fémoraux, plateau tibial, péroné, côtes ou de la symphyse maxillaire. Suivant le site et la technique de prélèvement, la greffe autologue est vascularisée ou non vascularisée. Cette propriété est nécessaire dans le remplacement de segments osseux de taille importante (reconstruction maxillaire, segments importants sur des os longs) et nécessite dans la plupart des cas une chirurgie lourde avec des techniques de précision (microchirurgie). Le prélèvement autologue vascularisé peut être prélevé au niveau de la crête iliaque, côtes, péroné mais les sites donneurs de prédilection sont les crêtes iliaques antérieures et postérieures (Figure 10) [65]. L'autogreffe n'entraîne évidemment aucune réaction immunologique. Cependant, parmi les cellules greffées, peu survivent à la transplantation [66]. La vascularisation d'un segment autologue constitue un élément clé dans la viabilité de la greffe, elle constitue un critère de choix en comparaison aux greffes non vascularisées et aux allogreffes [67]. Le greffon prélevé en zone trabéculaire, est revascularisé plus rapidement que le greffon cortical et permet la survie d'une fraction plus importante de cellules.

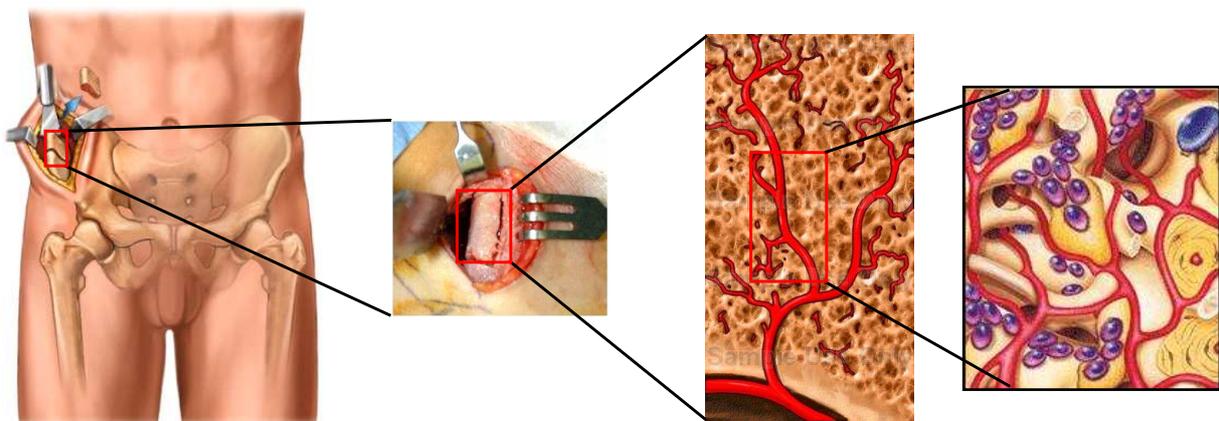


Figure 10 : Prélèvement et aspect d'une autogreffe osseuse au niveau de la crête iliaque
(Sources : www.maitrise-orthop.com; <http://nucleusinc.com>)

Bien que l'autogreffe osseuse réponde aux exigences nécessaires à la reconstruction osseuse, son utilisation est souvent associée à quelques inconvénients non négligeables. Elle n'est en outre pas toujours possible puisque la taille du greffon prélevé est limitée en quantité (environ 20 cm³). Le prélèvement du greffon nécessite un second site opératoire par chirurgie invasive ceci induit une morbidité pour le site donneur [57, 68], prolongation de la durée de l'intervention [69], augmentation de la sensibilité et les risques d'infections [70]. La technique de prélèvement ainsi que le temps passé entre le prélèvement et l'implantation conditionnent en partie la viabilité de la greffe [66]. La viabilité de l'autogreffe après l'implantation, dépend de la survie et l'implication des cellules dans la néoformation osseuse ainsi que l'implication des facteurs ostéogéniques.

Un des inconvénients qui réduit considérablement les capacités de comblement de l'autogreffe est sa forte résorption et ses propriétés mécaniques relativement faibles. L'usage de fragments osseux dans la reconstruction du conduit auditif appelés « Bone pâté », est un élément concret qui démontre les limites de l'autogreffe. En effet, ce greffon est utilisé pour optimiser la cicatrisation en substituant la greffe de cartilage, mais le greffon autologue reste limité par une forte résorption [54]. Kruyt, a décrit une forte résorption de fragments osseux implantés en site musculaire chez la chèvre [71]. Des autogreffes morcelées ou sous forme de blocs, dévitalisées (bain d'azote liquide) ont été totalement résorbées après 12 semaines d'implantation. Cette étude ne prouve pas que ce traitement thermique fût responsable de cette résorption car l'auteur a observé une forte résorption après seulement 5 semaines d'implantation d'une autogreffe corticale. Cette résorption est probablement liée à la viabilité de la greffe dans le site de transplantation et résulte du remodelage osseux « creeping substitution » phénomène déjà décrit par Axhausen [72]. Ce principe a également été décrit par d'autres auteurs [73]. De Bruyn propose que la résorption de l'autogreffe est due aux cellules ostéoclastiques résiduelles et viables dans le greffon après son implantation [74]. Des études récentes confirment les mêmes hypothèses avec une variabilité du taux de résorption allant de 30 à 90 % à partir de trois mois de reconstruction avec des fragments mandibulaires [75]. Cette différence est due probablement à la morphologie du greffon (morcelé, cortical ou trabéculaire) et aussi lié au site de prélèvement [76, 77].

La forte résorption de la greffe osseuse fraîchement implantée peut être liée aux mécanismes immunologiques qui augmentent la résorption [54].

Tableau 2 : Les propriétés des autogreffes et allogreffes osseuses

Grefe osseuse	Structure	Ostéoconduction	Ostéoinduction	Ostéogénèse
Autogrefe				
<i>Trabéculaire</i>	-	+++	+++	+++
<i>Corticale</i>	+++	++	++	++
Allogrefe				
<i>Trabéculaire</i>				
<i>Congelée</i>	-	++	+	-
<i>Congelée-lyophilisée</i>	-	++	+	-
<i>Corticale</i>				
<i>Congelée</i>	+++	+	-	-
<i>Congelée-lyophilisée</i>	+	+	-	-

(D'après Giannoudis *et al.* 2005)

I.3.2. Les greffes osseuses allogéniques

L'allogrefe est utilisée comme alternative pour le remplacement de l'autogrefe surtout lorsque la quantité requise pour substituer une perte osseuse est importante. Elle est largement disponible et ne requiert pas un second site opératoire sur le receveur. Cette greffe demeure cependant moins utilisée en comparaison aux autogreffes et aux matériaux de synthèse à cause des risques liés à son utilisation : réactions immunogènes, risque de transmission de maladies (virus).

Le greffon allogénique est prélevé sur un individu « donneur » autre que le patient à l'occasion de prélèvements opératoires : après une arthroplastie totale de la hanche ou lors de prélèvements multiples, il peut également provenir de prélèvements de cadavres. Les sites de prélèvements sont nombreux : os longs, articulations et fragments divers. Selon le site de prélèvement, la morphologie de ce greffon varie également. Il est utilisé sous forme de blocs, de fragments, morcelés ou en poudre ; adaptées selon les besoins de comblement.

La matrice osseuse déminéralisée (DBM) qui provient de l'os cortical est utilisée depuis le 19^{ème} siècle. Mais elle a été décrite pour la première fois par Macewen qu'au début du 20^{ème} siècle, pour le comblement de défauts suite à des ostéomyélites [78]. Depuis, plusieurs études ont été menées et les techniques de préparation des DBM se sont largement améliorées. Les travaux sur les DBM se sont approfondies à partir des années 70 notamment par Urist [79]. Actuellement, elles sont utilisées dans la substitution osseuse comme solution alternative aux autogreffes lorsque les indications l'exigent : reconstruction d'un segment de taille

importante. Néanmoins, leur utilisation et les mécanismes par lesquels elles permettent la reconstruction osseuse restent sujets à discussion depuis plusieurs années.

Les DBM sont dotées de propriétés ostéogéniques car elles contiennent des facteurs de croissance et des BMPs. Ces protéines induisent une différenciation des cellules souches mésenchymateuses et stimulent la prolifération (ALP) et l'activité cellulaire (fibroblastes) [80]. Certaines études se sont intéressées aux propriétés ostéoinductrices des DBM [8, 81]. Les matrices déminéralisées ont été étudiées *in vivo* et *in vitro*. Plusieurs modèles animaux ont été étudiés et les matrices ont été implantées dans différents sites ectopiques (sous cutanés, intramusculaire) aboutissant à des résultats variables en relation avec la nature des greffes utilisées. Cependant, le greffon allogénique présente des propriétés ostéogéniques inférieures par rapport à l'autogreffe, une résorption plus rapide, une néoformation osseuse moins rapide ainsi que des risques immunogènes [41, 54].

Les greffons allogéniques requièrent différentes techniques de manipulations et de préparation pour les rendre aptes à l'utilisation (traitements thermiques, chimiques, stérilisation, déshydratation et suppression des agents immunogènes tels que les protéines) [82, 83]. Ces traitements permettent l'élimination des cellules osseuses, cartilagineuses, vasculaires et hématopoïétiques présentes dans l'implant allogénique ainsi que les glycoprotéines membranaires qui sont particulièrement immunogènes. Une irradiation par rayonnement γ peut être effectuée après lyophilisation de la préparation.

Par contre, ces techniques de préparations altèrent ou du moins, diminuent les propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices des allogreffes [54, 84]. Le développement de l'utilisation des greffes allogéniques demeurent ralenties à cause des risques de transmission virale [41]. Les techniques de traitements des greffes allogéniques présentent des inconvénients mais aussi des avantages. La réaction immunologique au greffon allogénique, essentiellement à médiation cellulaire, est maîtrisée par le mode de préparation et de stockage de ce greffon. Ainsi, le degré de compatibilité entre le greffon et le receveur est modulé avec l'état des capacités immunologiques du receveur. L'effet principal de cette réaction immunologique serait d'inhiber ou de retarder la vascularisation du greffon ou sa colonisation par les cellules osseuses et les ostéoclastes.

Malgré ces réserves, les greffes allogéniques sont toujours utilisées, qu'il s'agisse d'un greffon unique ou de fragments multiples : lors de reprises de prothèses articulaires afin de

combler des pertes de substance liées à une ostéolyse autour de la prothèse, ou dans le cadre de la reconstruction de grandes pertes de substance osseuse, par exemple après l'exérèse de tumeurs [64].

1.3.3. Les xénogreffes

Les xénogreffes sont obtenues principalement d'animaux (os bovin) ou de corail. Elles représentent une source illimitée de matériaux pour la reconstruction osseuse humaine, mais leur utilisation doit d'abord être sécurisée. Elles présentent les mêmes inconvénients que les allogreffes (risques immunogènes, contamination, etc.). Avant leur utilisation, les xénogreffes doivent subir des traitements avec des solvants ou d'autres procédés (traitement thermique) afin de les rendre plus sûres. Malgré toutes ces précautions, il n'y a pas d'études à notre connaissance qui décrivent leur transformation en os viable. Leur utilisation peut induire une réaction immunologique prolongée et aboutir à leur séquestration par une large couche de tissu fibreux [85]. Malgré ces inconvénients, elles constituent une source importante d'hydroxyapatite, après traitement thermique d'os bovin (1200-1300°C). Durant cette étape la matrice organique est calcinée et ne sera conservée que la phase minérale présentant une porosité équivalente à celle de l'os trabéculaire.

Le corail naturel est utilisé comme xénogreffe dans le comblement osseux, il est biocompatible et résorbable [86]. Il est utilisé dans les reconstructions osseuses en chirurgie maxillo-faciale [87], arthrodèse vertébrale [88] et comblement des défauts en parodontologie [89]. L'intérêt de son utilisation réside dans une structure poreuse propice à l'invasion et à la prolifération des cellules humaines. Il est disponible sous différentes formes qui sont obtenues par usinage ou par broyage. Il est constitué de carbonate de calcium mais peut être convertit en hydroxyapatite par un procédé hydrothermal dans une solution phosphatée [90].

Les traitements chimiques ou thermiques des xénogreffes visant à pallier aux réactions immunogènes induites après leurs implantations, diminuent considérablement leurs capacités régénératives et limitent leur utilisation dans le domaine de la substitution osseuse.

I.4. Les substituts osseux synthétiques

Les limitations des autogreffes, allogreffes et xélogreffes justifient le développement de substituts osseux synthétiques. Ils sont généralement définis comme matériaux non viables qui interagissent avec les milieux biologiques [91]. Depuis plusieurs décennies, différents biomatériaux ont été développés, étudiés et utilisés dans la substitution osseuse (alliages de métaux, polymères, biomatériaux à base de phosphate de calcium, etc.) [56, 92]. Les substituts osseux synthétiques sont largement disponibles, ne provoquent pas de réactions immunogènes, sont bien tolérées et ils possèdent des propriétés biologiques qui se rapprochent de plus en plus des greffes osseuses (Tableau 3).

Les polymères et collagènes sont utilisés dans la reconstruction osseuse comme vecteurs de greffes ou de substituts osseux pour le comblement de défauts avec des formes complexes et répondre à des indications précises (injectable, repousse contrôlée, etc.). Ces formules sont conçues pour le maintien de l'ostéogénicité et l'ostéoconduction. Les combinaisons polymère ou collagène avec un substitut telle que les céramiques sous forme injectable, apportent une porosité par l'espace entre grains nécessaire à la diffusion des fluides biologiques. Ces formules permettent d'améliorer les techniques d'abord chirurgicales afin de rendre les interventions moins invasives [93-95]. Les membranes de collagènes sont utilisées dans la reconstruction de larges segments osseux « Guided bone regeneration » [96]. Ils existent plusieurs types de substituts synthétiques mais les céramiques phosphocalciques demeurent les plus utilisées [55, 97].

Tableau 3 : Substituts des greffes osseuses

Substituts	Caractéristiques
Phosphate de Calcium	Ostéoconduction
Ciment phosphocalcique	
Céramiques	
Collagène	
Polymères synthétiques	Ostéoinduction
DBM	
BMPs	
Facteurs de croissance	
Thérapie génique	Ostéogénèse combinée
Moelle osseuse aspirée, greffes composées	

(D'après Giannoudis *et al.* 2005)

Les substituts osseux à base de céramique phosphocalcique utilisés dans le comblement des pertes du tissu osseux, possèdent une composition chimique relativement proche de la partie minérale de l'os et des dents [98]. Grâce à leurs structures et propriétés biologiques, ces céramiques sont bioactives, biocompatibles, ostéoconductrices et parfois ostéoinductrices [92].

Plusieurs céramiques phosphocalciques ont démontrées leurs capacités spécifiques d'utilisation [41, 86]. En effet, l'hydroxyapatite naturelle (corail ou dérivés d'os bovin) ou synthétique, a été reconnue comme substitut de référence dans certaines applications cliniques [41]. Caractérisée par la lenteur de sa résorption, l'hydroxyapatite a démontré sa capacité dans l'augmentation de la crête alvéolaire et dans le remplissage de défaut parodontal. À cause des difficultés rencontrées quand à l'utilisation de l'autogreffe osseuse en orthopédie, l'utilisation de blocs d'hydroxyapatite poreux a servi dans le comblement de défauts après résection tumorale ou fusion spinale des corps vertébraux. L'utilisation des céramiques à base de phosphate de calcium tricalcique a servi dans le comblement des défauts suite aux pertes des tissus péri-dentaires. En orthopédie, l'utilisation des phosphates tricalciques est généralement indiquée dans les cas qui nécessitent des matériaux résorbables.

1.4.1. Les céramiques phosphocalciques biphasées

Parmi les biocéramiques, le phosphate de calcium biphasé (BCP) présente le plus d'intérêt dans la reconstruction osseuse grâce à ses propriétés de bioactivité contrôlée.

Le phosphate de calcium biphasé « BCP » est une association de deux phosphates de calcium : l'hydroxyapatite « HA » : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et le phosphate tricalcique bêta « β -TCP »: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Le BCP est biocompatible et ostéoconducteur [93, 99-101]. Le β -TCP étant plus soluble que l'HA *in vivo*, la résorption du BCP est donc proportionnelle au taux de β -TCP qu'il contient. Les céramiques biphasées se résorbent d'une manière intermédiaire et combinée entre une résorption lente grâce à l'HA ou rapide grâce au β -TCP. Néanmoins, la vitesse de résorption peut être contrôlée de manière à l'adapter à son utilisation (augmentation ou réduction du ratio HA/ β -TCP). Cependant, le rapport HA/ β -TCP n'est pas le seul facteur qui agit sur le comportement biologique de ces céramiques.

a) Synthèse et propriétés physico chimiques

Les céramiques phosphocalciques biphasées sont usuellement préparées par précipitation et frittage à une température avoisinant les 1100°C [102]. Le rapport HA/ β -TCP peut varier après le frittage d'une apatite déficiente en calcium (CDA) suivant sa composition et le rapport calcium/ phosphate (Ca/P) [90]. L'apatite déficiente en calcium (CDA) peut être préparée par précipitation ou hydrolyse de phosphate dicalcium dihydrate (DCPD) de formule $(\text{CaHPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou à partir de phosphate di-calcium anhydre (DCPA) de formule CaHPO_4 , ou aussi de phosphate octocalcique (OCP) de formule $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [90].

Les BCP sont disponibles sous différentes formes (particules, granules, blocs : poreux ou compacts). La macroporosité (taille des pores $>200 \mu\text{m}$) est créée au sein du matériau en additionnant des substances volatiles (naphtalène, sucre ou polymères) avant frittage à haute température, les proportions ajoutées de ces substances donnent lieu à une porosité et une interconnexion variable. Cette porosité est nécessaire aux processus d'intégration biologique : infiltration des céramiques par les fluides biologiques, invasion, prolifération et attraction cellulaire, repousse osseuse ainsi que la vascularisation. La forme des pores dépend aussi de la forme et de la nature du porogène utilisé, elles peuvent être rondes (billes d'urée) ou géométriques (cristaux de sucre, paillettes ou particules de naphtalène).

La microporosité (taille des pores $<10 \mu\text{m}$) est le résultat de la procédure de frittage. La taille des micropores dépend de la durée et de la température de frittage [102]. La surface spécifique, la taille des cristaux et la micro macroporosité ont une influence sur les propriétés physicochimiques et sur les propriétés mécaniques des céramiques [103, 104].

b) Les propriétés biologiques des céramiques phosphocalciques biphasées

La réponse cellulaire et tissulaire induite en contact des BCP *in vitro* ou *in vivo*, est comparable à celle obtenue par l'utilisation des greffes osseuses. Un substitut à base de céramique phosphocalcique biphasée est :

Biocompatible : Ces matériaux ont démontré leur biocompatibilité par l'absence de réaction inflammatoire chronique favorisant l'évolution normale des tissus avoisinants [105].

Bioactif : La bioactivité des céramiques correspond à une dissolution partielle ou biodégradation du matériau dans le milieu et une sursaturation locale des fluides biologiques

en ions minéraux permettant la précipitation d'une apatite biologique à sa surface. Cette couche d'apatite biologique est responsable de l'adhésion des cellules ostéoblastes produisant la matrice osseuse extracellulaire [103, 106-108].

Ostéoconducteur : Ce processus qui permet une repousse osseuse à partir des berges d'un défaut osseux sur un support résorbable ou permanent [109]. Grâce à leur structure poreuse (macropores), les céramiques sont colonisées par le tissu osseux. Ainsi la répartition de l'os sur la surface de la céramique est assurée par la colonisation et la différenciation cellulaire [110]. Elle est accompagnée par la dissolution/précipitation et résorption/substitution osseuse, permettant l'intégration de la céramique à l'os hôte.

Les BCP permettent une diffusion et infiltration des fluides biologiques, suivi par une colonisation cellulaire. Ces matériaux sont propices à l'attachement, la prolifération ainsi que l'expression des cellules. Les cellules qui colonisent les matériaux peuvent être des macrophages, cellules géantes, ostéoclastes (résorption), cellules souches (CSM, CSS) ainsi que des cellules ostéoprogénitrices et ostéoblastes pour la synthèse et la formation tissulaire. L'ostéogénèse et la résorption des matériaux commencent dès le 7^{ième} jour à la surface et à l'intérieur des macropores. Le recrutement des monocytes, des cellules géantes multinucléées permettent de résorber les matériaux alors que les ostéoclastes résorbent l'os nouvellement formé (notion du remodelage osseux) et aussi le matériau [102, 106, 111-113]. Ces observations suggèrent que le phénomène de dissolution/résorption devrait se produire avant l'adhésion et l'expression ostéoblastique [103, 106]. La bioactivité et l'ostéoconduction sont favorisées par des substituts osseux poreux avec une grande surface d'échange et une bonne perméabilité aux fluides biologiques.

Ostéoinducteur : C'est le mécanisme de différenciation cellulaire qui abouti à un tissu osseux en relation avec des propriétés physicochimiques dans un autre tissu [45, 91, 114]. Il semble que la microstructure est un préalable pour qu'une céramique soit ostéoinductrice. En effet, certaines céramiques phosphocalciques biphasées frittées à des températures comprises entre 900 et 1100°C possèdent une microporosité et une macroporosité ouverte et interconnectée. Lorsqu'elles possèdent des pores de 100-600 µm, elles favorisent la colonisation cellulaire et la vascularisation. La microporosité avec des pores <10 µm permet la diffusion des fluides biologiques et l'adsorption de protéines. Ces caractéristiques,

procurent aux céramiques des propriétés d'ostéoinduction, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'induire la formation osseuse en site ectopique (muscles, sous cutané, etc.).

I.5. Les biomatériaux ostéoinducteurs

Afin d'améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux de substitution osseuse et d'optimiser la cicatrisation des défauts osseux de taille importante, il est nécessaire d'évaluer leur capacité à induire une ostéogenèse en site ectopique. Des ossifications ectopiques d'origine pathologiques ou traumatiques ont été rapportées [115].

En 1889, Senn a rapporté que l'implantation d'os décalcifié de chien favorisait la cicatrisation des défauts de taille importante [44], mais ces travaux étaient difficilement reproductibles [6]. En 1931, Huggins a observé une ossification ectopique après implantation de tissus mous (parois vésicales) dans le muscle superficiel de l'abdomen (rectus abdominis) de chiens adultes [46]. Il a observé un tissu ostéoïde après 16 jours d'implantation, mais n'a pas trouvé de tissu osseux minéralisé. A partir du 18^{ième} et jusqu'au 26^{ième} jour d'implantation, il a observé un tissu osseux caractéristique (éléments tissulaires et cellulaires), formé par ossification intra membranaire. Ce type de structure est généralement présent dans les os de la calotte crânienne, l'ilium et les omoplates [116]. Au cours des années 30, Levander a constaté une ossification au niveau de tissu musculaire suite à une injection d'extrait d'alcool pur [47, 48]. Bridges en 1958, a observé une formation de tissus osseux et de cartilage dans des tissus non squelettiques (capsule rénale, sous cutanée) après implantation de tissus dévitalisés ou d'extraits tissulaires (cartilage épiphysaire, fragments osseux) [45]. Ces observations ont déjà été constatées par Urist et MacLean en 1952, formation ectopique dans chambre antérieure de l'œil [48, 49]. Dans l'étude réalisée par Bridges, des échantillons contenant du cartilage hypertrophique dévitalisés et déshydratés ont été implantés en site musculaire. Il a observé une formation osseuse ectopique dans ces échantillons. Ces constatations l'ont conduit à l'idée que la formation osseuse ectopique est due à la libération de substances chimiques, telles que des protéines provenant du cartilage hypertrophique [45].

C'est après les études de Urist qui ont débuter en 1962 et jusqu'à la fin des années 60 que le phénomène de l'ostéoinduction devient une réalité scientifique [49, 117]. En effet, la description de ce phénomène par l'utilisation de matrices osseuses déminéralisées (DBM) a

convergé vers la théorie de l'implication des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs). Après Urist en 1967, c'est Friedenstein en 1968 qui donna une définition de l'ostéoinduction, qui est la capacité d'un matériau à induire la différenciation de cellules souches en cellules ostéoprogénitrices [51]. Winter et Simpson ont réalisée une étude publiée dans la revue Nature en 1969 sur la formation osseuse ectopique dans des éponges de polymère polyhydroxyéthylmethacrylate (pHEMA) [114, 118]. Dans cette étude, ils ont observé une calcification au sein des éponges pHEMA suivie d'une néoformation osseuse en site sous cutanée de porcs, et cela malgré le fait que ces matériaux étaient implantés sans addition de cellules ou de facteurs ostéogéniques (CSM, BMPs). Suite à ces études, de nombreux travaux ont démontré l'ostéoinduction par des matériaux en relation avec leurs propriétés physicochimiques, sans pour autant décrire le mécanisme biologique de ce phénomène.

L'ostéoinduction est une formation osseuse en site extra squelettique. Elle implique la différenciation de cellules souches (CS) vers des ostéoblastes ainsi que le rôle majeur des protéines de la morphogenèse osseuses (BMPs).

Les phosphates de calcium semblent être impliqués d'une façon significative dans l'ossification ectopique (Tableau 4). Dans ces matériaux, la calcification par la précipitation d'une apatite biologique en surface semble précéder la néoformation osseuse [114]. En effet, l'hydroxyapatite de synthèse [119, 120, 121], l'hydroxyapatite naturelle (extraite de corail) [120, 122, 123], les céramiques à base de phosphate tricalcique α , phosphate tricalcique β , phosphate de calcium biphasé, les pyrophosphates α et β [91, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130], les ciments phosphocalciques [124, 131], les revêtements à base de phosphate de calcium [132, 133] et les vitrocéramiques induisent la précipitation à leur surface d'une couche riche en phosphate et en calcium [134].

Tableau 4 : Ostéoinduction par les phosphates de calcium chez différentes espèces

	Homme	Chien	Porc	Babouins	Singe	Chèvre	Lapins
HA	*	*	-	*	*	*	*
BCP		*	*				*
α - TCP		*					
β - TCP		*					
β - PP		*					
Ciment		*					
Vitrocéramique		*					

(D'après Yang Z *et al.* 1996)

L'ostéoinduction a également été observée dans des matériaux possédant une surface bioactive mais ne contenant pas de phosphates de calcium tel que le titane traités par la soude [135, 136]. Ces matériaux présentaient une calcification *in vivo* par la précipitation d'une apatite biologique à leur surface. Habibovic et de Groot ont proposé d'éventuelle concentration de protéines ostéogéniques endogènes dans cette couche d'apatite. Cette concentration en cytokines pourrait expliquer l'attraction à la surface des matériaux et la différenciation de cellules souches circulantes en cellules ostéoprogénitrices [137]. Ripamonti évoque également une concentration de BMPs endogènes à l'intérieur des biomatériaux [138]. Yuan en 2001, rapporte que les BMPs jouent un rôle majeur dans l'ostéoinduction par les biomatériaux [139]. Cependant, ils existent des différences entre l'ostéoinduction induite par les BMPs et celle induite par les biomatériaux.

Les biomatériaux ne semblent pas induire d'ostéogénèse ectopique chez les petits animaux [119, 140-143]. Inversement, les éponges de collagène ou les DBM contenant des BMPs conduisent à une formation osseuse chez les rongeurs après implantation sous cutanée ou intramusculaire après 3 semaines [144]. Cette ossification ectopique induite par les BMPs passe par la formation d'un tissu cartilagineux (ossification endochondrale) alors que le tissu osseux formé au contact des biomatériaux semble se former directement comme dans le cas d'une ossification intra membranaire [10, 122, 128]. La néoformation osseuse peut se créer, soit à l'intérieur des pores du biomatériaux [91], ou entre des granules de BCP [129]. Il est primordial de rappeler qu'une ostéogénèse en site ectopique est dépendante de plusieurs facteurs. Pour qu'un matériau soit ostéoinducteur, il doit présenter différentes caractéristiques : macro microporosité et composition chimique propice pour une ostéogénèse.

1.5.1. Rôle de la porosité et de la microstructure

La présence d'une macrostructure et de cavités interconnectée au sein d'un matériau est indispensable pour la circulation des fluides biologiques, l'acheminement des nutriments nécessaires pour l'attraction des cellules et la néoformation osseuse. L'ostéoinduction a toujours été observée dans des matériaux poreux (structure en 3 dimensions) et plus récemment entre des granules de 1-2 mm de BCP. Ripamonti, propose qu'une géométrie bien précise « des pores concaves » seraient plus favorables à l'ostéogénèse en site ectopique [145]. De part leurs propriétés physicochimiques, les céramiques phosphocalciques et les

ciments phosphocalciques induisent une ostéoinduction [119, 121, 122, 124, 125, 127]. Une néoformation osseuse a été observée à l'intérieur des pores et à la surface des matériaux grâce à la bioactivité du matériau [124, 131]. Les revêtements phosphocalciques sur des surface poreuses (titane poreux) ont également démontrés une ostéoinduction [133], mais elle a été absente sur les surfaces de titane ou d'alliage à surface dense. Les matériaux possédant une macrostructure tels que les vitrocéramiques [134] ou le titane poreux [135], ont induit une néoformation osseuse en site ectopique.

La microporosité semble être indispensable pour l'adhésion, la différenciation des cellules souches et la prolifération des cellules ostéogéniques [140, 146-149], ainsi que la concentration de facteurs ostéogéniques (BMPS, cytokines inflammatoires) qui semblent jouer un rôle important dans la formation osseuse en site ectopique [120, 122]. L'ostéoinduction, observée dans les ciments phosphocalciques, concernait essentiellement des implants possédants une surface rugueuse [124, 131]. Certains revêtements phosphocalciques sur les métaux poreux induisent une néoformation osseuse en site ectopique. Il a été montré que des revêtements composés de phosphate octocalcique (OCP) étaient ostéoinducteurs alors que le phénomène n'a pas été observé avec un revêtement à base d'apatite carbonatée (CA). Ces deux revêtements phosphocalciques présentaient des microstructures différentes : l'OCP était composé d'un enchevêtrement de cristaux alors que le revêtement de CA était beaucoup plus dense [133].

En sus des phosphates de calcium, les vitrocéramiques, l'alumine et l'oxyde de titane avec des surfaces microporeuses ont montré leur capacité à induire une ostéogenèse en site ectopique [134]. Comme il a déjà été décrit, le titane et l'alumine, ne contiennent pas initialement de phosphate de calcium mais ont une capacité d'induire une calcification *in vitro* et *in vivo* [135].

1.5.2. Effet de la morphologie de l'implant : forme, taille, quantité

La formation osseuse induite par les céramiques phosphocalciques a été largement mise évidence dans différents modèles animaux [120, 126, 127, 129, 130, 139]. Cependant, quelques variations concernant les matériaux sont à prendre en considération, telles que :

- La composition chimique :

Plusieurs biomatériaux à base de phosphate de calcium sont ostéoinducteurs (HA, α -TCP, β -TCP, BCP, Ciments phosphocalciques, α -PP, β -PP, etc.). Les céramiques TCP (α et β) et HA sont ostéoinductrices, mais les formes BCP (HA/TCP) possèdent des potentiels ostéoinducteurs supérieurs.

- La taille, la quantité ou la forme de l'implant :

L'ostéoinduction a été décrite au contact de biomatériaux de différentes morphologies (blocs macroporeux, granules, particules, etc.). Il semble également que la taille et la quantité des biomatériaux jouent un rôle majeur dans l'ostéoinduction. En effet, Habibovic *et al* ont décrit une ostéogenèse variable en fonction de la taille de l'implant. Plus celle-ci est grande, plus elle favorise la formation osseuse. Cependant, l'effet de taille n'a pas encore été élucidé, les détracteurs de cette hypothèse avancent plutôt la stabilité de l'implant et la concentration des facteurs ostéogéniques au sein du matériau. Ceci pourrait expliquer aussi l'absence d'ostéoinduction chez certains rongeurs et autres petits animaux (rat et souris), puisqu'ils ne peuvent recevoir des implants de taille importante [119, 140, 142, 143].

1.5.3. Corrélation entre le modèle animal et le site d'implantation

L'ostéoinduction observée au contact de céramiques phosphocalciques est dépendante du modèle animal [127, 128, 139, 143, 150]. La formation osseuse ectopique a été décrite chez le lapin > la chèvre > le mouton > le porc > le chien > et le singe (Tableau 4, 5). Actuellement, il n'existe pas de mise en évidence de l'ostéoinduction par les biomatériaux à base de céramique phosphocalcique seules chez le rat, ni la souris. Le phénomène de formation osseuse ectopique par des biomatériaux (HA) a même été observé chez l'homme ce qui indique la capacité ostéoinductrice des phosphates de calcium [151].

Pour obtenir une ostéoinduction évidente, les biomatériaux doivent être implantés en site ectopique (non osseux). Les sites de prédilection sont les tissus mous tel que les muscles et les sites sous cutanés. L'implantation de biomatériaux à base de phosphate de calcium chez la brebis ou la chèvre en site intra musculaire et sous cutané, montre des différences de résultats

entre les sites d'implantations et entre les animaux. Ceci pourrai être lié à l'espèce animale [124, 130].

Tableau 5 : Néoformation osseuse en site musculaire après implantation de BCP dans les muscles de chiens en fonction du temps d'implantation.

% os / Pore							
50 %							
40 %				*	*	*	
30 %				*			
20 %							
10 %				*			
0 %		*	*				
	45j	60j	90j	120j	180j	1 an	2,5 ans

(D'après Huipin Y. Thèse de doctorat, université de Leiden, Pays bas)

I.6. Les mécanismes possibles de l'osté induction par les biomatériaux

Après implantation en sites ectopiques pendant plusieurs semaines, la formation d'un tissu osseux minéralisé a été observée à l'intérieur de céramiques macro microporeuses, pourtant les matériaux n'ont pas été associés à des cellules ou à des facteurs ostéogéniques (cellules souches, BMPs).

Bien que le mécanisme biologique précis menant à l'osté induction par les biocéramiques demeure inconnu, plusieurs groupes ont prouvé que la présence des microstructure de surface est un préalable à la formation d'os ectopique [129, 136]. Cette microporosité située entre les grains de la céramique est liée à la température de frittage relativement basse mais dépend évidemment de la poudre de phosphate de calcium, du processus de fabrication et du temps de frittage. En outre, la microporosité peut influencer la cohésion de la céramique *in vivo* par la dissolution des joints de grains (Figure 11). Cette dissolution est plus importante pour un matériau microporeux qu'un matériau totalement fritté (dense). Une dissolution partielle ou biodégradation du matériau dans le milieu et une sursaturation locale des fluides biologiques en ions minéraux permettant la précipitation d'une apatite biologique à sa surface. Cette couche d'apatite biologique favorisant l'adhésion des cellules ostéoblastes produisant la

matrice extracellulaire osseuse et aussi par l'adsorption des BMPs aux matériaux favorisant l'ostéogenèse [103, 106, 107, 152, 153].

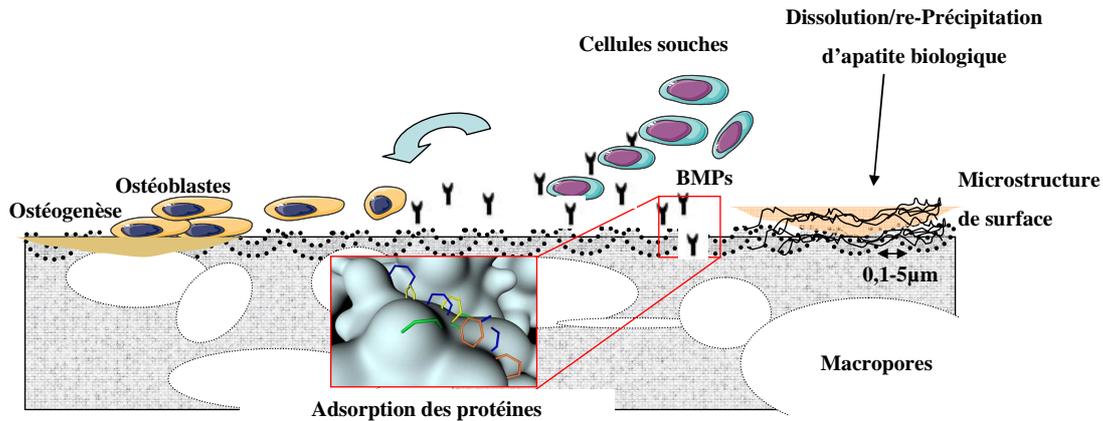


Figure 11 : Ostéoinduction par précipitation d'une apatite biologique et adsorption de BMPs sur la surface d'une céramique à base de phosphate de calcium

Une deuxième hypothèse pourrait expliquer l'ostéoinduction est aussi liée à la microstructure de surface. La dissolution des joints de grains dans les fluides physiologiques peut mener à la libération de microparticules à proximité des biocéramiques [109, 154, 155]. Ces microparticules activeraient des macrophages, des cellules géantes et des lymphocytes (Figure 12). Ces cellules libéreraient des médiateurs cellulaires (cytokines inflammatoires, protéines) qui sont impliqués dans l'ostéogenèse et le remodelage du tissu osseux. Les cellules de la réaction inflammatoire pourraient par ce biais interagir avec les cellules souches circulantes ou sur d'autres types cellulaires (cellules ostéoprogénitrices) afin d'induire leur différenciation en ostéoblastes. La différenciation des cellules souches, la prolifération et l'activation des cellules ostéogéniques permettent d'assurer la production d'une nouvelle matrice osseuse extracellulaire. Cette cascade d'événements biologiques pourrait être semblable à celle qui se produit lors du processus de cicatrisation osseuse après fracture. En effet, les débris et les microparticules d'os minéralisé ont été observés à l'intérieur des fractures osseuses. Ces microparticules sont d'abord dégradées par des macrophages qui sont généralement les premières cellules dominantes qui infiltrent les tissus et par des ostéoclastes [154-157]. Le maintien de la réponse macrophagique est vitale pour la cicatrisation osseuse, celle-ci serait altérée en cas de suppression de l'infiltration par les cellules phagocytaires [158, 159]. Le nettoyage des débris, des cellules mortes et particules environnantes suite à une fracture, est la première étape assurée par les cellules phagocytaires. À ce moment les macrophages phagocytent les particules et libèrent des médiateurs cellulaires (cytokines, protéines). Après

cette libération de cytokines, il y aurait un recrutement de cellules souches par libération de protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) [160, 161]. Champagne *et al*, ont démontré que les macrophages jouent un rôle important dans la cicatrisation osseuse, par leur implication dans la différenciations cellulaire (cellules souches mésenchymateuses) [160]. Aussi sur la formation d'une matrice extracellulaire après libération de protéines morphogénétiques osseuses (BMP-6) par les cellules murines ainsi que la BMP-2 par les cellules humaines et murines [160, 162]. Enfin, les macrophages libèrent des facteurs angiogéniques (VEGF, TNF- α , etc.) et permettent une formation de vaisseaux sanguins [163, 164]. Ces vaisseaux permettent un apport de cellules, de nutriments et de facteurs ostéogéniques par les fluides biologiques.

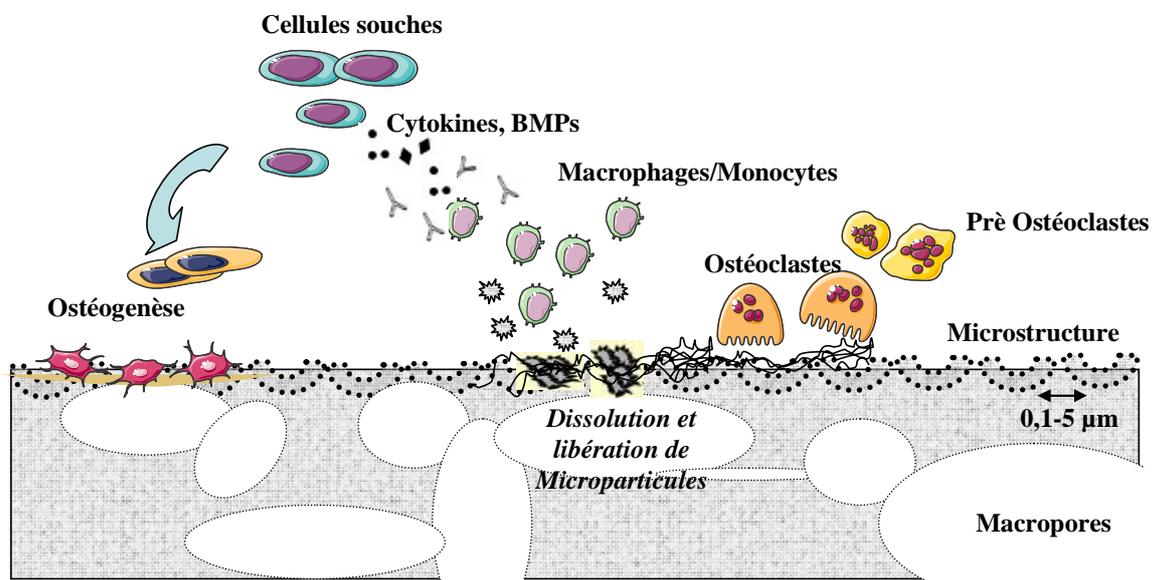


Figure 12 : Ostéoinduction par une céramique phosphocalcique et effet microparticules et rôle de l'inflammation

Conclusion

Les substituts osseux évoluent de manière à remplacer l'autogreffe osseuse par l'acquisition de ses propriétés biologiques et réparatrices. Ils apportent des solutions aux inconvénients liés à son utilisation, à savoir : quantité limitée, difficulté de prélèvement, risques infectieux ainsi que les contraintes liées à leur utilisation proprement dite (rapidité de résorption).

La préparation des matériaux de substitution osseuse doit répondre à un cahier des charges bien précis qui prend en considération les paramètres favorisant l'ostéogenèse (forme : microstructure, macropores; composition : meilleur rapport entre la repousse osseuse et la résorption du matériau). Ces substituts osseux doivent assurer le comblement et la réparation de défauts osseux de tailles importantes qui ne peuvent cicatriser spontanément et conserver la fonctionnalité de la zone à réparer. Ceci passe inévitablement par l'acquisition des propriétés indispensables à un matériau de substitution osseuse : la biocompatibilité, l'ostéoconduction, voir l'ostéoinduction.

L'ostéoinduction par les biomatériaux est un phénomène largement décrit mais le mécanisme biologique reste complexe et non déterminé. Le comportement des céramiques phosphocalciques macro microporeuses dans les milieux biologiques et leur capacité à induire une ostéogenèse en site ectopique peut s'expliquer par différents processus. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation osseuse ectopique. Ces deux mécanismes sont associés à la microstructure des céramiques.

Dans la première hypothèse, la microstructure peut favoriser les phénomènes de dissolution et re-précipitation d'une apatite biologique sur la surface des matériaux. Favorisant la l'attraction, la prolifération et la différenciation de cellules souches circulantes en cellules ostéoprogénitrices.

Le deuxième mécanisme possible de l'ostéoinduction par les biomatériaux pourrait être lié au re-largage de microparticules, due à la dissolution des joints de grain dans les fluides biologiques. Cette libération de microparticules pourrait provoquer une réaction inflammatoire induisant la différenciation des cellules souches en ostéoblastes [165]. Ces

cellules pourraient coloniser la surface de la céramique et produire une matrice extra cellulaire minéralisée et enfin le tissu osseux.

Les objectifs de ce travail

Afin de comprendre les mécanismes biologiques conduisant à l'ostéoinduction par des biomatériaux. Les objectifs de cette thèse sont :

- 1- La préparation et la caractérisation de céramiques phosphocalciques macro et microporeuses par frittage à basse température (900-1100°C).
- 2- L'étude de l'ostéogenèse induite par des céramiques de phosphates de calcium biphasés (BCP) macro microporeuses en site ectopique (musculaire) et dans un défaut fémoral de taille critique chez la chèvre. La comparaison des propriétés ostéogéniques de ces céramiques avec l'autogreffe osseuse.
- 3- L'étude des réactions cellulaires et tissulaires induites par l'implantation de microparticules de BCP. L'effet de ces microparticules sur des macrophages (J774) et des ostéoblastes (MC3T3-E1) *in vitro*.

Chapitre II:

Synthèse et caractérisation de céramiques phosphocalciques macro et microporeuses

II.1. Introduction

II.2. ARTICLE 1:

Synthèse « sol-gel » et caractérisation de céramiques phosphocalciques macro microporeuses

II.3. Discussion

II.1. Introduction

Les phosphates de calcium (CaP) sont les principaux constituants inorganiques des tissus durs chez les vertébrés (les os et les dents). Dans ces tissus biologiques, les cristaux de phosphate de calcium sont intimement associés aux macromolécules telles que le collagène et les protéines formant les composés minéraux et organiques avec d'excellentes propriétés mécaniques [1]. Le tissu osseux est un « matériau vivant » qui est constamment résorbé par l'activité ostéoclastique mais aussi formé par les cellules ostéoblastiques [6]. Bien que l'os soit en mesure de s'auto réparer et de cicatriser dans la plupart des cas, il y a beaucoup d'indications où les substituts osseux sont utilisés afin de reconstituer ses fonctions. Depuis plusieurs années, les chercheurs et les cliniciens essayent de substituer l'os naturel avec des biomatériaux et de comprendre les processus biologiques menant à sa formation.

Les céramiques à base de phosphate de calcium sont de plus en plus employées dans la chirurgie maxillo-faciale et orthopédique comme substituts osseux [98]. Ces céramiques composées d'hydroxyapatite (HA) ou de phosphate tricalcique bêta (β -TCP) ainsi que des combinaisons appelées phosphate de calcium biphasé (BCP) sont biocompatibles, bioactives et ostéoconductrices [92]. Après la mise en place dans les défauts osseux, les biocéramiques se dissolvent en partie dans les fluides biologiques menant à la précipitation d'une apatite biologique sur leur surface [102]. Les Ostéoblastes colonisent et produisent une matrice extracellulaire collagénique qui minéralise pour former le tissu ostéoïde en contact avec la céramique. L'os tissé est graduellement transformé par les cellules ostéoclastiques pour donner un tissu osseux pourvu de fortes propriétés mécaniques. Bien qu'elles présentent des propriétés biologiques favorables, les biocéramiques sont faiblement dégradables et restent pendant plusieurs années dans les défauts sans être complètement substituées par le tissu osseux. En outre, les biocéramiques sont généralement dépourvues de propriétés ostéoinductives pour régénérer le tissu osseux dans des défauts de grande taille ou de taille critique.

La structure de la céramique joue un rôle important dans son ostéointégration [93]. Il a été démontré qu'une porosité ouverte avec des macropores entre 100-800 μm , favorise la

diffusion des fluides biologiques, la colonisation du matériau par les cellules, la vascularisation ainsi que la repousse osseuse. La macroporosité est habituellement obtenue par l'ajout de composés organiques aux poudres de phosphate de calcium compactées. Pendant le frittage, ces composés organiques se décomposent en laissant des pores au sein de la céramique [102]. Le défi actuel est de produire une macroporosité ouverte et interconnectée reliant l'ensemble de la céramique tout en conservant de bonnes propriétés mécaniques pour sa manipulation. La microporosité (pores entre 0,1 et 10 μm), est également un paramètre important puisqu'elle détermine la surface spécifique, permet l'adsorption des protéines, l'attraction des cellules et conditionne les propriétés de dissolution de la céramique. La microporosité est habituellement obtenue par frittage à basses températures (900-1100°C). Il a été précédemment montré qu'une céramique microporeuse est facilement préparée en employant des poudres amorphes avec une faible dimensionnalité (particules submicrométriques) [166, 167]. Plusieurs études ont récemment démontré que des céramiques phosphocalciques microporeuses avaient des propriétés ostéoinductives. Ces céramiques macro microporeuses ont été capables de former un tissu osseux minéralisé à leur contact après leur implantation dans les muscles de grands animaux entre 6 et 24 semaines [127, 129, 168]. Afin d'expliquer ce phénomène, certains auteurs ont proposé que des facteurs de croissance endogènes soient concentrés par des céramiques microporeuses au niveau de leur surface lors du processus de dissolution/précipitation [145, 168]. Ces facteurs de croissance pourraient induire une différenciation des cellules souches circulantes en ostéoblastes qui produisent le tissu osseux. Nous avons émis l'hypothèse que des microparticules libérées par ces céramiques microporeuses frittées à basses températures pourraient induire une réaction inflammatoire qui conduirait à l'ostéogenèse [110, 129, 169]. Cette réaction inflammatoire accompagnée de la libération de cytokines qui pourraient stimuler les cellules souches circulantes à se différencier et donner des cellules ostéogéniques pour former le tissu osseux. Ces processus pourraient être semblables à ceux observés au cours de la cicatrisation des fractures où les débris osseux sont habituellement dégradés par les macrophages et les ostéoclastes [158]. Il a été également démontré que des céramiques microporeuses avaient des propriétés ostéogéniques supérieures à celles des céramiques denses frittées à plus haute température après implantation dans des défauts osseux de taille critique [110, 130].

L'objectif de cette étude est de préparer et de caractériser une céramique macro et microporeuse en employant des poudres de phosphate de calcium amorphes composées de

particules submicrométriques par frittage à des températures relativement basses. Des poudres de phosphate de calcium avec différentes compositions ont été précipitées dans l'éthanol à partir d'un mélange de $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ et de H_3PO_4 . La composition chimique, les phases cristallines et le comportement thermique des précipités ont été étudiés en fonction de la température. Les poudres ont été mélangées avec des billes d'urée, compactées et frittées pour donner une céramique macro microporeuse.

Synthèse « sol-gel » et caractérisation de céramiques phosphocalciques macro microporeuses

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Biomaterialia
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Sol-gel synthesis and characterization of micro- macroporous calcium phosphate bioceramics

Article Type: Full Length Article

Section/Category:

Keywords: Calcium phosphat; sol-gel processing; amorphous powders; sintering; ceramics

Corresponding Author: Dr. Pierre Layrolle,

Corresponding Author's Institution: French Institute for Health and Medical Research

First Author: Borhane-Hakim FELLAH, DVM

Order of Authors: Borhane-Hakim FELLAH, DVM; Pierre Layrolle

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Amorphous calcium phosphate powders were precipitated from calcium metal and phosphoric acid in ethanol. Depending on the quantity of reagent, the CaP powders had different chemical compositions and, after heating, formed beta-tricalcium phosphate (β -TCP), hydroxyapatite (HA) or BCP mixtures. Dilatometric measurements indicated that shrinkage of compacted CaP powders occurred first at around 650°C and continued up to 1200°C. The amorphous CaP powders were mixed with urea beads, compacted under isostatic pressure at 1400 bars and sintered at 1050°C for 5 hours. Scanning electron microscopy indicated that macro- microporous ceramics were produced. The ceramics had spherical macropores of 700-1200 μ m in diameter with limited interconnections and a macroporosity of 42% as determined by microcomputed tomography. The micropores ranged from 0.1-1 μ m in diameter. These macro- microporous HA, β -TCP or BCP ceramics can be used as bone fillers.

**Sol-gel synthesis and characterization of micro- macroporous
calcium phosphate bioceramics**

Borhane H. Fellah, Pierre Layrolle*

INSERM, U791, Laboratory for osteoarticular and dental tissue engineering
Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, France

*Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 20; fax: +33 2 40 41 37 12.

E-mail address: pierre.layrolle@nantes.inserm.fr (Prof. P. Layrolle).

Abstract

Amorphous calcium phosphate powders were precipitated from calcium metal and phosphoric acid in ethanol. Depending on the quantity of reagent, the CaP powders had different chemical compositions and, after heating, formed beta-tricalcium phosphate (β -TCP), hydroxyapatite (HA) or BCP mixtures. Dilatometric measurements indicated that shrinkage of compacted CaP powders occurred first at around 650°C and continued up to 1200°C. The amorphous CaP powders were mixed with urea beads, compacted under isostatic pressure at 1400 bars and sintered at 1050°C for 5 hours. Scanning electron microscopy indicated that macro- microporous ceramics were produced. The ceramics had spherical macropores of 700-1200 μm in diameter with limited interconnections and a macroporosity of 42% as determined by microcomputed tomography. The micropores ranged from 0.1-1 μm in diameter. These macro- microporous HA, β -TCP or BCP ceramics can be used as bone fillers.

Keywords: calcium phosphate, sol-gel processing, amorphous powders, sintering, ceramics

Introduction

Calcium phosphates (CaP) are the principal inorganic constituents of hard tissues in vertebrates (bones and teeth). In these biological tissues, CaP crystals are intimately associated with macromolecules such as collagen and proteins, forming mineral-organic composites with excellent mechanical properties [1]. Bone tissue is a 'living material' as it is constantly resorbed by osteoclastic activity and formed by osteoblastic cells [2]. Although bone is able to repair and heal itself in most of the cases, there are many indications where biomaterials are needed in order to restore its function. For many years, scientists have attempted to mimic this natural material or the biological processes leading to its formation.

CaP ceramics are used increasingly as bone substitutes in orthopaedic and maxillofacial surgery [3]. These ceramics, composed of hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP) and combinations known as biphasic calcium phosphate (BCP) are biocompatible, bioactive and osteoconductive [4]. After filling a bone defect, these bioceramics partly dissolve into body fluids leading to the precipitation of biological apatite on to their surface [5]. Osteoblast cells colonise and produce the collagenous extracellular matrix that mineralises to form osteoid tissue in contact with the ceramic filler. The woven bone is gradually remodelled by osteoclastic cells into mechanically strong bone tissue. Although they have good biological properties, bioceramics degrade poorly and remain in the body for several years, as they are not completely replaced with bone tissue. Furthermore, bioceramics generally lack the osteoinductive properties needed to regenerate large bone defects.

The structure of ceramics plays a critical role in their osteointegration [6, 7]. It has been shown that open porosity with macropores ranging from 100-800 μm favours body fluid invasion, cell colonisation, vascularisation and bone tissue ingrowth. The macroporosity is usually obtained by introducing organic compounds into the compacted green bodies. During sintering, these organic

compounds burn out, forming pores in the CaP ceramic [5]. The challenge is to produce open, interconnected porosity while maintaining sufficient strength for handling. Microporosity with pores in the 0.1-5 μm range is also an important parameter, as it determines the surface area, protein adsorption and dissolution properties of bioceramics. Microporosity is usually obtained by using low sintering temperatures. We have already shown that microporous CaP ceramics are easily prepared by using CaP powders that have poor crystallinity or are amorphous, and which are composed of nanometer-sized particles with high surface energy [8, 9].

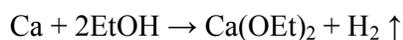
Several studies have recently demonstrated that microporous CaP ceramics exhibit osteoinductive properties as they are able to form mineralised bone tissue within 6-24 weeks after implantation into the muscles of large animals [10-12]. It has been postulated that these microporous ceramics concentrate endogenous bone growth factors on their surface through a dissolution-precipitation process [10, 13]. These growth factors may induce the differentiation of circulating stem cells into osteoblasts that produce bone tissue. We have hypothesised that micro-particles released from poorly sintered ceramic leads to an inflammatory reaction with the release of cytokines that may trigger circulating stem cells to form bone tissue [11, 14, 15]. The process may be similar to that observed in the healing of fractures where bone debris are usually degraded by macrophages and osteoclasts [16]. It has been shown that microporous ceramics have superior osteogenic properties than dense ceramics when implanted in critical-sized bone defects [17, 15].

The purpose of this study was to prepare and characterise macro- and microporous ceramics by using nanometer-sized, amorphous CaP powders at a relatively low sintering temperature. CaP powders with different compositions were precipitated in ethanol by mixing $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ and H_3PO_4 . The chemical composition, crystal phases and thermal behaviour of the precipitates were studied as a function of temperature. The powders were mixed with urea beads, compacted and sintered into macro- microporous ceramics composed of HA, β -TCP or BCP.

Materials and methods

Sol-Gel synthesis of calcium phosphate powders

Calcium metal (99 %, Aldrich) and phosphoric acid crystals (98+ %, Aldrich) were used for the preparation of calcium phosphate powders [8]. All the experiments were performed using conventional glassware with vacuum manifolds for air-sensitive products. The calcium diethoxide $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ was prepared by reacting the appropriate amounts of calcium metal with pure ethanol according to the following reaction:



Several precautions were taken during the synthesis of the $\text{Ca}(\text{OEt})_2$. The most important was to exclude moisture and air because $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ is very moisture- and air-sensitive. The glassware, calcium metal, and ethanol used were dried. These measures were to prevent the precipitation of the hydrolysed product, i.e., $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and the carbonate salt, i.e., CaCO_3 . The appropriate amount of calcium metal shavings (5.1 g; 0.128 mole) and 400 mL of dry ethanol were put in a 1000-mL, three neck, round bottom flask with a heater-magnetic stirrer and a condenser in a vacuum. The ethanol was refluxed for 4 h until all the metallic calcium had disappeared. A solution of orthophosphoric acid was prepared by dissolving the appropriate amounts of anhydrous H_3PO_4 crystals (7.4-8.7 g; 0.075-0.088 mole) in 200 mL of dried ethanol with stirring at room temperature. Given these amounts of calcium metal and phosphoric acid, the molar Ca/P ratios ranged from 1.45 to 1.70. These different Ca/P molar ratios corresponded to those of tricalcium phosphate (TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; Ca/P=1.5), hydroxyapatite (HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; Ca/P = 1.67) and mixtures of HA/TCP known as biphasic calcium phosphate (BCP). The orthophosphoric solution was added quickly through a nozzle to the vigorously stirred calcium ethoxide solution. A gelatinous white precipitate of calcium phosphate was immediately obtained. This precipitate

was stirred for 10 min with refluxing. After cooling, the excess ethanol was removed by evaporating in a vacuum (Büchi, rotavap). The precipitate was dried in a vacuum at room temperature overnight and crushed in an agate mortar. About 20 g of a fine white powder was obtained for each batch.

Characterisation of the calcium phosphate powders

All batches of CaP powder were analysed by X-ray diffraction and infrared spectroscopy before and after heating an aliquot of 1-2 g at 1000°C for 5 hours in air. Powder X-ray diffraction (XRD, Philips PW 1830) was performed using a CuK α source operated at 40 kV and 30 mA. The XRD patterns were recorded from 3 to 60° in 2theta with a step angle of 0.02°. XRD traces were compared to JCPDS standard files (HA #9-432, β -TCP #9-169). After checking the absence of other CaP phases, the quantities of HA and β -TCP phases were measured by the respective intensities of their 100% diffraction lines according to the ISO 10993-1 standard. The experimental HA/ β -TCP weight ratios and Ca/P atomic ratios were calculated and plotted against the theoretical Ca/P molar ratios. Infrared (IR) spectra were obtained over the 4000-400 cm⁻¹ region using an FTIR, Nicolet, Magna-IR 550 spectrometer. Transparent pellets were made by compacting at 14 tons about 1 mg of the sample mixed and crushed in an agate mortar with 300 mg of potassium bromide (KBr, Prolabo, spectroscopic grade). Thermogravimetric and differential thermal analyses (TGA, DTA) were performed on a Netzsch TG 209 thermobalance in the 20-800°C temperature range at heating rates of 10°C min⁻¹ in air (flow 1 l/h) with about 20 mg of the dried powder in cylindrical platinum crucibles. Dilatometric measurements (Netzsch, Proteus) were performed using pellets measuring 10 mm in diameter and 1 mm in thickness with 200 mg of CaP powder pressed at 1000 kg/cm². Shrinkage dL/Lo was measured from 20 to 1300°C using a heating rate of 10°C/min in air.

Preparation of the macro- microporous calcium phosphate ceramics

Porous ceramics were obtained using spherical urea beads (Yara) with a diameter of 700-1200 μm . The quantities of CaP powder and urea beads were determined using a volumetric graduated flask for macroporosity of around 30% in volume. The CaP powder and urea beads were shaken for one night to homogenise the mixture. The powder was transferred to a high-pressure chamber and compressed at 1400 bar for 5 minutes. The resulting blocs were sintered at 1100°C for 5 hours (heating/cooling rate 2°/ min) in a muffle furnace (Nabertherm, Germany).

Specific Surface Area Measurements

The specific surface areas were determined by the single-point Brunauer-Emmett-Teller (BET) method using nitrogen adsorption/desorption with Quantasorb I1 Quantachrome, Greenvale, NY apparatus. About 30 mg of the sample was weighed in a special tube, and it was placed in an oven at 100°C for 1 h. Then, the powder was degassed with a helium/nitrogen mixture for 1 h. The precision of the specific surface area measurements was 5%.

Scanning Electron Microscopy

Particle sizes were measured using a JEOL JSM-6400 scanning electron microscope. For SEM observations, the powder was ultrasonically dispersed for 5 min in ethanol. The suspension was then deposited on a carbon support, dried in a vacuum, and metallized with Ag for 1-2 min.

Microtomography

After sintering, the CaP blocs were analysed with X-ray microcomputed tomography (SkyScan 1072, Belgium). The X-ray source was operated at a voltage of 100 kV and current of 98 μA . The sample was rotated through 180° with a rotation step of 0.90°, an acquisition time of 5.6 s per

scan and a pixel size of 11.8 μm . Three-dimensional reconstructions were then made with 3D Creator SkyScan software.

Results

1) Sol-gel synthesis and characterisation of the CaP powders

CaP powders were precipitated in ethanol by adding H_3PO_4 to the $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ solution. The basic calcium diethoxide neutralised the o-phosphoric acid to form a gelatinous CaP precipitate. Figure 1 exhibits the correlation between the molar ratio of reagents and the composition of CaP powders obtained by precipitation in ethanol and heating at 1050°C . As shown in Figure 2a, the XRD patterns of the CaP precipitates were typical of an amorphous calcium phosphate (ACP). The diffraction patterns revealed a broad halo around 30° in 2θ and no crystalline phase other than ACP was detected. After heating at 1050°C , the amorphous precipitates converted into beta-tricalcium phosphate (β -TCP), biphasic calcium phosphate (BCP) or hydroxyapatite (HA) depending on the Ca/P ratio of the reagents. The XRD patterns for β -TCP and HA were in good agreement with the JCPDS cards #9-169 and #9-432, respectively. No other crystalline phases were detected with XRD. A mixture of HA and β -TCP phases, known as biphasic calcium phosphate (BCP), formed for intermediate ratios of reagents. The XRD pattern corresponding to the particular HA/ β -TCP ratio of BCP 50/50 is shown in Figure 2c. Other HA/ β -TCP ratios or BCP compositions (e.g. 20/80, 60/40, 80/20) were prepared depending on the ratio of the initial chemicals (data not shown). The FTIR spectra of CaP precipitates corroborated the previous XRD results (Figure 3). Broad one-component bands at 1060 and 570 cm^{-1} which were assigned to the ν_3 and ν_4 P-O vibration modes of PO_4 were observed. Absorption bands at 1490 , 1430 and 870 cm^{-1} corresponding to the ν_3 and ν_2 C-O mode of the CO_3 groups were also detected in the ACP precipitates (Figure 3a). Hydrogen-bound ethanol molecules were present as evidenced by strong, broad peaks at 3390 and 1590 cm^{-1} . These featureless bands were typical of phosphate and carbonate groups in a disordered environment or amorphous solid. After heating at 1050°C , the FTIR spectra were typical of β -TCP, HA and mixtures of the two, such as BCP 50/50 (Figures 3b-d). Well-defined, strong phosphate bands were observed at 1120 , 1044 , 1020 , 970 ,

943, 606 and 551 cm^{-1} in the FTIR spectrum of β -TCP (Figure 3b). Similarly, the spectrum of HA had characteristic bands at 3572 and 632 cm^{-1} corresponding to O-H groups located in the apatite channels (Figure 3c). The phosphate peaks located at 1090, 1043, 962, 602, 572 cm^{-1} were also in good agreement with typical FTIR spectra for HA. Corroborating previous XRD observation, the BCP 50/50 exhibited FTIR peaks corresponding to a mixture of HA and β -TCP phases (Figure 3d). In all the heated solids, the intensity of the large bands at 3400 and 1600 cm^{-1} , which was attributable to O-H vibration modes, diminished. As shown in Figure 3, the chemical compositions of the CaP precipitates were in good accordance with the Ca/P ratio of the reagents. Although these precipitates were difficult to characterise because of their amorphous state, they converted into the expected CaP phases after heating at 1050°C. The chemical composition of the final CaP phase was in good agreement with the ratio of $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ and H_3PO_4 reagents used in the synthesis. The thermal behaviour of these amorphous CaP precipitates is shown in Figure 4. TGA curves of the 3 powders show a continuous weight loss of about 15-20%. The initial weight loss in the temperature range 35-500°C corresponded to the evaporation, desorption and burning of the residual EtOH solvent. The decomposition of carbonate into CO_2 gas occurred from 500 to 850°C and explained the second weight loss. We observed, in the DTA curves of the CaP precipitates, endothermic drifts corresponding to the weight losses and exothermic peaks at around 600-700 °C, indicating the onset of crystallisation. The sintering properties of these ACP precipitates were then studied using dilatometric measurements. The compacted powders' 'green bodies' exhibited similar shrinkage curves as a function of temperature (Figure 5). In the 25-250°C range, an initial step corresponding to shrinkage of about 7% was observed. Linear and progressive shrinkage were then measured up to 600-650°C, where a second step was noticed. This shrinkage coincided with the crystallisation temperature of ACP. A large sigmoid with an inflexion point at around 1100°C was finally observed. At 1300°C, the shrinkage reached a

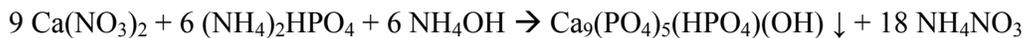
maximum of approximately -25, -30 and -35% for the compacted ACP powders that converted into HA, BCP50/50 and β -TCP, respectively.

2) Characterisation of macro- microporous CaP ceramics

The ACP powders were mixed with 30 %vol. of urea beads measuring 700-1200 μm in diameter. After compaction and heating at 1050°C, the green bodies converted into macroporous ceramics. During sintering, the urea decomposed in the 50-500°C range into ammonia and carbon dioxide gas leaving macropores in the ceramic. Figure 6 shows a microtomography image of the resulting ceramic. The porosity was regular with spherical pores of about 1000 μm in diameter. These pores were poorly interconnected. The porosity of the ceramic was around 42 %, as determined by microtomography. SEM observations corroborated the μCT characterisation of the ceramics (Figure 7). The macropores had a spherical morphology with a diameter of around 1100 μm (Figure 7a). The microstructures changed depending on the final composition. After heating at 1050°C, the β -TCP ceramic exhibited a microporous structure (Figure 7b). The grains had joined by their concave neck, leaving a network of open micropores throughout the entire ceramic. HA ceramic had a denser structure with less microporosity than the β -TCP ceramic (Figure 7d). The BCP 50/50 had intermediate behaviour with few remaining micropores (Figure 7c).

Discussion

HA and β -TCP bioceramics are usually manufactured starting from well-characterised CaP powders, mixed with pore makers and sintered at high temperatures (e.g. 1000-1300°C) [18]. Both the chemical and physical pore structure of bioceramics are obviously crucial for ensuring an adequate biological response following implantation into bone tissue. There are numerous methods for precipitating CaP powders from aqueous solutions [8, 18-21]. Calcium phosphate powders are traditionally precipitated from aqueous solutions in basic media. R. LeGeros has proposed synthesis methods involving the hydrolysis of monetite (CaHPO_4), brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) or octacalcium phosphate (OCP, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) into calcium deficient apatite (CDA) [19]. The conversion of the soluble CaP compound into CDA is favoured by the thermodynamic stability of the apatite phase in basic media. Nevertheless, it is difficult to control the composition of the resulting CDA as it depends on a wide range of factors (temperature, pH, quantity of reagents and water). Mixing calcium and phosphate solutions in the presence of a base is another method for precipitating CDA. However, the counter ions of the initial salts (e.g. chlorine, sodium) may be incorporated into the apatite structure, even after washing the precipitate. For this reason, Heughebaert *et al.* developed a precipitation method using calcium nitrate, ammonium phosphate and ammoniac [20]. The CDA is precipitated in aqueous media in accordance with the reaction:



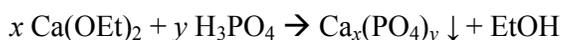
In this double decomposition method, the counter ions (ammonium nitrate) are not incorporated into the apatite lattice, but rather adsorbed on to the CaP precipitates and eliminated by washing with water or heating at more than 400°C. CDA crystals have poor crystallinity, with particles of submicron dimensions often agglomerated into larger grains. Upon heating at 800°C, this

particular composition of CDA leads to a pure beta-tricalcium phosphate phase according to the chemical reaction:



Besides this specific case, CDA with various compositions can be precipitated in an aqueous solution. Again, controlling the composition of the CDA precipitate is related to several parameters, such as salt concentrations, pH, temperature, rate of mixing, etc. Depending on these parameters, the composition of the CDA may vary, leading to mixtures of β -TCP and HA phases when heated at more than 800°C. Other groups have precipitated CaP starting from calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) and phosphoric acid (H_3PO_4) in aqueous media. As calcium hydroxide is not very soluble in water, this method has led to heterogeneous CaP precipitates containing calcium-rich domains. During sintering, this chemical heterogeneity may form different phases leading to different local bioactivity following implantation of the ceramics into bone tissue.

The present precipitation method for CaP compounds in ethanol has several advantages over conventional synthesis methods. As shown in Figure 1, the chemical composition of the CaP precipitates was easily controlled by changing the molar ratio of the reagents. In the present method, the basic calcium source neutralised the phosphoric acid, precipitating a calcium phosphate gel with ethanol as the sole by-product:



Unlike synthesis carried out in aqueous media, the CaP precipitates obtained in ethanol were therefore not contaminated with counter ions. Another advantage of the present method is related to the amorphous state of the CaP powders (Figures 2 and 3). The lower dielectric constant of

ethanol ($\epsilon_{\text{EtOH}} = 24.3$ at 25°C) compared to water ($\epsilon_w = 78.5$ at 25°C) led to a strong decrease in the solvation of ions and the solubility of the CaP compounds in ethanol. Unlike the precipitation in aqueous media, the first germs formed in ethanol did not organise or grow to form the crystalline CDA structure, but rather formed amorphous solids composed of submicrometer particles. We have shown that these amorphous powders had high thermal reactivity with crystallisation at around $600\text{-}700^\circ\text{C}$, accompanied by active grain growth, shrinkage and active surface diffusion [8, 9, 21]. In the present study, we also observed linear shrinkage starting at around 650°C and ending at around 1200°C (Figure 5). Shrinkage was around 25% regardless of the composition of the precipitated CaP powder in ethanol and comparable with previous work [21].

For the purpose of making macro- and microporous ceramics, the CaP powders were mixed with urea beads, compacted and sintered at 1050°C . Several studies have shown that ceramics should have open porosity with macropores ranging from $100\text{-}800\ \mu\text{m}$ to allow body fluid invasion, cell colonisation, vascularisation and bone tissue ingrowth. The macroporosity of the ceramic bone filler should be interconnected in order to make possible bone healing from the edges towards the centre of the filled defects [22]. In the field of bone tissue engineering, the interconnection of macropores is also highly relevant in order to ensure uniform cell seeding, proliferation and the permeability of the culture medium [24]. The interconnection of macropores is therefore highly relevant for body fluid invasion, colonisation of cells, bone ingrowth and vascularisation. In the present study, we successfully produced spherical macropores of $700\text{-}1200\ \mu\text{m}$ in diameter (Figure 7a). The porosity was around 40%. However, microcomputed tomography indicated that these macropores were poorly interconnected. Our attempts to increase the quantity of macropores and interconnection by adding more urea beads were not successful as the ceramics became very brittle. Some authors have used double porogens (e.g. naphthalene, sugar) in order to produce high porosity with interconnection after heating [23]. Others have used two

immiscible phases, polymerising methacrylate and HA aqueous slurry, in order to generate interconnected networks of pores after burning and sintering [24]. Hydrogen peroxide has also been mixed with CaP [25]. After drying at more than 80°C, the decomposition of hydrogen peroxide produced oxygen bubbles in the CaP green body prior to sintering. Another property that conditions the bioactivity of ceramics is related to microporosity. It has been shown that microporous ceramics enhance bone formation in comparison to dense ceramics in critical-sized bone defects [26, 15]. Recent studies have even demonstrated that some microporous ceramics may induce ectopic bone formation after implantation for several weeks in the muscles of various animals [12, 27-29]. The microporosity of ceramics is related to both the reactivity of the initial powders and the sintering temperature. In the present study, the ACP powders led to highly microporous ceramics after sintering at a relatively low temperature (e.g. 1050°C). We observed a strong surface diffusion, with the formation of a concave neck at the joint boundaries after heating. This surface diffusion began at around 650°C, which corresponds to the crystallisation of the amorphous powders. As a result of the active grain growth, highly microporous ceramics were obtained at a temperature that was relatively low compared with starting with conventional crystalline powders.

Conclusion

This study demonstrated that amorphous calcium phosphate powders with controlled compositions could easily be precipitated in ethanol using a sol-gel method. These powders were highly reactive, showing active grain growth, surface diffusion and shrinkage starting at around 650°C, a temperature that corresponded to their crystallisation into β -TCP, HA or BCP. The amorphous CaP powders were mixed with urea beads, compacted and directly sintered into macro- microporous ceramics at a relatively low temperature. However, the interconnection of

the macropores will have to be improved if these ceramics are to be used as synthetic bone substitutes.

Acknowledgements

Borhane Fellah was supported by a PhD fellowship awarded by the Regional Council of the Pays de la Loire and the French State Department for Research. The authors thank Dr Franck Tancret, Prof. Jean-Michel Bouler for helping with TGA and dilatometric measurements and Kirsty Snaith for grammar corrections of the manuscript.

References

- [1] Derkx P, Nigg AL, Bosman FT, Birkenhager-Frenkel DH, Houtsmuller AB, Pols HA, van Leeuwen JP. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone* 1998;22:367.
- [2] Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus* 2002;13:e2.
- [3] Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans* 2006:5211.
- [4] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S20.
- [5] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19:1473.
- [6] Gauthier O, Goyenvallé E, Bouler JM, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:385.
- [7] Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *J Orthop Res* 2006;24:628.
- [8] Layrolle P, Lebugle A. Characterization and Reactivity of Nanosized Calcium Phosphates Prepared in Anhydrous Ethanol. *Chem. Mater.* 1994;6:1996.
- [9] Layrolle P, Lebugle A. Synthesis in Pure Ethanol and Characterization of Nanosized Calcium Phosphate Fluoroapatite. *Chem. Mater.* 1996;8:134.
- [10] Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26:3565.
- [11] Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:7.
- [12] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36:1086.

- [13] Ripamonti U, Crooks J, Kirkbride A. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *South African Journal of Science* 1999;95:335.
- [14] Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:287.
- [15] Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 2008;29:1177.
- [16] Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975;78:71.
- [17] Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:747.
- [18] De Groot k. *Bioceramics of calcium phosphate*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1983.
- [19] LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991;15:1.
- [20] Heughebaert JC, Montel G. Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate. *Calcif Tissue Int* 1982;34 Suppl 2:S103.
- [21] Layrolle P, Ito A, Tateishi T. Sol-Gel synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite Bioceramics. *J Am Ceram Soc* 1998;81:1421.
- [22] Li SH, De Wijn JR, Layrolle P, de Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;61:109.
- [23] Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, Merle C. Biphasic calcium phosphate: A comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;84:1.
- [24] Shihong LI, Wijn JRD, Jiaping LI, Layrolle P, De Groot K. Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tiss. Eng* 2003;9:535–548.
- [25] Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martinez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials* 2004;25:3671.

- [26] Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 2006;24:867.
- [27] Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:139.
- [28] Yuan H, Van Den Doel M, Li S, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1271.
- [29] Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:25.

Figure captions

Figure 1: Correlation between the molar ratio of $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ and H_3PO_4 reagents and the atomic Ca/P ratio of the powders obtained.

Figure 2: XRD patterns of amorphous calcium phosphate powders (a) as precipitated in ethanol and after heating at 1050°C for 5 h in air, (b) β -TCP, (c) BCP 50/50 and (d) HA.

Figure 3: FTIR spectra of the sol-gel synthesised ACP powders (a) and after heating at 1050°C for 5 h in air, (b) β -TCP, (c) BCP 50/50 and (d) HA.

Figure 4: TGA-DTA profiles of the ACP powders that converted into β -TCP, BCP 50/50 and HA upon heating.

Figure 5: Linear shrinkage of the compacted ACP powders that converted into β -TCP, BCP 50/50 and HA upon heating.

Figure 6: Microcomputed tomography image of the macroporous ceramic obtained after mixing ACP powders with urea beads, compaction and sintering at 1050°C for 5 h in air.

Figure 7: SEM micrographs of macro- microporous CaP ceramics sintered at 1050°C for 5 hours in air. (a) Low magnification image showing spherical macropores and high magnification images showing the microstructure of (b) β -TCP, (c) BCP 50/50 and (d) HA.

Figure 1

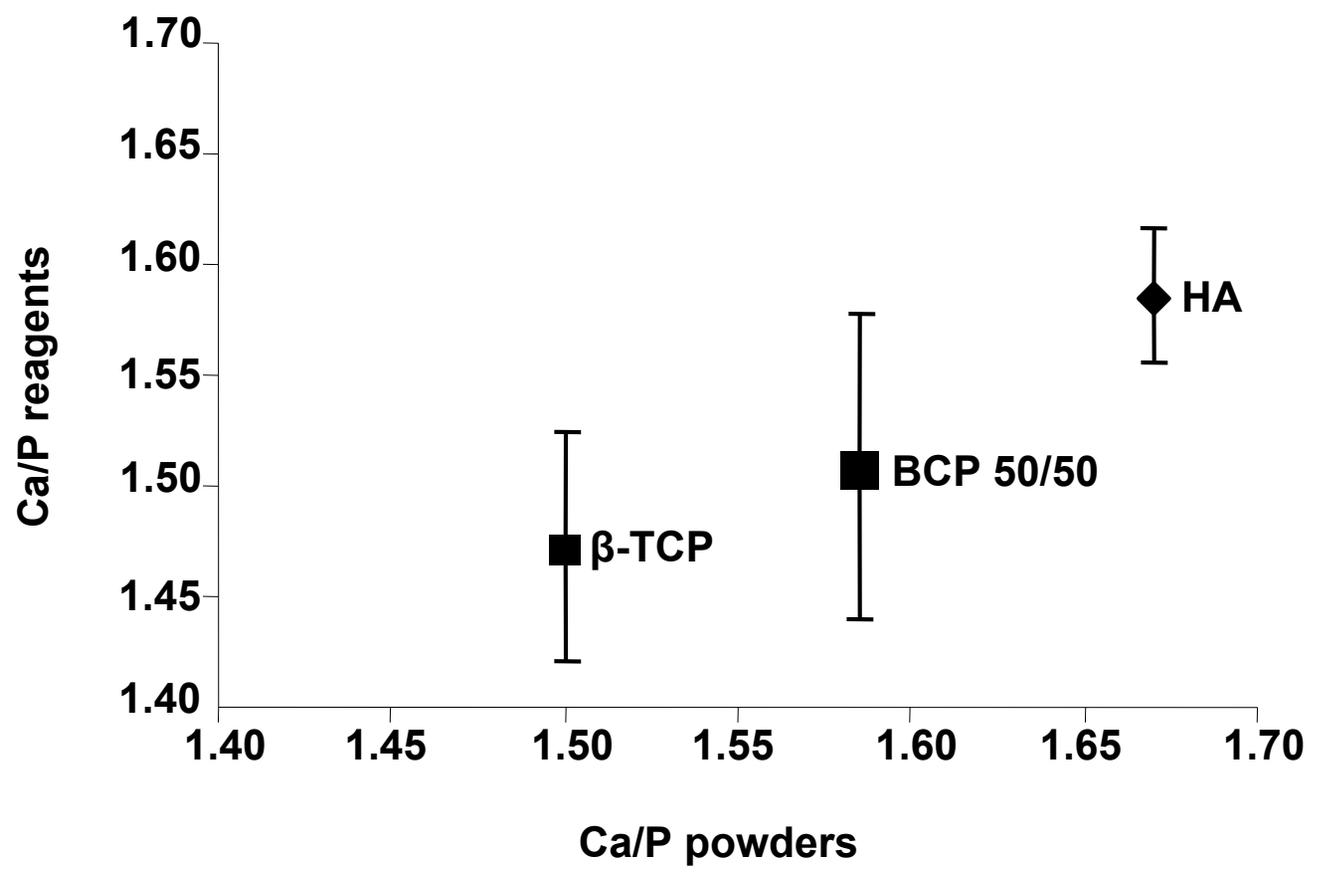


Figure 2

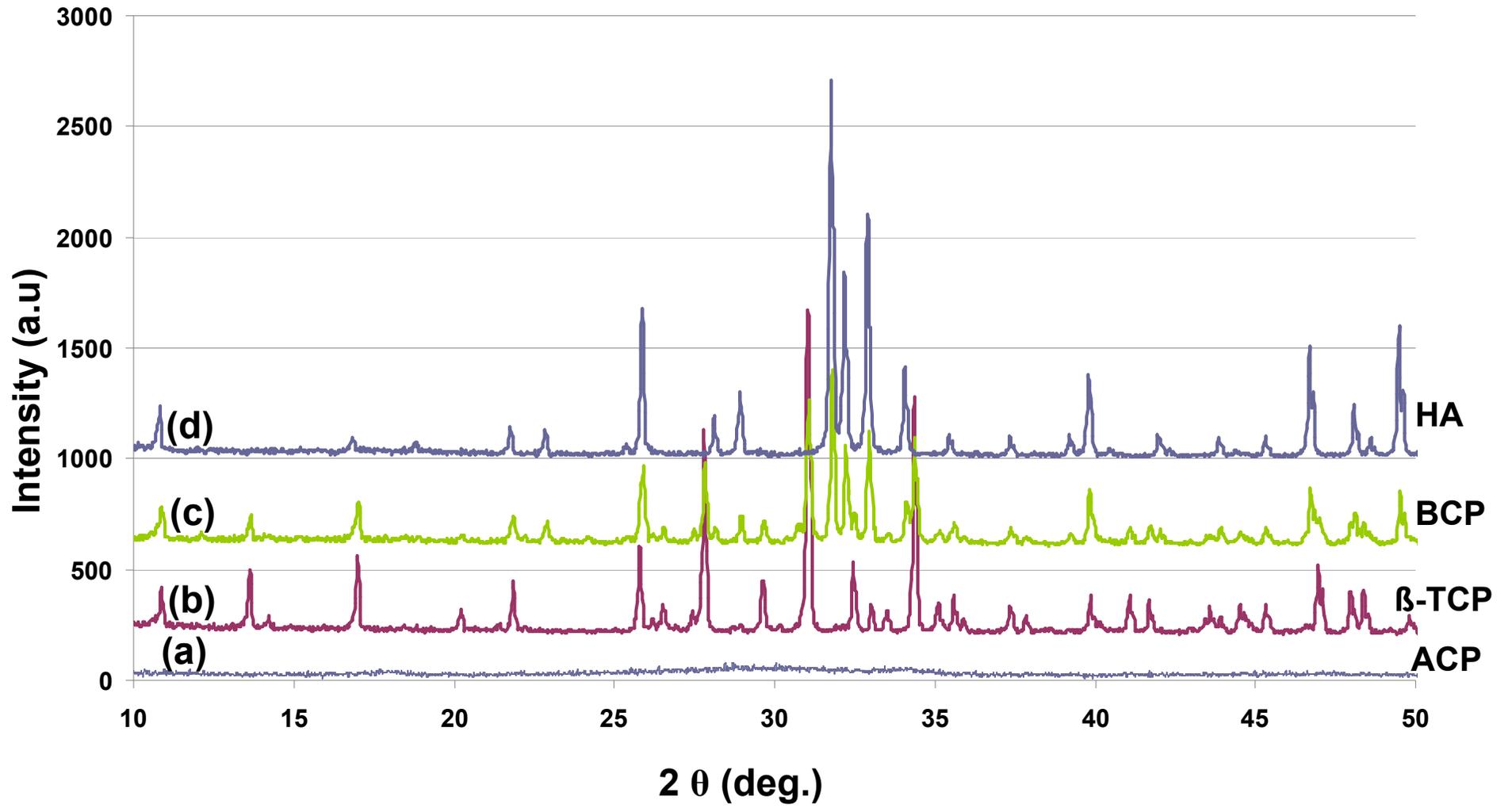


Figure 3

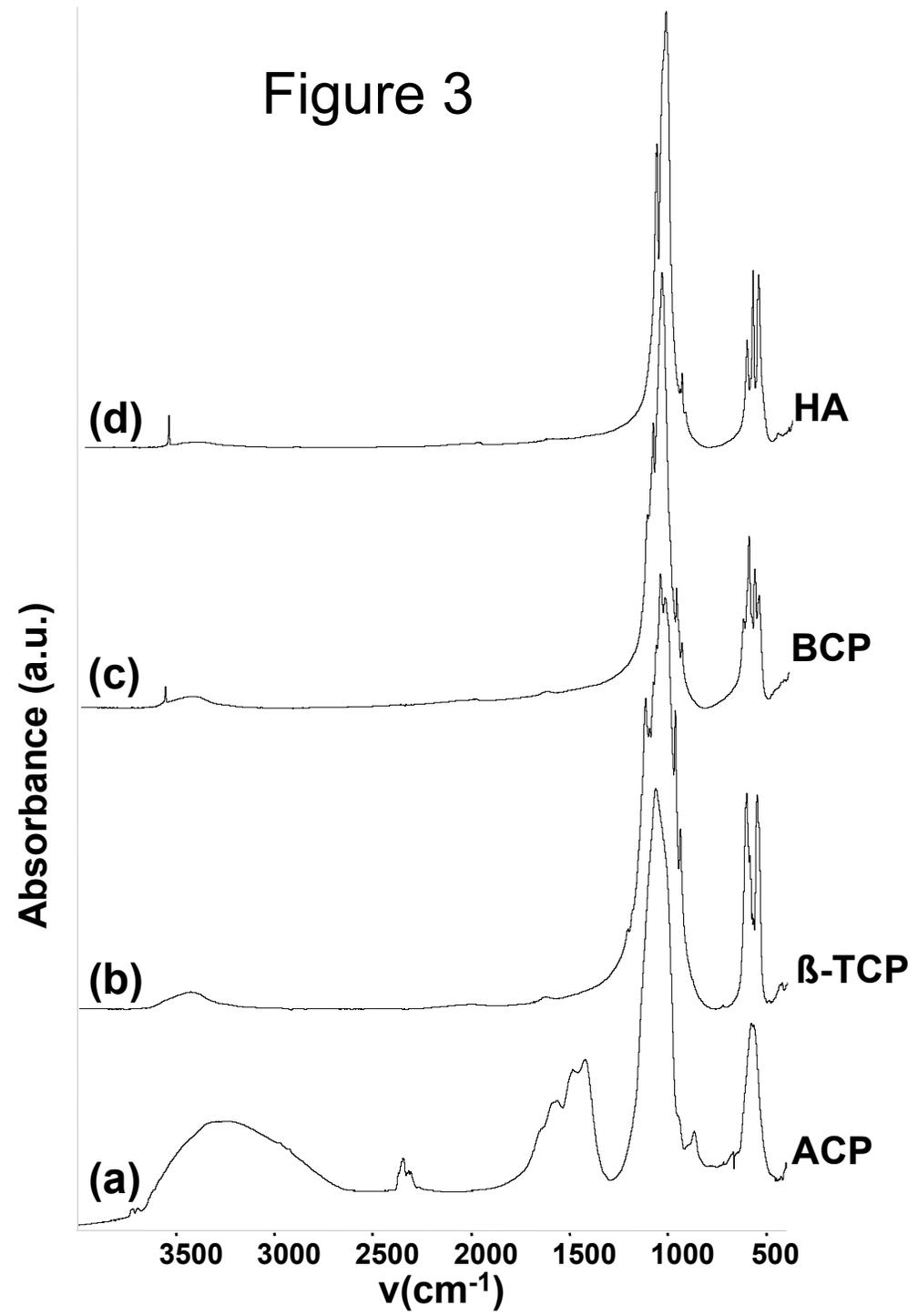


Figure 4

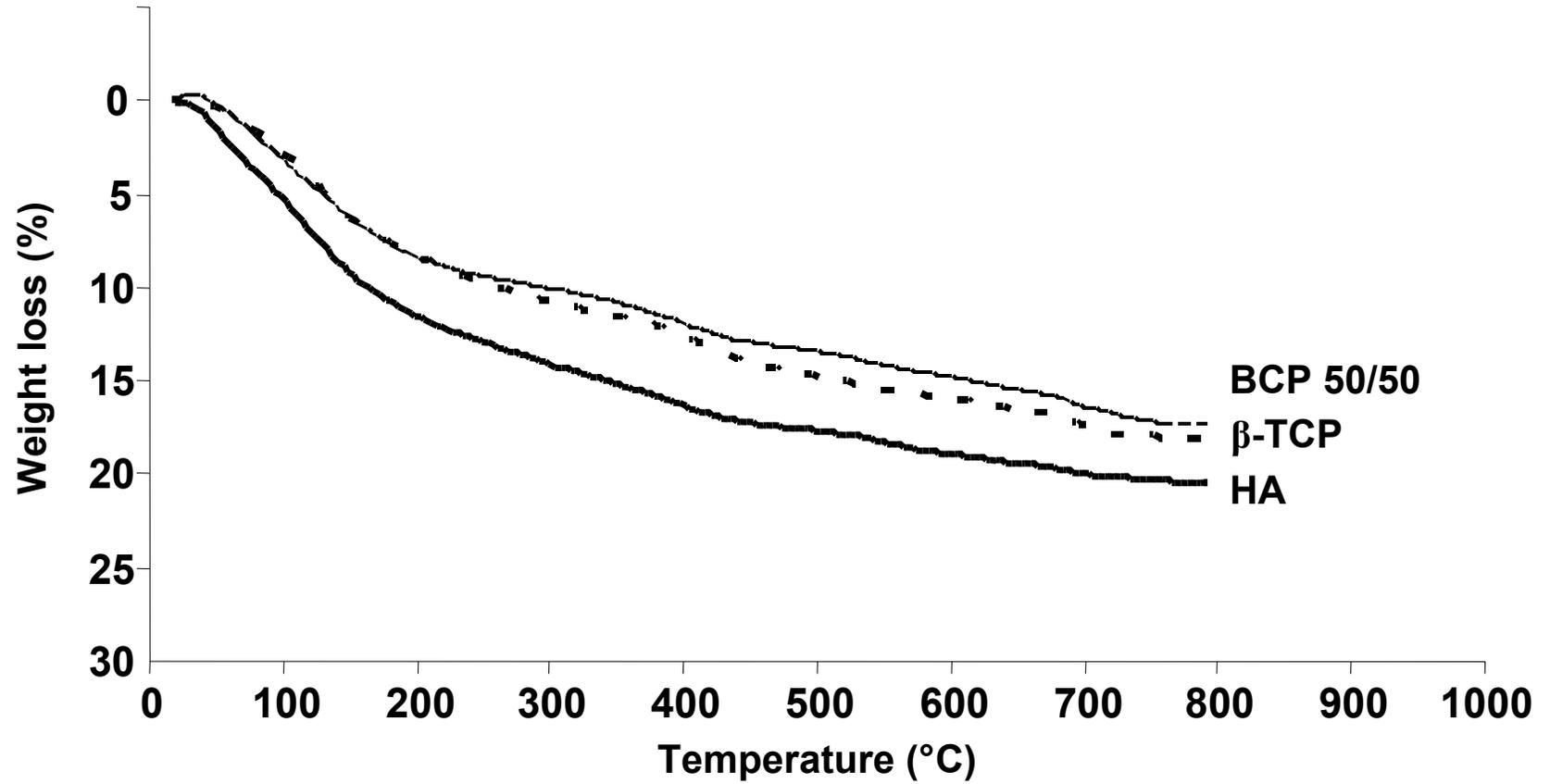


Figure 5

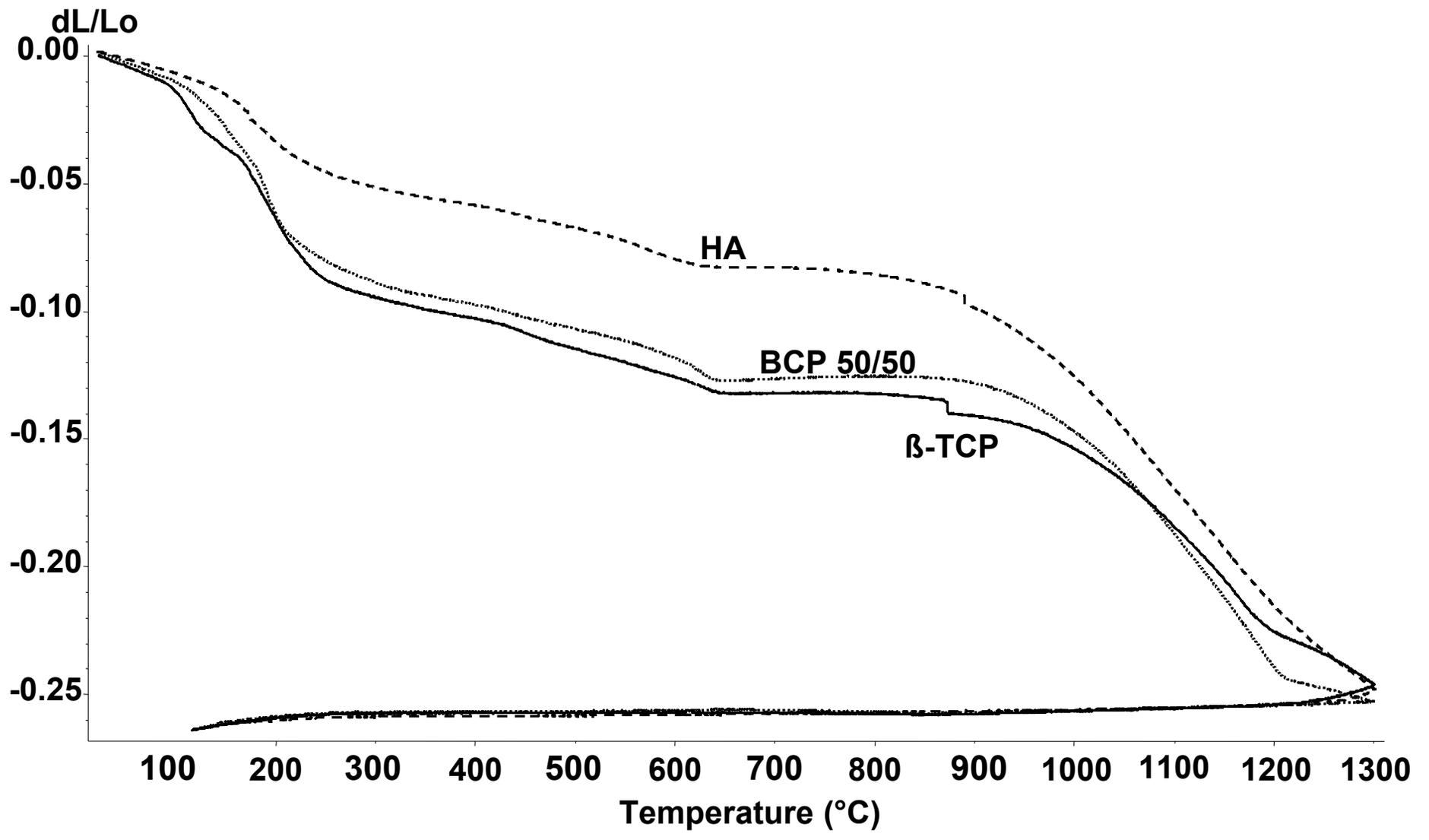


Figure 6

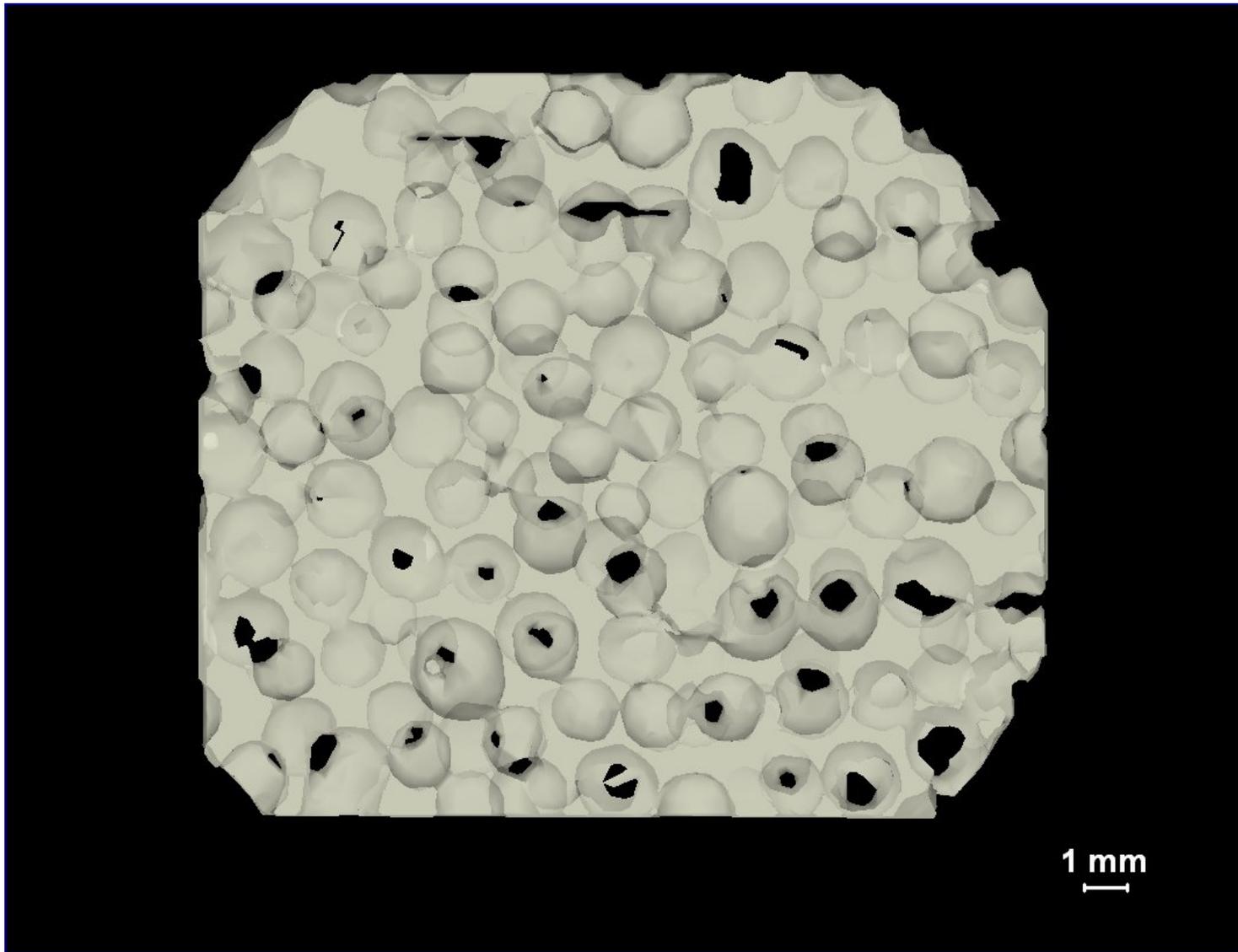
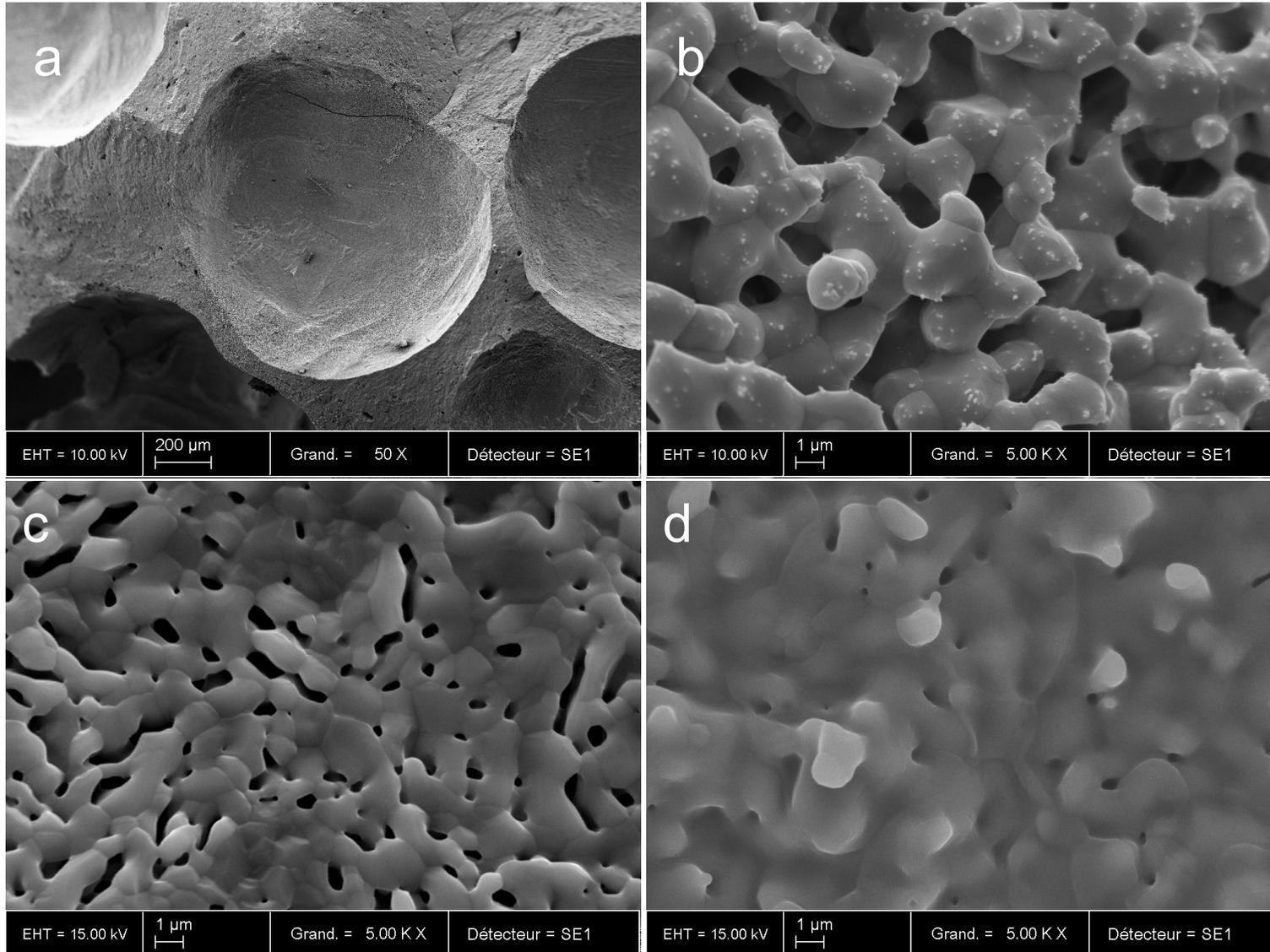


Figure 7



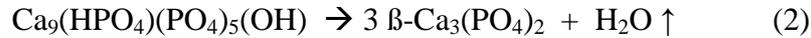
II.3. Discussion

Les céramiques d'HA et de β -TCP sont habituellement synthétisées à partir de poudres de phosphate de calcium bien caractérisées, mélangées avec des porogènes et frittées à hautes températures (e.g. 1000-1300°C) [170]. La composition chimique des céramiques et la structure des pores sont des éléments décisifs pour assurer une réponse biologique appropriée après implantation dans le tissu osseux. Il existe de nombreuses méthodes pour précipiter des poudres de phosphate de calcium à partir de solutions aqueuses [90, 166, 170-172]. Les poudres de phosphate de calcium sont généralement précipitées à partir de solutions aqueuses en milieu basique. R. LeGeros a proposé des méthodes de synthèse comportant l'hydrolyse de monetite (CaHPO_4), brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ou phosphate octocalcique (OCP, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en apatite déficiente en calcium (CDA) [90]. La conversion du composé soluble de phosphate de calcium en CDA est favorisée par la stabilité thermodynamique de la phase apatite à pH neutre ou basique. Néanmoins, le contrôle de la composition de la CDA résultant est difficile car il dépend de nombreux facteurs (température, pH, concentrations). Il existe une autre méthode pour précipiter la CDA, elle consiste à mélanger des solutions de calcium et de phosphate en présence d'une base. Cependant, les contre-ions des sels initiaux (par exemple chlore, sodium) peuvent être incorporés dans la structure d'apatite même après des lavages du précipité. Pour cette raison, Heughebaert *et al* ont développé une méthode de précipitation en utilisant le nitrate de calcium, le phosphate d'ammonium et l'ammoniaque. La CDA est précipitée dans des milieux aqueux selon la réaction (1) :



Dans cette méthode de double décomposition, les contre-ions (nitrate d'ammonium) ne sont pas incorporés dans les mailles de l'apatite, mais sont plutôt adsorbés sur les précipités de phosphate de calcium et sont éliminés par le lavage à l'eau ou par chauffage au-delà de 400°C. Les cristaux de CDA sont peu cristallins avec des particules des dimensions submicroniques souvent agglomérées. Lors de frittage et au-delà de 800°C, la CDA se décompose pour former du phosphate tricalcique, de l'hydroxyapatite ou des mélanges de ces phases (BCP). La CDA

de composition particulière obtenue par la réaction (1) mène à la phase pure de phosphate tricalcique bêta (β -TCP) suivant la réaction (2):



La maîtrise de la composition chimique du précipité de CDA est difficile car elle dépend de plusieurs paramètres comme la concentration en sels, du pH, de la température. D'autres groupes ont précipité le phosphate de calcium à partir d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et d'acide phosphorique H_3PO_4 dans des milieux aqueux. Comme l'hydroxyde de calcium est faiblement soluble dans l'eau, cette méthode donne des précipités phosphocalciques hétérogènes contenant des zones riches en calcium. Pendant le frittage, cette hétérogénéité chimique peut former différentes phases menant après l'implantation de la céramique dans le tissu osseux à diverses bioactivité locales.

La méthode de synthèse de poudres de phosphate de calcium dans l'éthanol présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles de précipitation en milieu aqueux. La composition chimique des précipités de phosphates de calcium est facilement contrôlée en changeant le rapport molaire des réactifs. Dans cette méthode, la source de base de calcium neutralise l'acide phosphorique en précipitant un gel de phosphate suivant la réaction (3) :



À la différence des synthèses effectuées dans des milieux aqueux, les précipités de phosphate de calcium obtenus par cette méthode ne sont pas contaminés par des contre-ions. Un autre avantage de cette méthode est lié à l'état amorphe des poudres de phosphate de calcium. En effet, la constante diélectrique de l'éthanol ($\epsilon_{\text{EtOH}} = 24,3$ à 25°C) est très inférieure à celle de l'eau ($\epsilon_w = 78,5$ à 25°C) ce qui conduit à une forte diminution de la solvation des ions et de la solubilité des composés de phosphate de calcium dans l'éthanol. Les germes précipités dans l'éthanol sont amorphes et de basse dimensionnalité alors qu'ils évoluent rapidement vers des cristaux d'apatite en milieu aqueux. Nous avons montré que ces poudres amorphes avaient une réactivité thermique élevée lors de leur cristallisation autour de $600\text{-}700^\circ\text{C}$ avec une croissance des grains, la formation de joints et un retrait important de la céramique [166, 167, 172]. Dans cette étude, nous avons également observé un retrait de la céramique qui débute

autour de 650°C et fini autour de 1200°C. Le retrait total était de l'ordre de 25% et comparable à celui des travaux précédents [172].

Plusieurs études ont montré que les substituts osseux à base de phosphate de calcium doivent présenter une porosité ouverte avec des macropores de 100-800 µm pour permettre la diffusion des fluides biologiques, la colonisation cellulaire, la vascularisation ainsi que la formation d'un tissu osseux. La macroporosité d'un substitut osseux à base de céramique doit être interconnecté pour permettre une cicatrisation osseuse à partir des berges vers le centre des défauts [173]. Afin de préparer une céramique macro et micro poreuse, les poudres de phosphate de calcium ont été mélangées à des billes d'urée, compactées et frittées à 1050°C. Dans notre étude, nous avons réussi à produire des macro pores sphériques de taille entre 700-1200 µm de diamètre avec une porosité autour de 40%. Cependant, l'analyse par micro tomographie indique une faible interconnexion de ces macropores. Dans le but d'améliorer la porosité, nous avons augmenté la quantité de billes d'urée mais ceci n'a pas permis d'améliorer l'interconnexion sans altérer la tenue de la céramique. Des travaux récents ont montré que l'utilisation de deux porogènes (par exemple naphthalène, sucre) permettrait de produire une porosité élevée avec une interconnexion après frittage [174]. D'autres auteurs ont employé deux phases non miscibles, méthacrylate polymérisé et une suspension d'HA, afin de produire un réseau de pores interconnectés après combustion et frittage [175]. Le peroxyde d'hydrogène mélangé au phosphate de calcium permet également d'obtenir une macroporosité [176].

Une autre propriété conditionne également la bioactivité de la céramique. Il a été montré que les céramiques microporeuses augmentaient la formation osseuse par rapport aux céramiques denses dans des défauts de taille critique [110, 177]. Des études récentes ont même démontré qu'une céramique microporeuse induisait une formation osseuse ectopique après implantation pendant plusieurs semaines dans des muscles des différents animaux [128, 129, 137, 178]. La microporosité de la céramique est liée à la réactivité des poudres initiales et à la température de frittage. Dans la présente étude, les poudres d'ACP ont donné une céramique fortement microporeuse après frittage à une température relativement basse (1050°C). Nous avons observé une forte diffusion de surface, avec formation des joints de grains concaves après frittage. Cette diffusion de surface commence autour de 650°C ce qui correspond à la cristallisation des poudres amorphes. D'après le grossissement actif des grains, des

céramiques fortement microporeuses ont été obtenues par frittage à des températures relativement basses en commençant par des poudres cristallines conventionnelles.

Cette étude a montré que des poudres amorphes de phosphate de calcium ayant une composition contrôlée pouvaient être facilement précipitées dans l'éthanol en utilisant une méthode sol-gel. Ces poudres étaient hautement réactives avec une croissance de grains par diffusion de surface et un retrait de la céramique commençant autour de 650°C. À cette température, nous avons observé une cristallisation en β -TCP, HA ou BCP. Les poudres amorphes de phosphate de calcium ont été mélangées à des billes d'urée, compactées et frittées directement pour donner une céramique macro microporeuse à des températures relativement basses. Cependant, l'interconnexion des macropores devrait être améliorée dans ces céramiques pour favoriser la colonisation osseuse.

Chapitre III:

Propriétés ostéogéniques de céramiques phosphocalciques biphasées comparées à l'autogreffe osseuse en site intramusculaire et fémoral chez la chèvre

III.1. Introduction

III.2. ARTICLE 2 :

Ostéogénicité de céramiques phosphocalciques biphasées comparées à l'autogreffe osseuse chez la chèvre

III.3. Discussion

III.1. Introduction

L'autogreffe osseuse est considérée comme « le modèle de référence » dans la régénération et la réparation de défauts osseux en raison de ses propriétés ostéogéniques, d'ostéoconduction et d'ostéoinduction [61]. Cependant, son prélèvement nécessite un deuxième site chirurgical, auquel des complications ont été rapportées. De plus, la quantité de la greffe osseuse est limitée ce qui réduit les possibilités de reconstruction [57, 68, 179]. Enfin, l'autogreffe osseuse est fortement resorbable et elle est souvent dégradée avant que la cicatrisation osseuse ne soit accomplie [54].

Les substituts osseux, en particulier les céramiques phosphocalciques, ont prouvé leur efficacité dans de nombreuses indications cliniques [180]. Ces matériaux sont largement disponibles et sont utilisés en chirurgie orthopédique, pour combler des défauts osseux après résection de tumeur, ostéonécrose, suites à des traumatismes ou insérées dans des cages de fusion (rachis). Bien que ces produits de substitution osseuse soient ostéoconducteurs, ils ne peuvent généralement pas régénérer des défauts osseux de grande taille et leur dégradation est relativement lente.

Certaines céramiques composées d'HA, β -TCP ou BCP ont montrées récemment leur capacité à induire une formation osseuse en sites ectopiques dans différents modèles animaux [128-130, 177, 181, 182]. Ces matériaux possèdent une surface microporeuse pour induire une formation osseuse dans les muscles de grands animaux après plusieurs semaines d'implantation. La microporosité est obtenue par frittage à basse température. Ces micropores procurent à la céramique une surface spécifique élevée, conduisant à la dissolution de la céramique et la précipitation d'une apatite biologique en contact avec les fluides corporels, l'adsorption des protéines et des facteurs de croissance, et favorisent l'adhésion et la colonisation de cellules ostéoprogénitrices [177, 180, 183]. Après implantation dans des défauts de taille critique, ces matériaux ont démontré des capacités de cicatrisation plus élevées que celle obtenue par des céramiques non microporeuses [177]. En plus de la microporosité, la structure et la quantité du matériau jouent un rôle important dans l'ostéogénèse. Les substituts osseux doivent présenter une structure macroporeuse

interconnectée afin d'être entièrement colonisés par des fluides biologiques, des cellules ostéoprogénitrices, des vaisseaux sanguins et finalement par le tissu osseux [184].

De nombreuses études ont démontrées que des défauts osseux comblés par des biocéramiques à base de phosphate de calcium cicatrisent à partir des berges vers le centre du défaut (repousse osseuse centripète) et la continuité de tissu osseux a été maintenue par ostéoconduction [93, 185, 186]. Les matériaux ostéogéniques sont capables d'induire une formation osseuse au milieu des défauts sans l'apport de l'ostéoconduction. Par conséquent, la repousse osseuse est initiée à la fois à partir des berges et du centre des défauts, permettant une meilleure cicatrisation. Bien que l'ostéogénicité soit reconnue comme propriété des autogreffes osseuses, cette propriété n'a pas été clairement établie pour les biocéramiques [57]. Très peu d'études ont comparé les propriétés ostéogéniques des autogreffes osseuses et des biocéramiques à la fois dans les sites osseux et dans les sites ectopiques. Il est également difficile d'évaluer l'ostéogénicité des biomatériaux dans les sites osseux sans la contribution de l'ostéoconduction. Soballe *et al* ont précédemment utilisé un modèle de cicatrisation à distance « gap-healing » pour évaluer la capacité de cicatrisation d'un revêtement à base de phosphate de calcium appliqué sur des implants en titane [133, 187, 188]. Les implants ont été centrés dans le défaut osseux à une distance de 1-2 millimètres empêchant l'ostéoconduction mais permettant l'évaluation d'une ostéogénèse.

Dans ce chapitre, nous avons comparé les capacités ostéogéniques d'une autogreffe osseuse avec des biocéramiques de phosphate de calcium implantées dans des sites osseux et ectopiques chez la chèvre. Des granules (1-2 mm) de phosphate de calcium biphasé (BCP) composés d'HA et de β -TCP (60/40) ont été frittés à différentes températures (1050, 1125 et 1200°C), afin d'obtenir différentes microporosités. Ces céramiques de BCP ainsi que l'autogreffe osseuse sous forme de copeaux d'os ont été implantées pendant 6 et 12 semaines dans les muscles lombaires et dans des défauts de taille critique (9 millimètres de diamètre) au niveau des épiphyses fémorales. Afin d'éviter l'ostéoconduction, les granules de BCP ou l'autogreffe osseuse ont été placés dans des cylindres creux avec des parois de 2 millimètres d'épaisseur. Ces cylindres ont été fabriqués avec un matériau biologiquement inerte (polytétrafluoroéthylène, PTFE) et ont été percés avec des nombreux trous pour permettre la diffusion des fluides biologiques ainsi que la colonisation cellulaire. Certains cylindres ont été implantés vides (contrôles négatifs) pour valider le modèle. D'autres cylindres de PTFE ont

été remplis par l'autogreffe osseuse fraîchement récoltée ou de granules de BCP frittés à 1050, 1125 et à 1200°C. Les réponses cellulaires et tissulaires aux matériaux implantés ont été étudiées par histologie. La quantité du tissu osseux minéralisé, les biocéramiques et les tissus non minéralisés, aussi bien que la résorption des biocéramiques et de l'autogreffe osseuse ont été mesurées par micro tomographie (μ CT) et par microscopie électronique à balayage (MEB).

Ostéogénicité de céramiques phosphocalciques biphasées comparées à l'autogreffe osseuse chez la chèvre

Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model

Borhane H. Fellah^a, Olivier Gauthier^b, Pierre Weiss^a, Daniel Chappard^c, Pierre Layrolle^{a,*}

^a INSERM U791, Laboratory for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Faculty of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France

^b National Veterinary School of Nantes, Experimental surgery, Nantes, France

^c INSERM, EMI 0335 – LHEA, Faculty of Medicine, Angers, France

Received 21 August 2007; accepted 24 November 2007

Available online 18 December 2007

Abstract

The aim of this work was to compare the osteogenicity of calcium phosphate ceramic granules with autologous bone graft in ectopic and orthotopic sites. Biphasic calcium phosphate (BCP) granules composed of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) in a 60/40 ratio were sintered at 1050, 1125 and 1200 °C, producing different microporosities. Either BCP ceramic granules or autologous bone chips ($n = 7$) were implanted into paraspinal muscles. Osteoinduction was not observed in either the BCP implants or autologous bone chips after 6 or 12 weeks in the ectopic sites. Hollow and bored polytetrafluoroethylene (PTFE) cylinders were filled with autologous bone, BCP granules or left empty, then implanted into critical-sized defects in femoral epiphyses. The PTFE cylinders left empty contained marrow and blood vessels but not mineralized bone, indicating that this model prevented bone ingrowth ($0.56 \pm 0.43\%$ at 12 weeks). Bone formation was observed in contact with the BCP1050 and BCP1125 granules in the femoral sites after 6 weeks. The amount of bone after 12 weeks was 5.6 ± 7.3 and $9.6 \pm 6.6\%$ for BCP1050 and BCP1125, respectively. Very little bone formation was observed with the BCP1200 implants ($1.5 \pm 1.3\%$ at 12 weeks). In both the ectopic and orthotopic sites, autologous bone chips were drastically resorbed (from $19.4 \pm 3.7\%$ initially to $1.7 \pm 1.2\%$ at 12 weeks). This study shows that synthetic bone substitutes may have superior stability and osteogenic properties than autologous bone grafts in critical-sized bone defects.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Osteogenesis; Autologous bone; Calcium phosphate ceramics; Bone ingrowth; Osteoconduction; Osteoinduction

1. Introduction

Autologous bone grafts are considered the gold standard in bone repair and regeneration because of their osteogenicity, osteoinductivity and osteoconduction [1]. However, the harvesting procedure requires a second surgical site, at which complications have been reported, and the quantity of bone graft is limited to about 20 cm^3 [2–4]. In addition, autologous bone grafts are highly resorbable as they are often degraded before bone healing has been completed. Synthetic bone fillers, particularly calcium phosphate (CaP) ceramics, have

proven efficacy in numerous clinical indications [5,6]. Although these bone substitutes are osteoconductive, they often lack the osteogenicity needed to support bone healing in large defects and are slowly degraded in the body [7–10]. Some particular CaP biomaterials, such as hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP) and biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics, have recently been shown to induce bone formation ectopically in different animal models [7,9,11–14]. These materials must exhibit a microporous surface for inducing bone tissue formation in the muscles of large animals after several weeks [9,11,13]. Microporosity is achieved by using a relatively low sintering temperature (e.g. 1050–1150 °C). These micropores, measuring about $0.1\text{--}5 \mu\text{m}$ in size provide with a high surface area, favoring dissolution of the ceramic and precipitation of a biological apatite, adsorption of proteins

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 20; fax: +33 2 40 41 37 12.
E-mail address: pierre.layrolle@nantes.inserm.fr (P. Layrolle).

and growth factors, as well as the adhesion and colonization of osteoprogenitor cells [5,9,15]. When implanted into critical-sized bone defects, these materials have demonstrated better bone healing capacities than non-microporous ceramics [8]. In addition to microporosity, both the structure and quantity of the implant play an important role in osteogenesis [16].

Although osteogenicity is a well-recognized feature of autologous bone, it is the subject of controversy for biomaterials [2]. The reasons are related to a misunderstanding of the biological events prior to this phenomenon, as well as an absence in the literature of comparative studies between autologous bone grafts and synthetic bioceramics in both ectopic and osseous sites. It is also relatively difficult to assess the osteogenicity of materials in osseous sites without the contribution of osteoconduction. Soballe et al. have previously used a gap-healing model for assessing the healing capacity of CaP coatings applied to metal implants [17–19]. The implants were centered into the bone defect at a distance of 1–2 mm preventing osteoconduction but making it possible to assess osteogenesis. There is, however, no published report comparing the osteogenic properties of autologous bone grafts and bioceramics using this model.

The aim of the present study was to compare the osteogenic capacities of autologous bone grafts with CaP bioceramics implanted into both ectopic and critical-sized defects in femoral epiphyses of goats. Either biphasic calcium phosphate (BCP) granules sintered at various temperatures (1050, 1125 and 1200 °C) or autologous bone chips (AB) were implanted for 6 and 12 weeks. In order to avoid osteoconduction, the BCP granules or the freshly-harvested autologous bone chips were placed in custom-made hollow cylinders.

2. Materials and methods

2.1. Implants

Macro–microporous biphasic calcium phosphate ceramic granules of 1–2 mm were used (MBCP™, Biomatlante SAS, France). As received, the MBCP™ granules exhibited macropores of 100–600 µm and micropores due to the low sintering temperature of 1050 °C. These granules were also sintered at 1125 and 1200 °C for 5 h with heating/cooling rates of 10 °C/min in air. The resulting 3 types of granules were named BCP1050, BCP1125 and BCP1200. The phase composition of all BCP granules was analyzed using X-ray diffraction (XRD, Philips PW1830, CuK α source) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR, Nicolet, Magnia 550). The BCP granules were composed of HA and beta-TCP in a 60/40 ratio. The average size of the macropores was measured by scanning electron microscopy (SEM, LEO 1450 VP). SEM micrographs were taken using backscattered electrons at 15 kV. The porosity and size of the micropores were measured by mercury intrusion porosimeter (Autopore III, Micromeritics). Specific surface area was determined by the Brunauer–Emmett–Teller method (BET, Micromeritics Flow-sorb III) [20].

Hollow PTFE cylinders were specially designed and machined (ALTA Industries, France). PTFE is a biologically inert and non-osteoconductive material supporting steam sterilization. The hollow cylinders were 9 mm in diameter, 10 mm in length and had 2 mm thick walls, bored with numerous 0.8 mm diameter holes. Plugs of 11 mm in diameter were used to close the hollow cylinders after filling with either BCP granules or autologous bone chips. About 100 mg of BCP granules was placed in the PTFE cylinders. Some cylinders were left empty either as negative controls or to receive autologous bone chips at the time of surgery. For intramuscular implantation,

300 mg of BCP granules was placed into microcentrifuge tubes (Eppendorf) and sterilized. All implants were conditioned individually in double-sealed pouches and steam sterilized at 121 °C for 20 min.

2.2. Animal model and surgery

Animal handling and surgical procedures were conducted according to the European Community Guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE) and approved by the local ethics committee at the Nantes Veterinary School. Fourteen adult white milk goats with an average body weight of 65 kg were purchased from a professional stockbreeder. Seven goats per delay of 6 or 12 weeks were used. This design gave $n = 7$ samples per group and delay in the muscle sites. In the femoral sites, the 5 groups of implants (empty, AB, BCP1050, BCP1125 and BCP1200) were randomly implanted into 4 sites per animal (2 defects per femur). This experimental design gave a number of samples per group and delay ranging from 4 to 7 (Table 2).

After 2 weeks of acclimatization, the animals were implanted, under general anesthesia using an intravenous injection of 0.05 mg/kg of ketamine (Imalgene 1000, Merial, France) and 0.06 mg/kg of diazepam (Valium®, Roche, France). Anesthesia was maintained for surgery with a gas mixture of halothane (1.5%), and oxygen/nitrous-oxide (98.5%). A single dose of morphine 0.5 mg/kg was injected subcutaneously during the surgery as an analgesic.

2.2.1. Femoral implantation

After shaving and disinfection (Vetedine®) of the knee, a longitudinal incision of the skin was made. Stifle arthrotomy was performed to expose the distal lateral condyle of the femur. Fig. 4 shows the lateral position of the implants in the distal femoral condyle. In this model, hollow, 9 mm diameter PTFE cylinders were either left empty, or filled with autologous bone chips, BCP1050, BCP1125 or BCP1200 ceramic granules. The cylinders had numerous holes to allow invasion by body fluids and cells. The wall of the PTFE cylinders was 2 mm thick to prevent osteoconduction while allowing osteogenesis to occur inside the cylinders. These cylinders were implanted in critical-sized defects created in cortico-trabecular bone. Two cylindrical defects (9 mm diameter and 10 mm length) were created at the junction between the epiphysis and metaphysis using a motor-driven drill (Aesculap, Tuttlingen, Germany) and successive burs of 3, 6, and 9 mm diameter. During drilling, the site was irrigated using sterile saline solution. After drilling, the bone defects were emptied, rinsed with saline irrigation and then packed with sterile gauze until bleeding subsided. Bone debris was collected from the burs and put into a sterile cup with saline. These bone chips, referred to as autologous bone grafts (AB), were implanted into the muscles or femoral defects 5–20 min after harvesting. The AB chips were placed aseptically into the PTFE cylinder without pushing. About 0.7 ml of AB chips was packed into the hollow cylinders. The femoral cavities were then filled with PTFE cylinders either left empty, filled with BCP granules or AB chips. The articular capsule was closed with non-absorbable sutures (Prolene® 2-0, Ethicon, France). The subcutaneous tissues and skin were closed in different layers using degradable sutures (Polysorb® 2-0, France). Finally, the surgical site was covered with an adhesive bandage. Both back legs were operated, giving 4 implantation sites per animal.

2.2.2. Intramuscular implantation

The lumbar area was shaved, disinfected and prepared for surgery. The skin was incised and the paraspinal muscle exposed. Small pockets (4 independent sites per animal) were created with blunt dissection, then filled with 300 mg or approximately 800 µl of the different BCP granules (1050, 1125 or 1200 °C) or autologous bone chips. The muscle fascia was closed with non-absorbable sutures to facilitate implant retrieval (Prolene® 2-0, Ethicon, France) and the skin sutured using degradable sutures (Polysorb® 2-0, France).

After 6 and 12 weeks, the animals were sacrificed under general anesthesia induced by a mixed injection of ketamine (Imalgene 1000, Merial, France) and Xylazine (Rompun®, Bayer, France). The euthanasia was induced by intravenous injection of 20 ml of pentobarbital (Doléthol®, Vétquinol S.A.,

France). The explants were dissected leaving a minimal amount of surrounding tissue and immediately placed in a fixative (10% neutral formol solution).

2.3. Histological analysis of explants

During the fixative period, the explants were analyzed by X-ray computed microtomography (SkyScan 1072, Belgium). The X-ray source was operated at a voltage of 80 or 100 kV and a current of 80 or 98 μ A. The sample was rotated through 180° with a rotation step of 0.45°, an acquisition time of 5.6 s per scan giving a pixel size of 11.8 μ m. Three-dimensional reconstructions were then made with the 3D Creator SkyScan software. The explants were processed for non-decalcified histology using polymethacrylate (PMMA) resin. This technique preserved the interface between ceramic and mineralized bone tissue. After fixation for about 3 days, the explants were dehydrated in ascending graded ethanol series (24 h for each grade) and then placed in pure acetone for 24 h. Finally, the samples were impregnated with methylmethacrylate for 4 days with one refreshment. The explants were embedded in PMMA at 4 °C for 4 days. Each resulting block was cut in half with a circular diamond saw (Leica SP1600, Germany). One part was processed for histology. Thin, 7 μ m sections were prepared using a hard tissue microtome (Reichert-Jung, Supercut 2050, Germany) and stained with Movat's pentachrome. The other part of the block was used for histomorphometrical measurements. The samples were also observed by back scattered electron microscopy (BSEM, LEO 1450 VP).

2.4. Statistical analysis

All data were studied for statistical purposes using the SYSTAT 10.2 software (SYSTAT Software, Inc.). First, each group of data was studied using the Lilliefors test. It was found that the quantitative variables were Gaussian. In univariate analysis, the effect of materials and implantation delays on the percentages of ceramic, mineralized bone and non-mineralized tissue was analyzed with parametric tests (student's *t*-test, paired student's *t*-test, ANOVA). Results were considered to be statistically relevant for *p* values inferior to 0.05.

3. Results

3.1. Characterization of the implanted materials

Fig. 1 shows the microstructure of the BCP granules sintered at different temperatures. A BCP granule with a rough spherical shape and a size of approximately 1 mm is shown in Fig. 1A. Macropores were observed but appeared poorly interconnected. As shown in Fig. 1B–D, the BCP granules had different microstructures depending on the sintering temperature. Granules sintered at 1050 °C had a rough surface with small crystals of about 0.5 μ m joined by grain boundaries (Fig. 1B). Numerous micropores were observed indicating that the sintering was not complete at 1050 °C. By increasing the sintering temperature to 1125 °C, both crystals and micropores increased in size while they decreased in number (Fig. 1C). After sintering at 1200 °C, grain growth was evident; the surface of the granules became dense with some residual micropores still present. These SEM observations were corroborated by Hg porosimetry (Fig. 2, Table 1). The 3 types of granule had large pores of about 450 μ m in diameter. For the materials sintered at 1050 °C, micropores were observed with a maximum size of 0.36 μ m. After sintering at 1125 °C, the micropore size increased to 0.45 μ m. For the granules sintered at 1200 °C, no peak was observable in the micropore range. Table 1 summarizes the physical and chemical analyses

obtained for the materials sintered at different temperatures. The ceramics were all composed of HA/ β -TCP at a ratio of approximately 60/40 and had an atomic Ca/P ratio of about 1.60. No other phase than HA and β -TCP was detected using either XRD or FTIR analysis. Total porosity was similar for BCP1050 and BCP1125 and was about 65%. For the granules heated at 1200 °C, the porosity decreased to 54%, corroborating the disappearance of micropores at this temperature. The specific surface area of the granules decreased to 2.66, 1.45 and 0.67 ± 0.01 m²/g for BCP1050, 1125 and 1200 °C, respectively. This decrease in specific surface area resulted from both the decrease in the number of micropores and the increase in grain size as a function of sintering temperature.

3.2. Intramuscular implantation

The animals recovered well from surgery with normal locomotion. After 6 and 12 weeks of implantation, the explants containing the ceramic granules formed a rigid mass firmly attached to the surrounding muscular tissues. All the ceramic explants (*n* = 7 per group) were recovered after 6 and 12 weeks. All samples from the autologous bone group were harvested after 6 weeks while 2 could not be retrieved after 12 weeks due to resorption. In all cases, the quantity of autologous bone chips implanted in the muscles decreased drastically with increased implantation time. Macroscopically, none of the explants showed signs of inflammation, infection or tissue necrosis after 6 or 12 weeks. Fig. 3 shows the BSEM images and histological photographs of the AB chips and BCP1050 granules implanted in muscles for 6 weeks. As shown in Fig. 3A, autologous bone was formed of chips of approximately 150 μ m in thickness and 1 mm in length. It exhibited lacunae and numerous osteocyte holes with diameters of about 50 and 10 μ m, respectively, typical of mineralized bone tissue. Histological observations indicated that AB stained green, drastically resorbed with apposition of osteoid tissue in red (Fig. 3B). In proximity to the autologous bone chips, we observed inflammatory marrow with cellular infiltration. Numerous multinucleated and giant cells were seen in most of the autologous bone implants. Other samples showed myolysis in proximity to the implants. After 12 weeks of implantation in muscle tissue, signs of myolysis were not visible, small ossicles were still present with thin trabeculae and adipose marrow. Osteoinduction with *de novo* bone formation was not observed in contact with the autologous bone chips implanted in goat paraspinal muscles for 6 or 12 weeks. On the contrary, significant resorption of the bone chips was observed. Fig. 3C shows the BSEM images of the ceramic granules (BCP1050) implanted for 6 weeks in goat muscle. The ceramic granules appeared in light gray with a grayish region at the surface corresponding to a dissolution–reprecipitation zone. However, it was not possible to clearly identify mineralized bone tissue in relation to the ceramic in any of the BCP1050, BCP1125 and BCP1200 sample groups after implantation for 6 or 12 weeks. As shown in Fig. 3D, dense fibrosis containing numerous cells was observed between the BCP1050 granules. This reactive bordering tissue was close

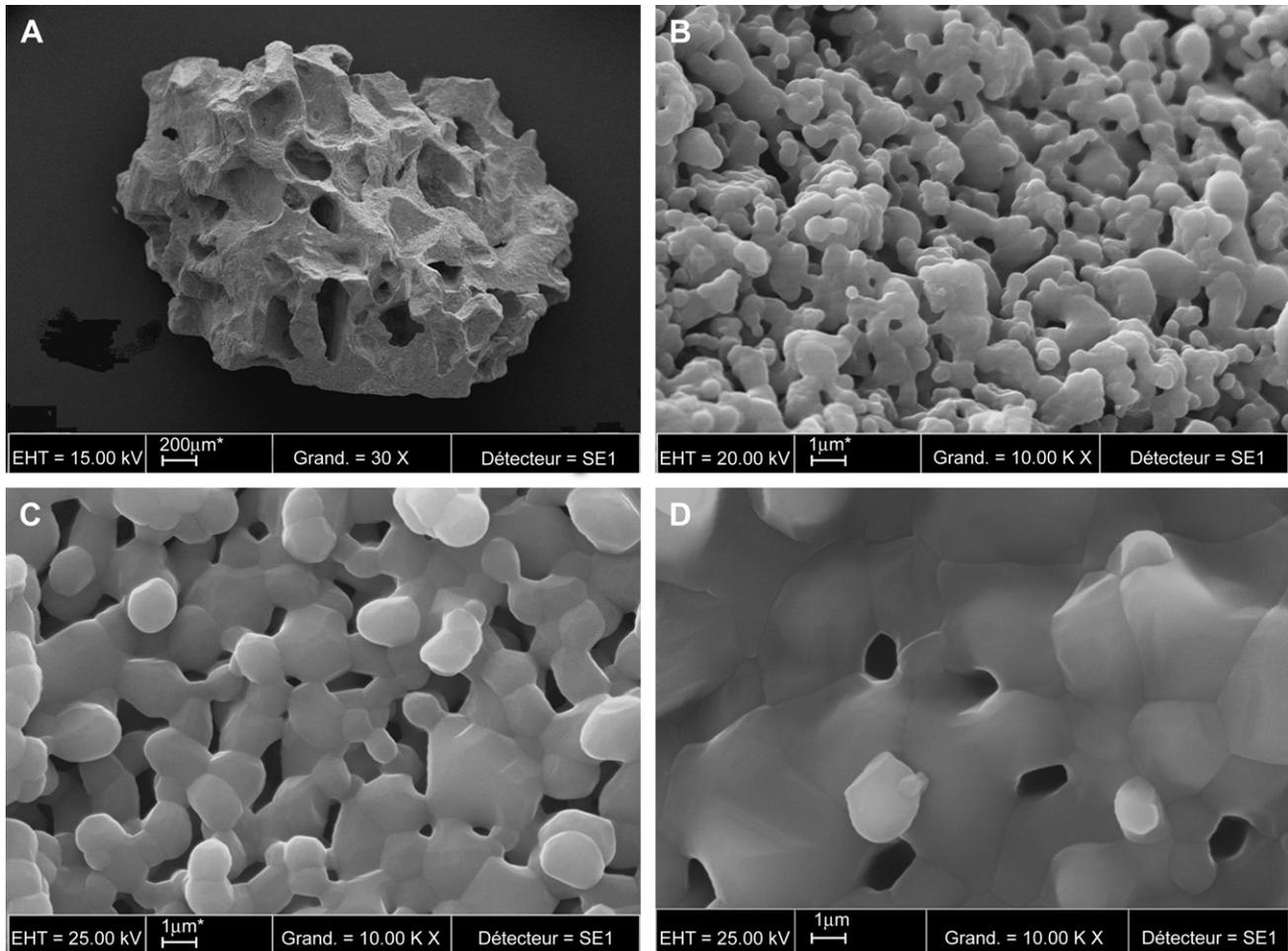


Fig. 1. SEM micrographs of the BCP granules sintered at different temperatures. (A) General shape of a BCP granule. (B)–(D) High magnification images showing the microstructure of BCP granules sintered at 1050, 1125 and 1200 °C, respectively.

to the surface of the granules implanted for 6 weeks in goat muscles.

3.3. Femoral implantation

Macroscopically, there was no sign of inflammation, infection or osteolysis in any of the explants. As illustrated by μ CT (Fig. 5A) or BSEM images (Fig. 6A), the cylinders left empty were free of mineralized bone tissue after 6 weeks. Vascularized active fibrosis with adipocytes were observed inside the cylinders left empty (Figs. 6B and 7B). Little mineralized bone was found after 12 weeks in certain samples from this negative control group (Fig. 7A). These results indicate that the specially-designed hollow cylinders did make possible invasion by body fluids and cells, but did not allow bone tissue ingrowth. This experimental model is therefore appropriate for studying the osteogenesis of different materials in bone sites. Although the cylinders were completely filled with autologous bone chips at the time of implantation, a large amount of bone had resorbed after 6 weeks (Fig. 5B). On the contrary, the cylinders filled with ceramic granules were still full of material after 6 weeks (Fig. 5C). The granules appeared uniformly distributed inside the cylinders. Independently of sintering temperature and

implantation time, degradation of the ceramic was not detectable on the μ CT images. As shown in Fig. 6C, autologous bone chips were found inside the PTFE cylinders after 6 weeks. It was not possible to discriminate between transplanted bone and newly-formed bone using electron microscopy, even at high magnification, because they have similar electron density. Nevertheless, the initial quantity of mineralized bone inside the cylinders had drastically decreased after 12 weeks of implantation (Table 2, Fig. 8). Massive resorption of autologous bone was observed in this experimental model which lacked initial contact with host bone. As shown in Fig. 6D by histology, after 6 weeks, the transplanted bone chips (stained green) were bordered by some osteoid tissue (stained red) and marrow islets. Metaplastic bone with osteoblasts and some osteoclasts were observed. Fibrosis tissue was present toward the cylinder wall. After 12 weeks, the cylinders filled with AB chips presented little metaplastic ossification with remodeling signs and medullary lysis (Fig. 7D). We also observed organized marrow containing several packed macrophages and some fibrosis. A different behavior was observed for the cylinders filled with ceramics and implanted in goat femoral condyles. As illustrated in Figs. 6E,G and 7E,G, the BCP granules were easily distinguished from mineralized bone tissue using BSEM. In the case of the

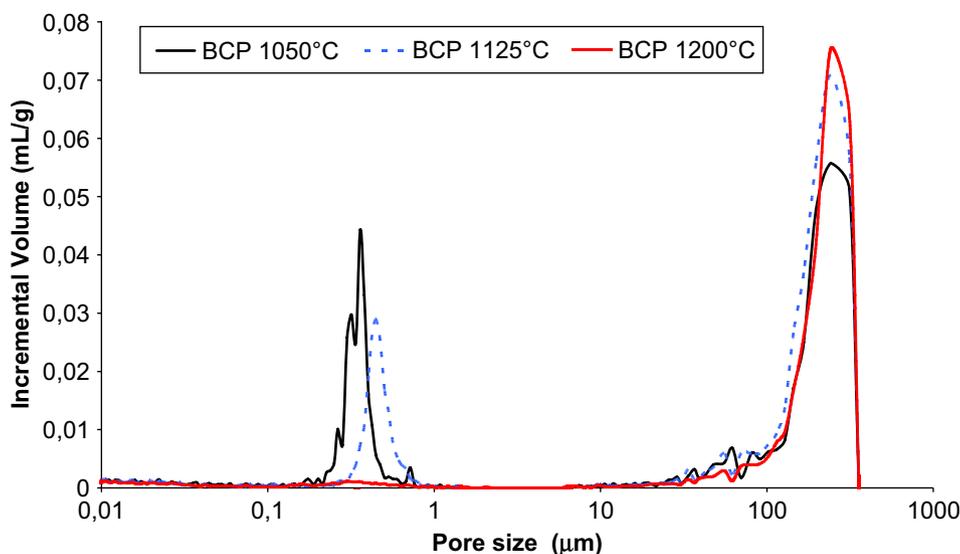


Fig. 2. Hg porosimetry measurements of BCP granules sintered at 1050, 1125 and 1200 °C. Note the absence of micropores in the 0.1–2 μm range for the ceramic heated at 1200 °C.

BCP1050 and BCP1125 groups, some mineralized bone tissue was observed in contact with the granules inside the cylinders after 6 weeks and was even more abundant after 12 weeks of implantation. Mineralized bone was observed in the center of the cylinder in contact with the granules without any connection to the surrounding host bone. As shown in Figs. 6F,H and 7F,H, both mineralized bone and osteoid tissues were observed in contact with the BCP granules sintered at 1050 and 1125 °C while marrow was abundant between the granules after 6 and 12 weeks. On the contrary, no bone formation was observed in the material sintered at 1200 °C (Figs. 6I and 7I). Histological sections revealed reactive inflammatory tissue with evident fibrosis around the BCP1200 granules after 6 and 12 weeks (Figs. 6J and 7J).

Fig. 8 and Table 2 illustrate the evolution in bone ingrowth and ceramic resorption for all groups measured at time 0 (i.e. not implanted), 6 weeks and 12 weeks. The graph shows that the left empty cylinders remained unfilled by bone ingrowth

even after 12 weeks. Traces of mineralized bone, 0.07% after 6 weeks and 0.6% after 12 weeks, were measured in the left empty cylinders (Table 2). For the autologous bone group, we observed a significant decrease in the percentage of mineralized bone with implantation time. After 12 weeks, the quantity of mineralized bone inside the cylinders decreased to 1.7%. On the contrary, progressive bone ingrowth in parallel with implantation time was observed in the cylinders filled with BCP1050 granules (no bone at time 0, 1.01% at 6 weeks and 5.6% after 12 weeks). The same trend was observed for BCP1125 but a higher rate of bone ingrowth was found at the same implantation time (no bone at time 0, 2.05% at 6 weeks and 9.6% after 12 weeks). For BCP1200, bone formation remained low and comparable to the empty cylinders (no bone at time 0, 0.85% after 6 weeks and 1.5% after 12 weeks). These results revealed that osteogenicity is related to BCP microstructure and not its chemical composition. Ceramic resorption was also measured in relation to implantation time and is reported in Table 2. At time 0, the ceramic occupied about 30% of the total surface of the hollow PTFE cylinder, irrespectively of sintering temperature. This result indicated that filling the cylinders with ceramic granules was reproducible ($p < 0.05$). After 6 weeks' implantation, the percentage of ceramic inside the PTFE cylinders had decreased in relation to sintering temperatures. It was approximately 25% for BCP1050 and 28% for BCP1125, while the percentage for BCP1200 remained unchanged (30%). After 12 weeks, the percentage of ceramic remained stable for BCP1050, but had decreased for BCP1125 and BCP1200 (about 25 and 27%, respectively). The *in vivo* resorption of ceramic seems to be related to sintering temperature and microstructure.

Table 1
Physicochemical properties of the micro–macroporous BCP granules sintered at 1050, 1125 or 1200 °C

Granules	HA ^a (wt %)	β-TCP ^a (wt %)	Ca/P ^a	CO ₃ ^b	CaO ^c
BCP1050	60.52	39.48	1.602		
BCP1125	53.41	46.58	1.591	No peaks	Not detected
BCP1200	57.25	42.74	1.597		

Granules	Macropores ^d (μm)	Micropores ^d (μm)	Total porosity ^d (%)	Specific surface area ^c (m ² /g)
BCP1050		0.36 ± 0.04	64.58 ± 2.9	2.66 ± 0.01
BCP1125	450 ± 49	0.45 ± 0.04	64.56 ± 3.9	1.45 ± 0.01
BCP1200		No peak	54.30 ± 5.6	0.67 ± 0.01

^a Analyzed by XRD.

^b Determined by FTIR spectroscopy.

^c CaO content tested using phenolphthalein.

^d Measured by Hg porosimetry.

^e Determined by BET.

4. Discussion

Osteoinduction was not observed in either the AB chips or BCP ceramics implanted in goat muscles for 6 and 12 weeks.

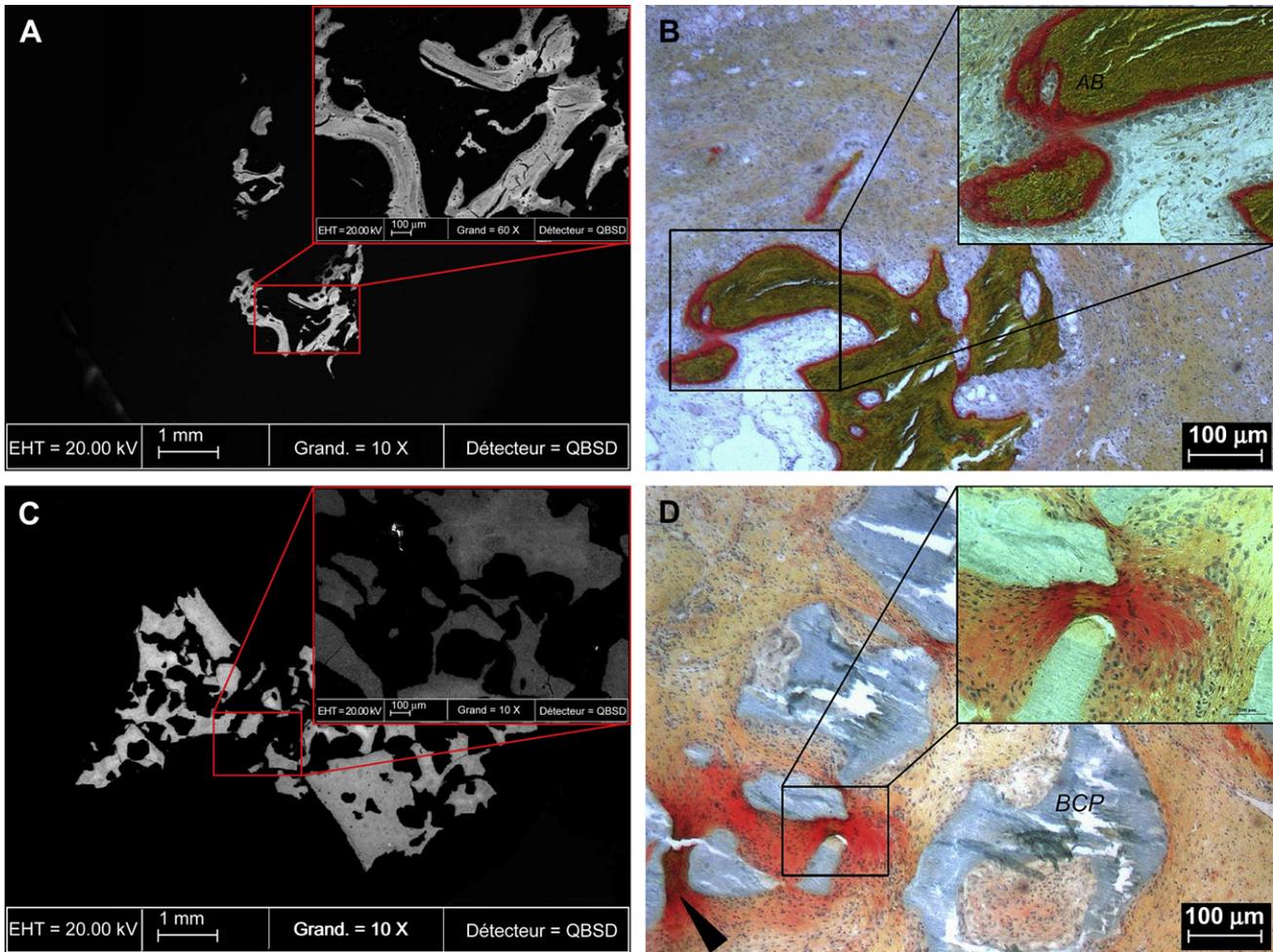


Fig. 3. BSEM and histological micrographs of autologous bone chips and BCP1050 granules implanted in goat muscles for 6 weeks. (A) and (B) Autologous bone chips. Note the osteoid tissue (stained red) around the bone chips (stained green). (C) and (D) BCP1050 granules. A grayish dissolution–reprecipitation zone at the surface of the granules and active fibrosis between granules were observed with BSEM and histological micrographs (Movat's pentachrome stain).

Numerous multinucleated and giant cells were observed around the AB chips resulting in their resorption. Two out of 7 of the autologous bone implants could not be retrieved after 12 weeks in muscles. Despite the fact that many researchers and surgeons claim that autologous bone is osteoinductive [21,22], we did not observe *de novo* bone formation in muscles but instead its resorption. Regarding the BCP granules, we noticed a precipitation zone at the surface of the BCP granules sintered at 1050 and 1125 °C and some fibrosis, but ectopic bone formation was not observed after 12 weeks. In a comparative study using different calcium phosphate bioceramics conducted in dog muscles, Yuan et al. demonstrated that bone formation depends on both composition and microstructure [23,24]. Previous results from our group using the same material have shown ectopic *de novo* bone formation. About 12% of mineralized bone was found between macro–microporous BCP particles having similar composition and microstructure after implantation for 24 weeks in muscles of sheep [13]. This absence in bone formation may be due to a short implantation period (12 versus 24 weeks), a different animal model (goats versus sheep) and the quantity of implanted material (0.3 versus 1 g). It has been shown that microporous BCP

ceramics induced *de novo* bone formation after 12–24 weeks in the muscles of dogs, goats and sheep [7,11,13]. It has also been demonstrated that osteoinduction by means of calcium phosphate biomaterials is also animal-dependent with wide variations between individuals [9,25]. Variability has also been attributed to the size of the implants [9]. This non-reproducible phenomenon is due to the lack of understanding of the biological mechanisms leading to ectopic bone formation in contact to microporous ceramics.

Although ectopic implantation is an interesting model for comparing osteoinduction, these biomaterials are primarily used as bone substitutes and thus, the comparison should be conducted in orthotopic sites. Habibovic et al. have compared different calcium phosphate ceramics implanted in 17 mm diameter critical-sized defects in the iliac wing of goats [8]. Two BCP materials with similar composition, crystallinity and macroporosity, but different microporosity, were prepared by sintering at 1150 and 1300 °C and implanted in the muscles and iliac wings of goats. After 12 weeks of intramuscular implantation in goats, about $1.5 \pm 2\%$ of bone had formed in the macropores of all the BCP ceramic discs sintered at 1150 °C while no signs of bone formation were found in any of the

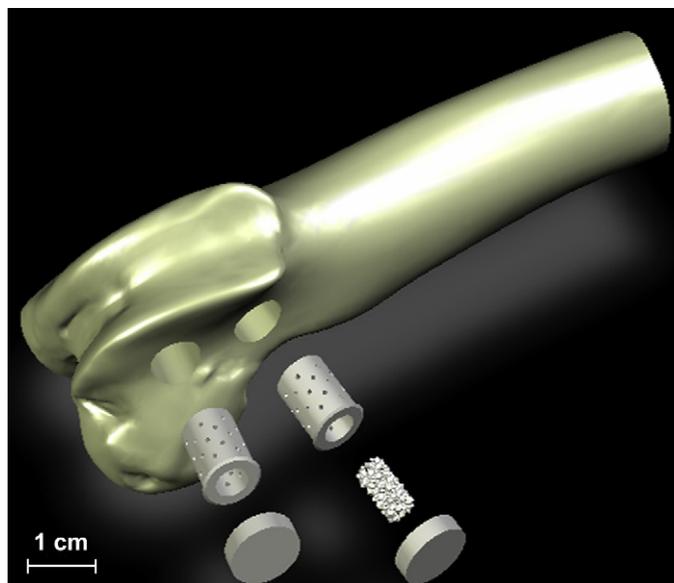


Fig. 4. Three-dimensional reconstruction of a goat distal femoral condyle showing the PTFE cylinders either left empty, filled with autologous bone chips or BCP ceramic granules and implanted in critical-sized defects for 6 and 12 weeks.

BCP1300 implants. After 12 weeks of bilateral implantation in iliac wing defects, the percentage of bone per pore surface did not differ significantly between the 2 materials but bone apposition was higher in the BCP1150 than the BCP1300. Although it was a critical-sized defect, this iliac wing model did not prevent osteoconduction and the strict comparison of osteogenesis with biomaterials may thus be subject to controversy. The present model allows the comparison of osteogenic property using autologous bone and 3 types of BCP ceramics in orthotopic sites without the contribution of osteoconduction. The study demonstrated that bone did not grow in empty cylinders implanted in critical-sized defects of goat femoral epiphyses after 6 and 12 weeks. Autologous bone chips placed inside these cylinders degraded rapidly. Autologous bone resorption has previously been reported by several groups and related to the nature of grafted material and implantation

site [26–29]. Approximately 30% resorption was observed after 1 year in human sinuses [30]. Others have reported resorption values of around 47% after 6–7 months [28] and 54.8% after 18 months [29]. Zizelmann et al. [26] described bone formation and autologous bone resorption in sinus augmentation. They found that autologous bone grafts (cancellous bone) was resorbed for about 30% after 12 weeks' implantation while the resorption rate was 3 times faster (90%) for autologous bone chips. The presence of osteoclast-like and giant cells facilitated autologous bone graft resorption. Jensen et al. [27] described the presence of multinucleated osteoclast cells on the surface of different bone grafts (anorganic bovine bone, autologous bone and β -tricalcium phosphate) [27,31]. In the present study, we have also observed multinucleated cells resorbing autologous bone chips. Furthermore, autologous bone material should be in intimate contact with surrounding bone tissue in order to remain viable and fulfill its regenerative function [26]. In this model, autologous bone chips were isolated from the surrounding bone tissue by the PTFE cylinder. Although the autologous bone was in the presence of bone marrow osteoprogenitor cells, it did not serve as a scaffold for newly-formed bone but was degraded by cellular activity. On the contrary, ceramic resorption was less evident and varied with the sintering temperature of the BCP. The BCP1050 was the most microporous and resorbable ceramic, BCP1125 was slightly resorbable and BCP1200 was not at all resorbable (Tables 1 and 2). Regarding bone formation inside the cylinders filled with BCP materials, we observed that BCP1125 was the most osteogenic, and then BCP1050, while no bone was found in BCP1200 (Fig. 8). As these materials differed only in terms of their microstructure, this study demonstrates that preparation methods for bone substitutes are a critical aspect with regard to osteogenic properties. These differences might be related to their dissolution property in body fluids. Hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (β -TCP) and BCP combinations are osteoconductive, as they support bone apposition and growth, but are slowly degraded in the body [7–10]. β -TCP ceramics are more soluble in body fluids than HA. The resorption rate of biphasic calcium phosphate is between that of pure hydroxyapatite and pure tricalcium phosphate.

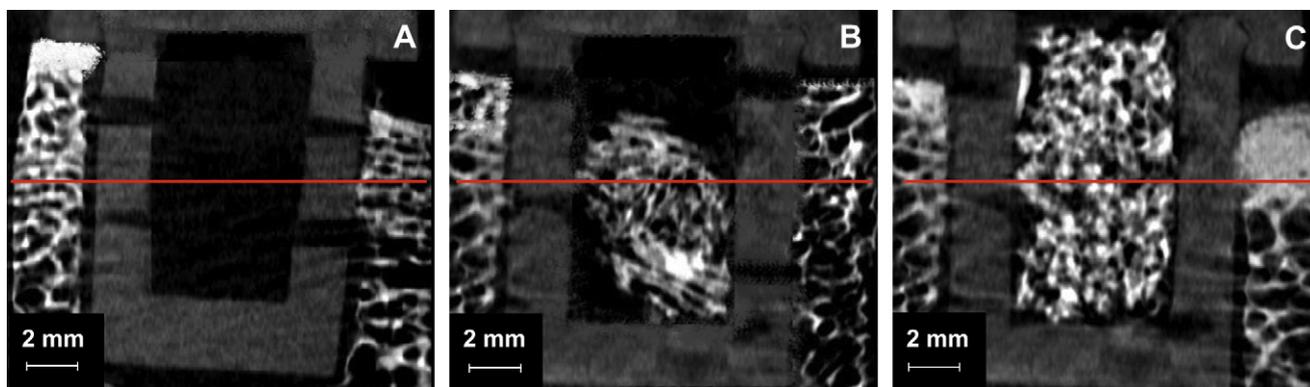


Fig. 5. Microscanner cross-section views of the PTFE cylinders 6 weeks after implantation in the femoral epiphyses of goats. (A) Left empty, (B) filled with autologous bone chips and (C) filled with BCP1050 granules. Note the considerable resorption of autologous bone compared to the ceramic. The red lines indicate the position of the histological sectioning.

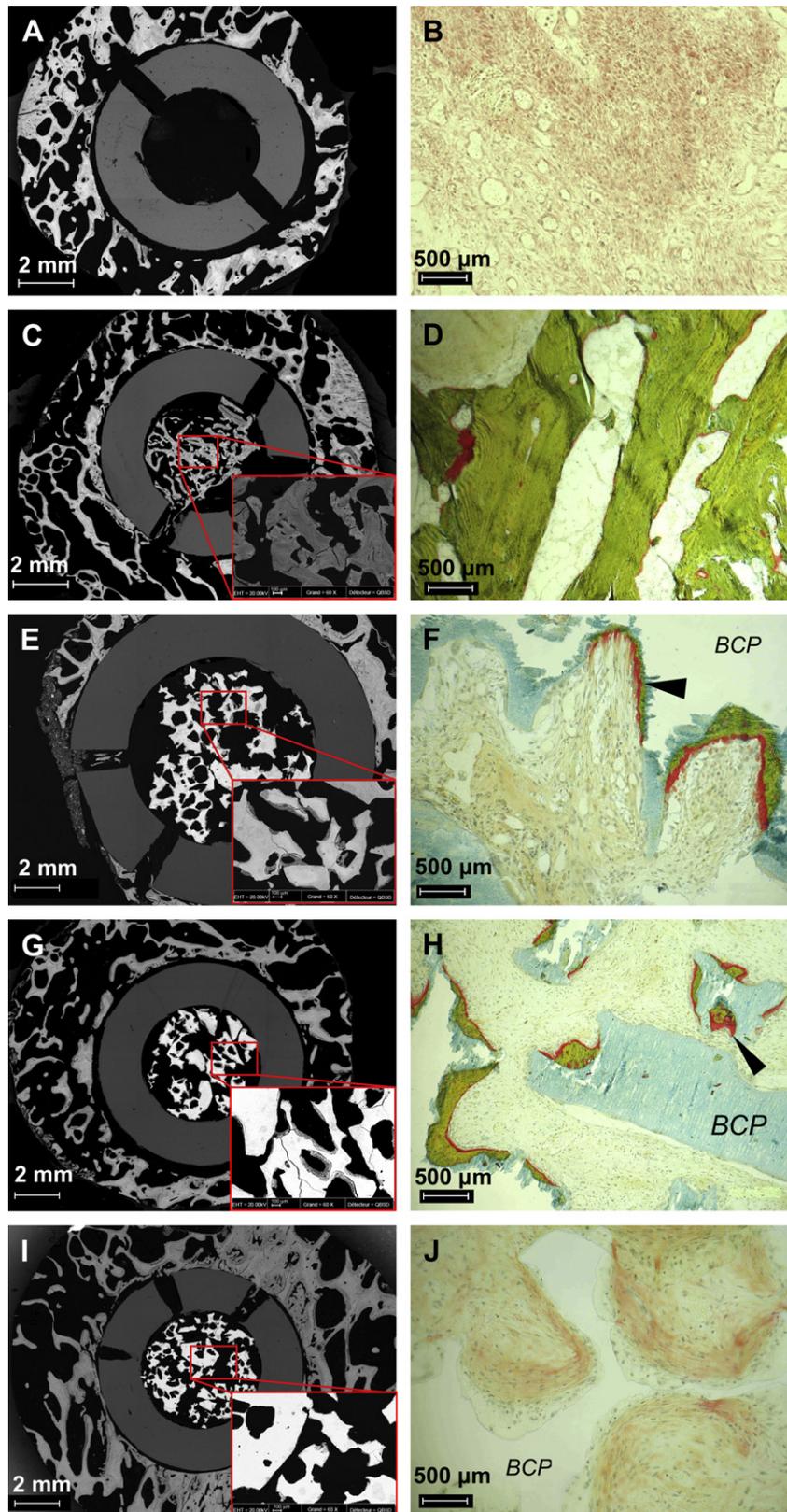


Fig. 6. BSEM and histological micrographs of the PTFE cylinders filled with autologous bone chips or BCP granules sintered at different temperatures and implanted in the femoral epiphyses of goats for 6 weeks. (A and B) Cylinder left empty, (C and D) filled with autologous bone chips, (E and F) BCP1050, (G and H) BCP1125 and (I and J) BCP1200 ceramic granules. Black arrows indicate osteoid and mineralized bone tissue in contact with BCP surface (Movat's pentachrome stain).

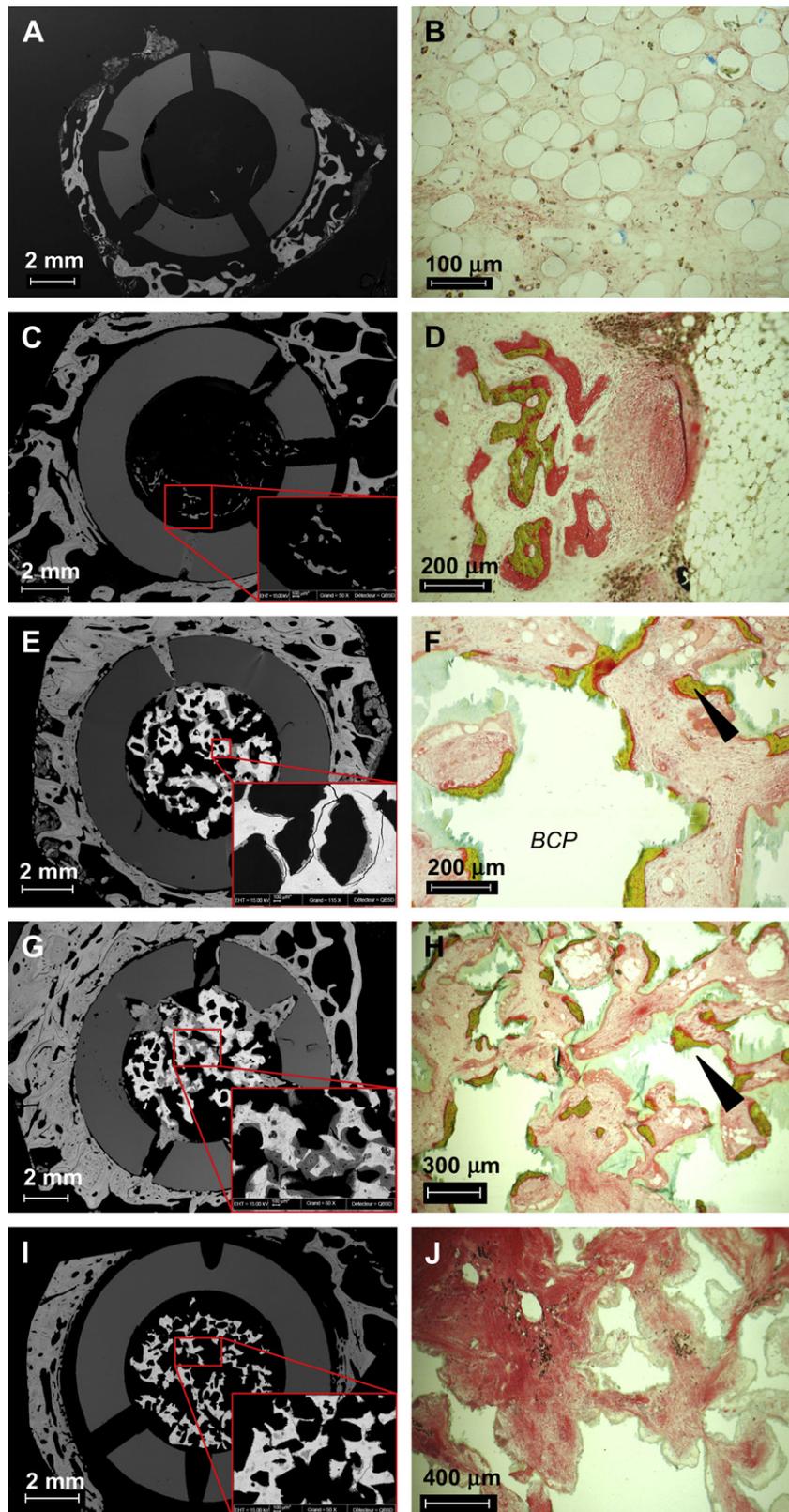


Fig. 7. BSEM and histological micrographs of the PTFE cylinders filled with autologous bone chips or BCP granules sintered at different temperatures implanted in the femoral epiphyses of goats for 12 weeks. (A and B) cylinder left empty, (C and D) filled with autologous bone chips, (E and F) BCP1050, (G and H) BCP1125 and (I and J) BCP1200 ceramic granules (Movat's pentachrome stain).

Table 2
Histomorphometric results for the empty cylinders, filled with autologous bone chips or BCP ceramic granules sintered at 1050, 1125 or 1200 °C implanted in critical-sized defects in the femoral condyle of goats for 6 and 12 weeks

Time (weeks)	Ceramic (%)			Bone (%)		
	0	6	12	0	6	12
Empty defects	NA	NA	NA	0 (n = 3)	0.07 ± 0.01 (n = 5)	0.6 ± 0.4 (n = 4)
Autologous bone	NA	NA	NA	19.41 ± 3.7 (n = 3)	18.7 ± 10.8 (n = 5)	1.67 ± 1.2 (n = 6)
BCP1050	30.35 ± 0.01 (n = 3)	25.4 ± 1.84 (n = 6)	25.0 ± 1.3 (n = 6)	0 (n = 3)	1.01 ± 1.1 (n = 6)	5.6 ± 7.3 (n = 6)
BCP1125	30.74 ± 0.23 (n = 3)	28.8 ± 1.95 (n = 6)	24.8 ± 1.1 (n = 7)	0 (n = 3)	2.05 ± 0.8 (n = 6)	9.6 ± 6.6 (n = 7)
BCP1200	29.81 ± 0.42 (n = 3)	30.04 ± 2.16 (n = 6)	26.6 ± 2.9 (n = 4)	0 (n = 3)	0.85 ± 0.4 (n = 6)	1.5 ± 1.3 (n = 4)

Percentages of ceramic and mineralized bone were also measured without implantation for initial values.

n: Sample number per group.

The BCP concept [32] is based on an optimum balance between the more stable phase (HA) and the more soluble phase (β -TCP). BCP bioceramics are soluble and gradually dissolve *in vivo*, seeding new bone formation as they release calcium and phosphate ions into the biological medium. The formation of the dynamic interface between bioactive ceramics and host bone is believed to result from a sequence of events involving interaction with cells and the formation of a carbonate hydroxyapatite (CHA) by a dissolution/precipitation process [32,33]. Bioceramics support bone formation while they partially dissolve and degrade in the body. These properties are related to their physical and chemical characteristics and microstructure, which depend on their sintering temperature. During the CaP biomaterial synthesis process, sintering temperature is a crucial step for obtaining bone substitutes with reproducible biological properties. Sintering temperature effectively modifies the microstructure, specific surface area and dissolution characteristics of CaP ceramics. High microporosity and small crystal size are essential for the adhesion, proliferation and differentiation of the osteogenic cells that will produce the bone extra cellular matrix. On the other hand, high sintering temperature decreases specific surface area and dissolution properties. The low microporosity and surface area of the BCP1200 might result in inferior dissolution rate, protein adsorption and cell colonization, which would explain the absence of bone formation.

Many authors have studied the osteoinductivity of biological grafts or biomaterials loaded with cells or osteogenic factors [8,14,22,27,34]. In studies using demineralized bone matrix (DBM) or bone morphogenetic proteins (BMPs), authors have described the initial formation of cartilage and then mineralized bone [35,36]. In the present study, we did not observe the formation of cartilage tissue or the presence of chondrocytes around the BCP granules prior to bone formation. Ripamonti et al. hypothesized that endogenous BMPs are concentrated at the surface of HA ceramics and that these cues consequently differentiate the circulating stem cells into osteoblasts forming mineralized bone tissue [37]. Other work, published by Yuan et al., suggested that BMPs do indeed play a role in osteoinduction by biomaterials, although this role does not seem to be essential [24]. The possible concentration of endogenous BMPs at the surface of CaP ceramics has not yet been clearly evidenced. Although autologous bone does contain BMPs and viable osteogenic cells, we did not observe here the formation of cartilage tissue or *de novo* bone formation, but rather its resorption. The concentration of BMPs in native bone is rather physiological as compared to BMP-loaded or BMP-concentrated materials such as DBM. These physiological concentrations may explain the absence of osteogenicity of autologous bone chips. Most of the reports studying the osteogenicity of materials have been conducted in ectopic sites while the materials are intended

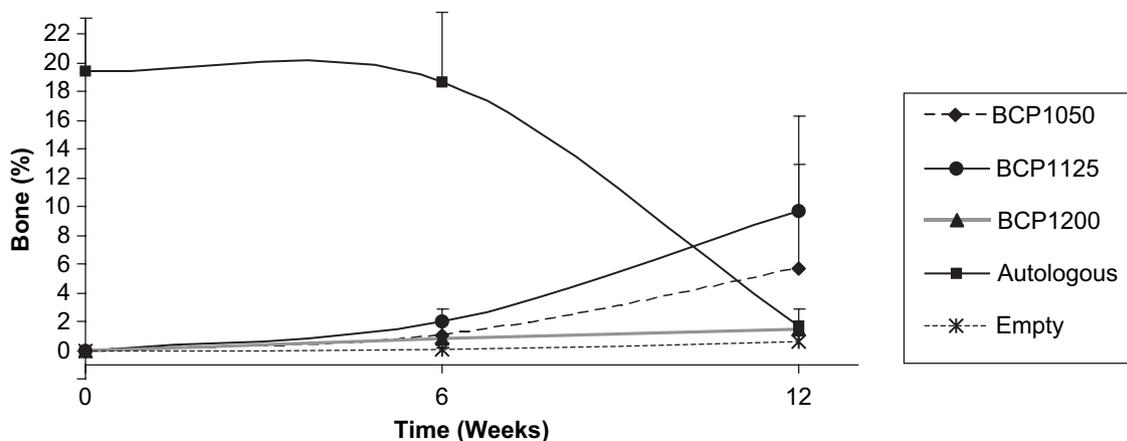


Fig. 8. Evolution in bone ingrowth inside the PTFE cylinders implanted in orthotopic sites. Cylinders were either empty, or filled with autologous bone chips, BCP1050, 1125 or BCP1200. Bone percentage was measured at time 0 (cylinders were not implanted), 6 weeks and 12 weeks.

to be used in orthotopic sites for regenerating large osseous defects.

5. Conclusion

This study compared the osteogenicity of autologous bone grafts and synthetic calcium phosphate fillers in ectopic and orthotopic sites. A model for studying osteogenicity without the contribution of osteoconduction in goat femoral condyles was developed and validated. Autologous bone chips implanted in either muscles or femoral sites rapidly resorbed, while *de novo* bone formation was not observed. The 3 types of BCP ceramic, differing only in terms of their microstructure, had different behaviors. Mineralized bone formed in contact with microporous and slightly resorbable BCP1050 and BCP1125 ceramics, while no bone formation was observed for the BCP1200 ceramic inside the PTFE cylinders. These results indicate that similar BCP ceramics interact differently with biological fluids, cells and tissues in relation to their sintering temperature. Microporous ceramics exhibit high osteogenic property for filling large bone defects when compared to dense materials or autologous bone. These osteogenic ceramics may find applications in orthopedic or maxillofacial surgery.

Acknowledgments

Borhane H. Fellah, DVM and Ph.D. student, was supported by a fellowship from the Regional Council of the Pays de la Loire, France. The authors thank the financial support provided by the 'CPER S3 Biomateriaux'. Prof. Guy Daculsi is acknowledged for his valuable scientific discussions, Sophie Sourice and Françoise Moreau for histology, Florian Boutoille for anesthesia, Anne Gouyette for Hg porosimetry measurements and Kirsty Snaith for grammar corrections of the manuscript. The company Biomatlante SAS (Vigneux de Bretagne) is acknowledged for providing the MBCP™ material.

References

- [1] Helm GA, Dayoub H, Jane Jr JA. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus* 2001;10(4):E4.
- [2] Zarate-Kalfopulos B, Reyes-Sanchez A. Bone grafts in orthopedic surgery. *Cir Cir* 2006;74(3):217–22.
- [3] Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. *J Trauma* 2006;60(6):1322–9.
- [4] Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987;18(2):187–96.
- [5] Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(3):195–200.
- [6] Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, et al. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *J Orthop Res* 2006;24(4):628–35.
- [7] Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(1):139–47.
- [8] Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 2006;24(5):867–76.
- [9] Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials – physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 2006;77(4):747–62.
- [10] Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):373–80.
- [11] Yuan H, Van Den Doel M, Li S, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13(12):1271–5.
- [12] Ripamonti U, Crooks J, Rueger DC. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg* 2001;107(4):977–88.
- [13] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36(6):1086–93.
- [14] Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Gauthier O, Moreau F, Pilet P, Spaethe R, et al. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *J Mater Sci Mater Med* 2007.
- [15] Boulter JM, LeGeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):680–4.
- [16] Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16(5):467–75.
- [17] Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Pedersen CM, Bunger C. Bone graft incorporation around titanium-alloy- and hydroxyapatite-coated implants in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1992;274:282–93.
- [18] Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(4):779–88.
- [19] Clemens JA, Klein CP, Sakkars RJ, Dhert WJ, de Groot K, Rozing PM. Healing of gaps around calcium phosphate-coated implants in trabecular bone of the goat. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):55–64.
- [20] Fagerlund G. Determination of specific surface by the BET method. *Mater Struct* 1973;6(3):239–45.
- [21] Khan SN, Cammisa Jr FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13(1):77–86.
- [22] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006;3(1):49–57.
- [23] Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(12):723–6.
- [24] Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(12):717–21.
- [25] Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials* 1996;17(22):2131–7.
- [26] Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC, Schmelzeisen R, Schramm A, Dott B, et al. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(1):69–73.
- [27] Jensen SS, Brogini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(3):237–43.
- [28] Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* 2001;30(3):157–61.

- [29] Kim KW, Ha KY, Moon MS, Kim YS, Kwon SY, Woo YK. Volumetric change of the graft bone after intertransverse fusion. *Spine* 1999;24(5):428–33.
- [30] van der Meij AJ, Baart JA, Prahl-Andersen B, Valk J, Kostense PJ, Tuinzing DB. Computed tomography in evaluation of early secondary bone grafting. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23(3):132–6.
- [31] Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(3):151–62.
- [32] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19(16):1473–8.
- [33] Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physico-chemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1989;23(8):883–94.
- [34] Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* 2007;25(6):741–9.
- [35] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Clin Orthop Relat Res* 1965;2002(395):4–10.
- [36] Bridges JB, Pritchard JJ. Bone and cartilage induction in the rabbit. *J Anat* 1958;92(1):28–38.
- [37] Ripamonti U. Tissue morphogenesis and tissue engineering by bone morphogenetic proteins. *SADJ* 1999;54(6):257–62.

III.3. Discussion

Après 6 et 12 semaines d'implantation dans les muscles de chèvre, nous n'avons pas observé d'ostéoinduction ni dans le cas de l'autogreffe osseuse ni par les céramiques de BCP. De nombreuses cellules multinucléées ainsi que des cellules géantes ont été observées autour de l'autogreffe osseuse induisant sa résorption. Deux autogreffes osseuses sur 7 n'ont pu être prélevées après 12 semaines dans les muscles. Malgré le fait que les propriétés d'ostéoinduction de l'autogreffe osseuse sont largement reconnues [189, 190], nous n'avons pas observé de néoformation osseuse (*de novo*) dans les muscles mais une forte résorption de l'autogreffe. Concernant les granules de BCP, nous avons constaté une zone de précipitation à la surface des granules de BCP frittés à 1050 et à 1125°C ainsi qu'une fibrose, mais nous n'avons pas observé de formation d'os ectopique même après 12 semaines d'implantation. Cependant, dans une étude utilisant différentes biocéramiques de phosphate de calcium dans les muscles de chien, Yuan *et al* ont démontré que la formation osseuse dépendait de la composition et de la microstructure des céramiques [125]. Des résultats précédents ont montré une formation d'os ectopique avec le même matériau (BCP 60/40). Environ 12 % d'os minéralisé a été observé entre de particules de BCP macro microporeuses ayant une composition et une microstructure semblables après implantation pendant 24 semaines dans les muscles de moutons [129]. Cette absence de formation osseuse pourrait être due à la période d'implantation (12 contre 24 semaines), au modèle animal (chèvres et moutons) ou à la quantité du matériau implanté (0,3 contre 1 g). Il a été démontré que des céramique de BCP microporeuses induisent généralement une néoformation osseuse après 12-24 semaines dans les muscles de chiens, de chèvres et de moutons [128, 129, 178]. Il a été également montré que l'ostéoinduction par des biomatériaux à base de phosphate de calcium dépend du modèle animal utilisé avec de grandes variations entre les individus [143]. Cette variabilité a été également attribuée à la taille des implants [130]. Ce phénomène d'ostéoinduction par les biocéramiques apparaît non reproductible. La méconnaissance des mécanismes biologiques menant à la formation ectopique d'os en contact avec des céramiques microporeuses contribue à ces variations de résultats.

Bien que l'implantation ectopique permette d'étudier l'ostéoinduction, ces biomatériaux sont destinés pour des comblements osseux et leur évaluation devrait être conduite dans des sites osseux. Habibovic *et al* ont comparé différentes céramiques de phosphate de calcium implantées dans des défauts de taille critique dans l'os iliaque de chèvres (diamètre de 17 millimètres, 3 mm de profondeur) [177]. Deux céramiques de BCP avec une composition, cristallinité et une macroporosité semblables, mais une microporosité différente, frittées à 1150 et à 1300°C, ont été implantées dans les muscles et dans l'os iliaque de chèvres. Après 12 semaines d'implantation intramusculaire, environ 1,5 % de néoformation osseuse est mesurée dans les macropores des disques de BCP frittés à 1150°C tandis qu'aucun signe de formation osseuse n'a été observé dans aucun des implants de BCP frittés à 1300°C. Après 12 semaines d'implantation bilatérale dans les défauts iliaques, le pourcentage d'os par surface de pore n'a pas changé de manière significative entre les deux matériaux (15,2% pour BCP1150 et 13,2% pour BCP1300) mais l'apposition osseuse était plus élevée dans le BCP1150 (13,9%) que dans le BCP1300 (8,1%) [177]. Bien que les défauts soient de taille critique, ce modèle iliaque ne supprime pas l'ostéoconduction et la comparaison stricte de l'ostéogénèse entre des biomatériaux peut être sujette à discussion.

Notre modèle permet la comparaison des propriétés ostéogéniques de l'autogreffe osseuse et de 3 types de céramique de BCP dans des sites osseux sans la contribution de l'ostéoconduction. En effet, l'étude n'a pas démontré de néoformation osseuse dans les cylindres vides implantés dans des défauts de taille critique au niveau des épiphyses fémorales de chèvre après 6 et 12 semaines. L'autogreffe osseuse placée à l'intérieur de ces cylindres était rapidement dégradée. La résorption d'os autologue a été précédemment rapportée par plusieurs groupes et est liée à la nature et au site d'implantation de la greffe [75, 191-193]. Il a été observé approximativement 30 % de résorption après 1 an dans les sinus humains [194]. D'autres auteurs ont rapporté des valeurs de résorption d'environ 47 % après 6-7 mois [192] et de 54,8 % après 18 mois d'implantation [193]. Zizelmann *et al* ont décrit la formation d'os et la résorption d'autogreffe osseuse dans l'augmentation de sinus [75]. Ils ont constaté que les autogreffes osseuse (os cortical) étaient résorbées à environ 30 % après 12 semaines d'implantation tandis que le taux de résorption était trois fois plus rapide (90 %) pour les copeaux d'os autologue. La présence d'ostéoclastes et des cellules géantes facilitent la résorption de l'autogreffe osseuse. Jensen *et al* ont décrit la présence de cellules

multinucléées et d'ostéoclastes sur la surface de différentes autogreffes osseuses (os bovin inorganique, os autologue et phosphate tricalcique bêta β -TCP) [191 , 195].

Dans cette étude, nous avons également observé des cellules multinucléées et une forte résorption de l'autogreffe osseuse (19% avant implantation, 18,7% après 6 semaines et 1,67% après 12 semaines). Il semble que l'autogreffe osseuse doit être en contact intime avec le tissu osseux environnant afin de conserver sa viabilité et accomplir sa fonction régénératrice [75]. Dans ce modèle, l'autogreffe osseuse était isolée du tissu osseux environnant par les cylindres de PTFE. Bien qu'elle soit dans un environnement favorable, en présence de cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse, les copeaux d'os autologue n'ont pas servi de support à la néoformation osseuse mais ont été dégradés par l'activité cellulaire. La résorption de la céramique était moins évidente et dépendait de la température de frittage. Le BCP1050 est la céramique la plus microporeuse et la plus résorbée (25% après 12 semaines). Le BCP1125 était légèrement resorbable (24%) et BCP1200 était peu résorbé (27%). Concernant la formation osseuse à l'intérieur des cylindres remplis de BCP, nous avons observé que le BCP1125 était le plus ostéogénique, puis le BCP1050, alors qu'aucune formation osseuse n'a été trouvée dans le BCP1200. Sachant que ces matériaux diffèrent seulement par leur microstructure, cette étude démontre que les méthodes de préparation des substituts osseux conditionnent fortement leurs propriétés ostéogéniques. Ces différences pourraient être liées à leur propriété de dissolution en contact avec les fluides biologiques. L'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique bêta (β -TCP) et leurs combinaisons (BCP) sont ostéoconducteurs, car ils supportent l'apposition et la croissance osseuse, mais sont lentement dégradés. Le β -TCP est plus soluble dans les fluides corporels que l'HA. Le taux de résorption des phosphates de calcium biphasés est compris entre celui de l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique. Le concept de BCP est basé sur l'équilibre optimum entre la phase la plus stable (HA) et la phase la plus soluble (β -TCP) [102]. Les biocéramiques de BCP sont solubles et se dissolvent graduellement *in vivo*, elles permettent une néoformation osseuse car elles libèrent des ions de calcium et phosphate dans le milieu biologique. La formation d'une interface dynamique entre la céramique bioactive et l'os est le résultat d'une succession d'événements impliquant la formation de carbonate d'hydroxyapatite (CHA) par un processus de dissolution/précipitation et l'interaction avec les cellules [102, 196].

Les propriétés biologiques des céramiques sont liées à leurs caractéristiques physicochimiques et à leur microstructure, qui dépendent de leur température de frittage.

Pendant le processus de synthèse des biomatériaux phosphocalciques, la température de frittage est une étape cruciale pour obtenir des produits de substitution osseuse avec des propriétés biologiques reproductibles. La température de frittage modifie efficacement la microstructure, la surface spécifique et les caractéristiques de dissolution des céramiques phosphocalciques. Une microporosité élevée et des cristaux de petite taille sont des éléments essentiels pour l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules ostéogéniques qui produiront la matrice osseuse extracellulaire. D'autre part, une température de frittage élevée diminue la surface spécifique et les propriétés de dissolution. La faible microporosité ainsi que la faible surface spécifique du BCP1200 pourraient être la conséquence d'une faible dissolution, d'adsorption de protéine et d'une faible colonisation des cellules, ce qui expliquerait l'absence de la formation de tissu osseux. Beaucoup d'auteurs ont étudié l'ostéoinduction par des greffes biologiques chargées avec des cellules ou de facteurs ostéogéniques [130, 182, 190, 191, 197]. Dans les études utilisant des matrices osseuses déminéralisées (DBM) ou les protéines de morphogénèse osseuse (BMPs), les auteurs ont décrit une formation initiale de cartilage suivie d'os minéralisé [45, 117]. Dans cette étude, nous n'avons pas observé de formation de cartilage ou la présence de chondrocytes autour des granules de BCP avant la formation osseuse. Ripamonti *et al* ont proposé que les BMPs endogènes se concentrent sur la surface de la céramique d'HA et permettent une différenciation de cellules souches circulantes en cellules ostéoblastiques formant le tissu osseux minéralisé [145]. D'autres travaux, publiés par Yuan *et al*, suggèrent que les BMPs jouent en effet un rôle primordial dans l'ostéoinduction par les biomatériaux [198]. La concentration possible de BMPs endogène sur la surface des céramiques phosphocalciques n'a pas encore été clairement démontrée. Bien que l'autogreffe osseuse contienne des BMPs et des cellules ostéogéniques viables, dans cette étude nous n'avons pas observé de formation d'un tissu cartilagineux ni de néoformation osseuse (*de novo*), mais plutôt une résorption de la greffe. La concentration des BMPs dans l'os naturel est plutôt physiologique par rapport aux matériaux chargés par des BMPs ou elles sont plus concentrés tels que les DBM. Ces concentrations physiologiques peuvent expliquer l'absence de l'ostéogénicité de l'autogreffe osseuse. La plupart des rapports ayant étudié l'ostéogénicité des matériaux ont été réalisées dans des sites ectopiques tandis que les matériaux sont prévus pour être utilisés en sites osseux afin de régénérer des défauts osseux de grande taille.

Dans ce chapitre, nous avons comparé l'ostéogénicité de l'autogreffe osseuse et des substituts synthétiques de phosphate de calcium dans des sites ectopiques et osseux. Un modèle permettant d'étudier l'ostéogénicité sans la contribution de l'ostéoconduction dans les condyles fémoraux de chèvre a été développé et validé. Des copeaux d'os autologue implantés dans les muscles ou au niveau des sites fémoraux se résorbent rapidement, alors qu'il n'a pas été observé de néoformation osseuse. Les trois types de céramiques de BCP, différent seulement en termes de leur microstructure, présentent différents comportements. De l'os minéralisé s'est formé en contact avec la céramique microporeuse qui été légèrement résorbée (BCP1050 et BCP1125), alors qu'on n'a observé aucune formation osseuse par le BCP1200 à l'intérieur des cylindres de PTFE. Ces résultats indiquent que ces céramiques de BCP interagissent différemment avec les fluides, les cellules et les tissus biologiques suivant leur température frittage. Les céramiques microporeuses présentent des propriétés ostéogéniques supérieures pour combler des défauts osseux de grande taille en comparaison aux matériaux denses. Ces céramiques ostéogéniques pourraient trouver des applications dans la chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale. Cependant, les mécanismes biologiques responsables de leurs propriétés ostéogéniques restent encore mal compris.

Chapitre IV:

Effets des microparticules de céramique phosphocalcique biphasée

in vivo et in vitro

IV.1. Introduction

IV.2. ARTICLE 3 :

Etude de la réaction inflammatoire dans les muscles de rats après implantation de microparticules de phosphate de calcium biphasé

IV.3. ARTICLE 4 :

Etude de la réponse de cellules macrophagiques et d'ostéoblastes après culture avec des microparticules de phosphate de calcium

IV.4. Discussion

IV.1. Introduction

Le défi actuel dans la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale est la reconstruction de défauts osseux de grande taille. La greffe osseuse autologue, est considérée comme « le modèle de référence » dans la reconstruction osseuse grâce à ses propriétés ostéogéniques, ostéoconductives et ostéoinductrices [68, 179, 199]. Cependant, l'utilisation de l'autogreffe osseuse est limitée car elle nécessite un second site opératoire (ex. la crête iliaque), n'est disponible qu'en quantité limitée et souvent associée à des complications au niveau du site de prélèvement. Les biocéramiques à base de phosphate de calcium sont disponibles en quantités suffisantes et sous différentes formes : poudres, granules, blocs macroporeux et injectables pour le comblement des défauts osseux. Pendant les deux dernières décennies, l'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique bêta (β -TCP) ainsi que les biocéramiques de phosphate de calcium biphasées (BCP) ont été largement utilisées en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale et dentaire [200, 201]. Les biocéramiques sont biocompatibles, bioactives et ostéoconductives [93, 180]. Dans le concept de bioactivité des BCP, la phase β -TCP se dissout dans les fluides biologiques libérant des ions calcium et phosphate menant à la précipitation d'une apatite biologique sur les cristaux insolubles de la phase HA. Cette précipitation d'apatite biologique incorpore diverses protéines et sert de substrat aux cellules ostéoblastiques qui produisent la matrice osseuse extracellulaire ayant pour résultat l'apposition directe d'un tissu osseux minéralisé sur la surface de la céramique par ostéoconduction [101]. Cependant, ces matériaux synthétiques manquent généralement de propriétés ostéogéniques et ostéoinductives pour régénérer de grandes pertes du tissu osseux. Plusieurs études ont récemment rapporté l'induction de tissu osseux par certaines biocéramiques implantées dans les muscles ou en sites sous cutanées dans divers modèles animaux [129, 130, 202]. Après implantation dans des sites ectopiques pendant plusieurs semaines, la formation d'os minéralisé a été observée à l'intérieur des céramiques macro microporeuses, pourtant ces matériaux n'ont pas été associés à des cellules (ex. CSM) ou à des facteurs ostéogéniques (BMPs). Bien que le mécanisme biologique précis menant à l'ostéoinduction par les biocéramiques demeure inconnu, plusieurs groupes ont montré que la présence d'une microstructure à la surface de la céramique est un préalable à la formation d'os ectopique [129, 136, 203]. Cette microporosité entre les grains de la céramique est due à

une température de frittage relativement basse (900-1100°C) mais dépend aussi de la poudre de phosphate de calcium utilisée, du processus de fabrication et du temps de frittage/refroidissement. En outre, la microporosité peut influencer la cohésion du matériau *in vivo* car la dissolution des joints de grain serait plus importante pour les matériaux microporeux par rapport à un matériau dense. Cette dissolution des joints de grain dans les fluides physiologiques peut mener à la libération de microparticules à proximité des biocéramiques [109, 154, 155]. Ces microparticules activeraient alors les macrophages, les cellules géantes et les lymphocytes qui libèrent à leurs tours des cytokines spécifiques [165, 204-207]. Ces cytokines pourraient permettre une différenciation des cellules souches en cellules ostéoprogénitrices. Cette cascade d'événements biologiques pourrait être semblable à celles de la cicatrisation osseuse suite à une fracture. En effet, les débris et les microparticules d'os minéralisé sont souvent observés à l'intérieur des fractures. Ces microparticules sont d'abord dégradées par des macrophages et des ostéoclastes avant la production d'une matrice extracellulaire osseuse par des cellules ostéoprogénitrices. Le rapport entre les cellules phagocytaires (macrophages et ostéoclastes) et les cellules formant l'os a été décrit par de nombreuses études [165, 204, 205, 206, 207, 208, 209]. Ces études ont permis d'analyser les effets des nano- ou des microparticules *in vitro* employant des macrophages et/ou ostéoblastes sur la sécrétion de plusieurs cytokines [208, 209].

Notre hypothèse est que ces microparticules activeraient des macrophages libérant les cytokines inflammatoires qui favoriseraient la différenciation ostéoblastique à partir de cellules souches mésenchymateuses.

Dans un premier article, nous avons abordé l'étude de la réaction inflammatoire dans l'environnement proche des microparticules d'une biocéramique biphasée (HA/ β -TCP 60/40) implantée dans des muscles de rats. Nous avons étudié les réactions induites par ces microparticules de BCP frittées à haute température (1200°C pendant 5 heures) après 7, 14 et 21 jours d'implantation dans les quadriceps. Trois tailles de microparticules de BCP ont été utilisées (< 20, 40-80 et 80-200 μ m).

Dans un second article, nous avons analysé l'effet de ces microparticules de BCP sur la libération de cytokines (TNF- α et IL-6) par des macrophages (J774) et leur action sur la différenciation ostéoblastique (MC3T3-E1). D'abord, nous avons étudié la viabilité des

macrophages et des cellules ostéoblastiques en contact avec les microparticules de BCP. Par la suite, la différenciation des cellules ostéoblastique a été déterminée par RT-PCR en présence des cytokines pro inflammatoires (TNF- α et IL-6).

**Etude de la réaction inflammatoire dans les muscles
de rats après implantation de microparticules de
phosphate de calcium biphasé**

Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles

Borhane H. Fellah · Nicolas Josselin ·
Daniel Chappard · Pierre Weiss · Pierre Layrolle

Received: 16 June 2006 / Accepted: 19 September 2006
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Abstract Several studies have shown that macro micro porous bioceramics ectopically implanted promote bone tissue formation. This study aims at investigating the inflammatory response towards biphasic calcium phosphate (BCP) ceramic micro particles. BCP composed of hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate, HA/ β -TCP ratio of 50/50, were prepared by sintering at 1200°C for 5 h. After crushing, 3 fractions of BCP micro particles <20, 40–80 and 80–200 μm were sieved. The micro particles were carefully characterized by using X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and laser scattering. The inflammatory reactions induced by BCP micro particles implanted in quadriceps muscles of rats for 7, 14 and 21 days were studied by histology ($n = 8/\text{group}$). A fibrous tissue encapsulation of the BCP micro particles implanted in muscle tissue was observed and fibrosis was similar for the 3 groups of micro particles. The comparison of the cellular response indicated that the total number of cells was significantly higher for BCP <20 μm than for 40–80 and 80–200 μm ($p < 0.0001$). The number of macrophages was relatively higher for the smallest than for the intermediate and largest fractions ($p < 0.0001$). The relative percentage of giant cells was higher for the intermediate and largest size of particles than for the smallest. The number of lymphocytes was comparable for the 3 fractions and after the 3 delays. Therefore, the BCP micro particles <20 μm initiated an inflammatory response which might play an important role in osteogenesis.

1 Introduction

The current challenge in orthopaedic and maxillofacial surgeries is the reconstruction of large bone defects. Autologous bone graft is considered as the gold standard in bone reconstruction because it has osteogenic, osteoinductive, osteoconductive and resorbable properties [1–3]. Nevertheless, autologous bone graft must be harvested from another surgical site (e.g. iliac crest) prior to fill a bone defect. It is therefore limited in quantity, less than 20 cm^3 , and often associated with complications at the harvesting site. Calcium phosphate bioceramics have been prepared in different forms such as powders, granules, macroporous blocks for filling bone defects. During the last two decades, Hydroxyapatite (HA), β -tricalcium phosphate (β -TCP) and biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics have been widely used in orthopaedic, maxillofacial and dental surgery [4, 5]. Bioceramics have biocompatible, bioactive and osteoconductive properties [6, 7]. However, these synthetic materials generally lack osteogenic and osteoinductive properties for regenerating large amounts of bone tissue. Several studies have recently reported the induction of bone tissue by certain bioceramics implanted in muscles or subcutis of various animal models [8–11]. After implantation in these ectopic sites for several weeks, mature and mineralized bone tissue formation has been observed inside macro and micro porous ceramics even though the materials were not combined with osteogenic cells or factors, e.g. bone morphogenetic proteins. Although the precise biological mechanism leading to bone induction by bioceramics remains unknown, several groups have shown that the presence of micropores about 0.1–5 μm in diameter at the surface of ceramics is a prerequisite for ectopic bone formation [11–13]. This microporosity located between ceramic grains is related to relatively low sintering temperature

B. H. Fellah (✉) · P. Weiss · P. Layrolle
INSERM U791, Laboratory for Osteoarticular and Dental Tissue
Engineering, Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France
e-mail: borhane.fellah@univ-nantes.fr

N. Josselin · D. Chappard
INSERM EMI 0335, LHEA, 49045, University of Angers, Cedex,
France

(900–1100°C) but obviously depends on the starting calcium phosphate powder, manufacturing process and heating/cooling time. Furthermore, the microporosity may influence the material cohesion *in vivo* as the dissolution of grain boundaries would be higher for micro porous than fully sintered materials. This dissolution of grain boundaries in physiological fluids may lead to the release of microparticles at the vicinity of bioceramics [14–16]. These microparticles would then activate macrophages, giant cells and lymphocytes which will release specific cytokines [17–21]. These cues could interact with circulating stem cells or other types for differentiating them into osteoblasts producing bone tissue. This cascade of biological events could be similar to those occurring in the healing of bone fractures. Indeed, micro debris and particles of mineralized bone are often observed inside bone fractures. These micro particles are first degraded by macrophages and osteoclasts prior to the production of a new extracellular bone matrix by osteoprogenitor cells. The relationship between tissue degrading cells like macrophages and osteoclasts and bone forming cells has been subjected of numerous reports [17–23]. These studies have investigated the effect of nano- or micro-sized particles *in vitro* using macrophages and/or osteoblasts on the secretion of several cytokines [22, 23]. It has been found that high amounts of cytokines such as transforming necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) were produced by macrophages in the presence of micro particles [20]. In addition, a decrease in cell viability was observed in contact with micro-particles [14]. Although considerable work has been done *in vitro*, only a limited number of studies have been conducted *in vivo* using micro particles [14, 15]. Malard and collaborators have implanted BCP particles having sizes of 10–20, 80–100 and 200–400 μm in critical sized bone defects of rats for 7, 14 and 21 days. The best bone ingrowth, together with the higher resorption/degradation rate and stronger inflammatory reactions were observed for BCP particles of 10–20 μm than for the other sizes. The authors suggested that a strong, but brief, inflammatory reaction associated with micro particles which implies a massive release of cytokines, was favourable to the bone healing process. Another study conducted with various bone-substitute materials implanted in intraosseous and subcutis of rat demonstrated different biological responses [16]. However, the difference in biological behaviours was mainly related to the chemical composition of the implanted materials and not to their particle size.

The present study aims at investigating the micro environment beside microporous bioceramic particles implanted in muscles of rats. We have investigated the inflammatory reactions induced by BCP micro particles sintered at high temperature (1200°C for 5 h) implanted in muscles of rats for 7, 14 and 21 days. Three sizes of BCP micro particles <20, 40–80 and 80–200 μm were carefully characterized by

using X-ray diffraction (XRD), Fourier-Transform Infrared spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and laser scattering. These fractions implanted in quadriceps muscles of rats were then studied by histology in order to determine the cells and tissue reactions.

2 Materials and methods

2.1 Preparation and characterization of BCP micro particles

Calcium deficient apatite (CDA) was prepared by hydrolyzing dicalcium phosphate dehydrate (DCPD) as previously described [24]. After sintering at 1200°C for 5 h, the CDA transformed into a mixture of Hydroxypatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) named biphasic calcium phosphate (BCP). The sintered BCP ceramic was crushed and sieved into particle fractions of <20 μm , 40–80 μm and 80–200 μm using certified sieves (Fritsch, Analysette, Germany). The 3 fractions were analyzed using powder X-ray diffraction (Philips, PW 1730, France) with a $\text{CuK}\alpha$ source operated at 40 kV and 30 mA. The microstructure and particle size distribution of the 3 fractions were observed by scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450 VP). For SEM observations, the BCP particles were deposited onto carbon tape and Au-Pd sputtered (Denton Vacuum, Desk III, UK). For the determination of particle size, samples were scanned using backscattered electron and images were analyzed using a semi-automatic image analyser (Quantimet 500, Leica, UK). The size and number of particles were determined using a custom made program. Particle size was also measured using laser scattering (Coulter LS 230, Coultronics, France). Three measurements were performed on each sample. Results were reported as mean diameter (μm) as function of volume (%). After characterization, the 3 fractions were put into glass Pasteur pipettes and sterilized by heating at 200°C for 2 h.

2.2 Animal model and surgical procedure

All animals handling and surgical procedures were conducted according to the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE). The study protocol was submitted for approval to the local animal care and safety committee. The experiments were performed according to Good Laboratory Practices (GLP) at the Faculty of Medicine of Nantes within approved experimental facilities. Experiments were performed using 36 Wistar Han rats, males, 7 weeks old, weighting 250–275 g (Charles River, France). Rats were housed (four per cage), with water and food at will. The animals were placed in quarantine for at least 10 days prior to surgery. Rats were under general anaesthesia with a halogenous compound, oxygen/Isotrurane (Forane®),

Abbott laboratories, UK). After shaving and disinfection of both legs, a lateral skin incision was made according to the axis of the femur. An intramuscular pocket was created in the quadriceps muscle using blunt dissection. About 0.3 g of BCP micro particles were put into the muscle pocket. Muscle and skin were sutured in layers using resorbable sutured (Vicryl 3-0, Ethicon, France). The same procedure was applied bilaterally thus, giving 2 implants per animal. After surgery, no antibiotic treatment was administered. Animals were sacrificed 7, 14 and 21 days after surgery using an intra cardiac over dose of sodium pentobarbital (Dolethal, Vetoquinol, France). Samples were retrieved and immediately fixed in neutral formol (10%) for 24 h. Samples were then decalcified, dehydrated and embedded in paraffin. Thin sections (approx. 7 μm) were made in the middle of the sample using microtome (Microm HM355). Hemalun-Phloxine-Safran (HPS) staining was performed on the sample slices using an automated coloration apparatus. All groups were analysed under light microscopy (Olympus Bx 50). Each slice was divided into 10 fields and cell counting was performed by an anatomopathologist (Nicolas Josselin, MD). The number of giant cells, macrophages and lymphocytes was determined. The thickness of the fibrous tissue layer around the implanted BCP particles was semi-quantitatively analyzed using a score index of 0–2; with score 2 corresponding to a thick fibrous capsule. The fibrosis was an indicator for the persistence of the immune response. Two measures were performed on each sample.

2.3 Statistical analysis

All data were expressed as average \pm standard deviation and examined using one-way analysis of variance ANOVA using the XL Stat 6.0 software. The results were considered significant for p values <0.05 .

3 Results

3.1 Physicochemical characterization of the BCP particles

Three fractions of BCP particles, $<20 \mu\text{m}$, $40\text{--}80 \mu\text{m}$ and $80\text{--}200 \mu\text{m}$, were prepared and characterized. As shown in Table 1, the BCP fractions were solely composed of HA and

β -TCP phases in a weight ratio of approximately 50/50 giving a molar Ca/P ratio of 1.58. As shown in Fig. 1, the BCP fractions were composed of rounded particles having the expected sizes. At high magnification, the surface of BCP particles appeared well-sintered with some remaining microporosity and a rough surface (Fig. 1(b)). Two techniques, SEM and laser scattering, were used to determine the particle size distribution. As shown in Table 1, the three fractions of BCP micro particles had average particle size of 4.2, 62 and 102 μm using the SEM method and 6, 67 and 138 μm using the laser scattering measurement. Both methods provided with similar results for average particle sizes. The particle size distribution of the 3 fractions is shown in Fig. 2. The 3 fractions exhibited a Gaussian particle size distribution centred approximately on their average value. Although some larger particles were present, most of the particles had size within the intervals $<20 \mu\text{m}$, $40\text{--}80 \mu\text{m}$ and $80\text{--}200 \mu\text{m}$.

3.2 Histological analysis

The 3 fractions of BCP micro particles $<20 \mu\text{m}$, $40\text{--}80 \mu\text{m}$ and $80\text{--}200 \mu\text{m}$ were bilaterally implanted in quadriceps muscles of rats for 7, 14 and 21 days. The study was designed using a number of 8 implants per group. All animals (36 rats) recovered well from surgery without complications and all implantation sites healed. Histological observations indicated a normal fibrous tissue encapsulation of the BCP microparticles implanted in muscles. As shown in Fig. 3, several inflammatory cells were observed in the implantation area. These cells were multinuclear macrophages, giant cells and mature lymphocytes. The macrophage cells were principally in contact with the BCP microparticles while other cell types were present in the interstitial tissue between the BCP micro particles. Table 2 gathers the total number of cells and the thickness of the fibrous tissue capsule measured around the BCP micro particles. For the fraction $<20 \mu\text{m}$, the total number of cells remained constant over the implantation periods of 7, 14 and 21 days. For micro particles in the range $40\text{--}80 \mu\text{m}$, the total number of cells was approximately double after 7 days as compared to longer implantation delays of 14 and 21 days. Regarding the large micro particles of $80\text{--}200 \mu\text{m}$, a slightly higher number of cells were found after 7 days than after 14 and 21 days. The comparison of

Table 1 Physicochemical properties of the BCP micro particles

Fractions	HA (wt%)	β -TCP (wt%)	Ca/P	CO ₃	CaO	Mean particle size \pm S.D. (μm)	
$<20 \mu\text{m}$						4.2 \pm 2.75 ^(a)	6.1 \pm 6.1 ^(b)
$40\text{--}80 \mu\text{m}$	50.2	49.8	1.58	No IR peaks	Not detect.	61.8 \pm 33.2 ^(a)	66.9 \pm 11 ^(b)
$80\text{--}200 \mu\text{m}$						102.1 \pm 60.2 ^(a)	137.6 \pm 26.8 ^(b)

^(a) Measured by BSEM and image analysis,

^(b) Measured by laser scattering.

Table 2 Total average number of cells and thickness of the fibrous tissue capsule measured for BCP micro particles with size of <math><20\ \mu\text{m}</math>, $40\text{--}80\ \mu\text{m}$ and $80\text{--}200\ \mu\text{m}$ implanted in muscles of rats for 7, 14 and 21 days (* $N = 8$)

Fractions	Implantations time (days)	Total average number of cells per field $\times 10$	Fibrosis*
<math><20\ \mu\text{m}</math>	7	860 \pm 285	1.7 \pm 0.6
	14	926 \pm 341	1 \pm 1.1
	21	947 \pm 238	1.5 \pm 0.6
$40\text{--}80\ \mu\text{m}$	7	755 \pm 167	1 \pm 0.8
	14	480 \pm 23	1.2 \pm 0.9
	21	460 \pm 36	0.5 \pm 0.5
$80\text{--}200\ \mu\text{m}$	7	678 \pm 134	1.25 \pm 0.5
	14	550 \pm 73	1 \pm 0.8
	21	517 \pm 98	2

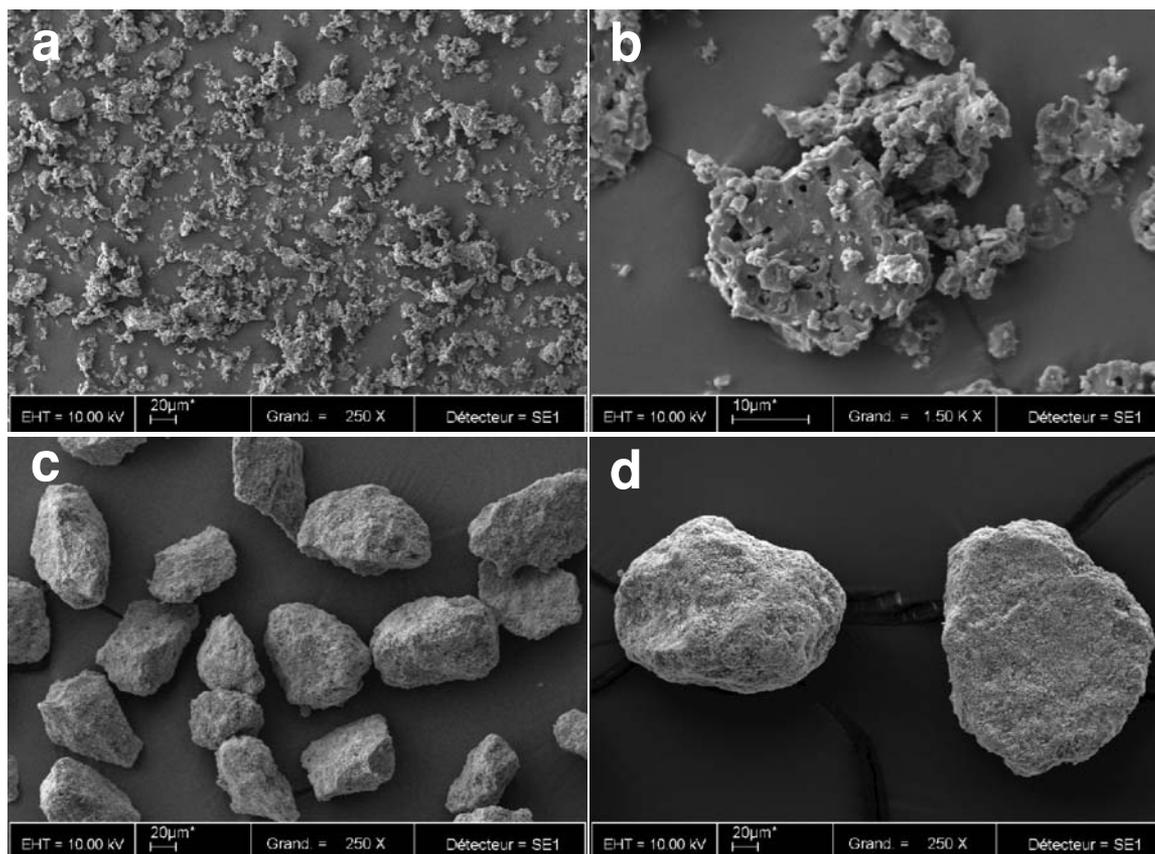
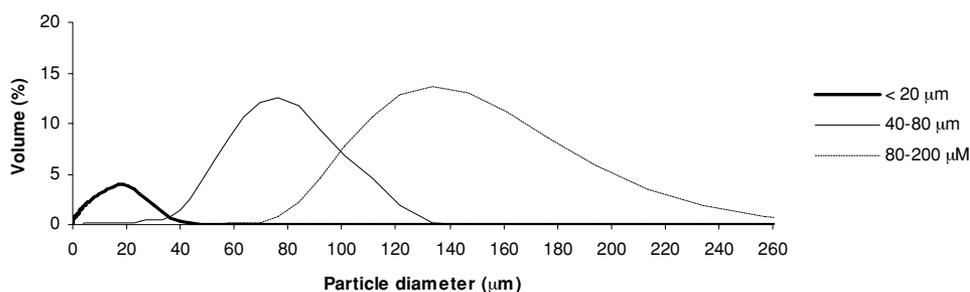


Fig. 1 SEM micro graphs of the BCP micro particles. (a, b) particle size <math><20\ \mu\text{m}</math>, (c) $40\text{--}80\ \mu\text{m}$ and (d) $80\text{--}200\ \mu\text{m}$. (b) Note the surface structure of micro particles

Fig. 2 Microparticles size distribution of the 3 BCP fractions measured by laser scattering



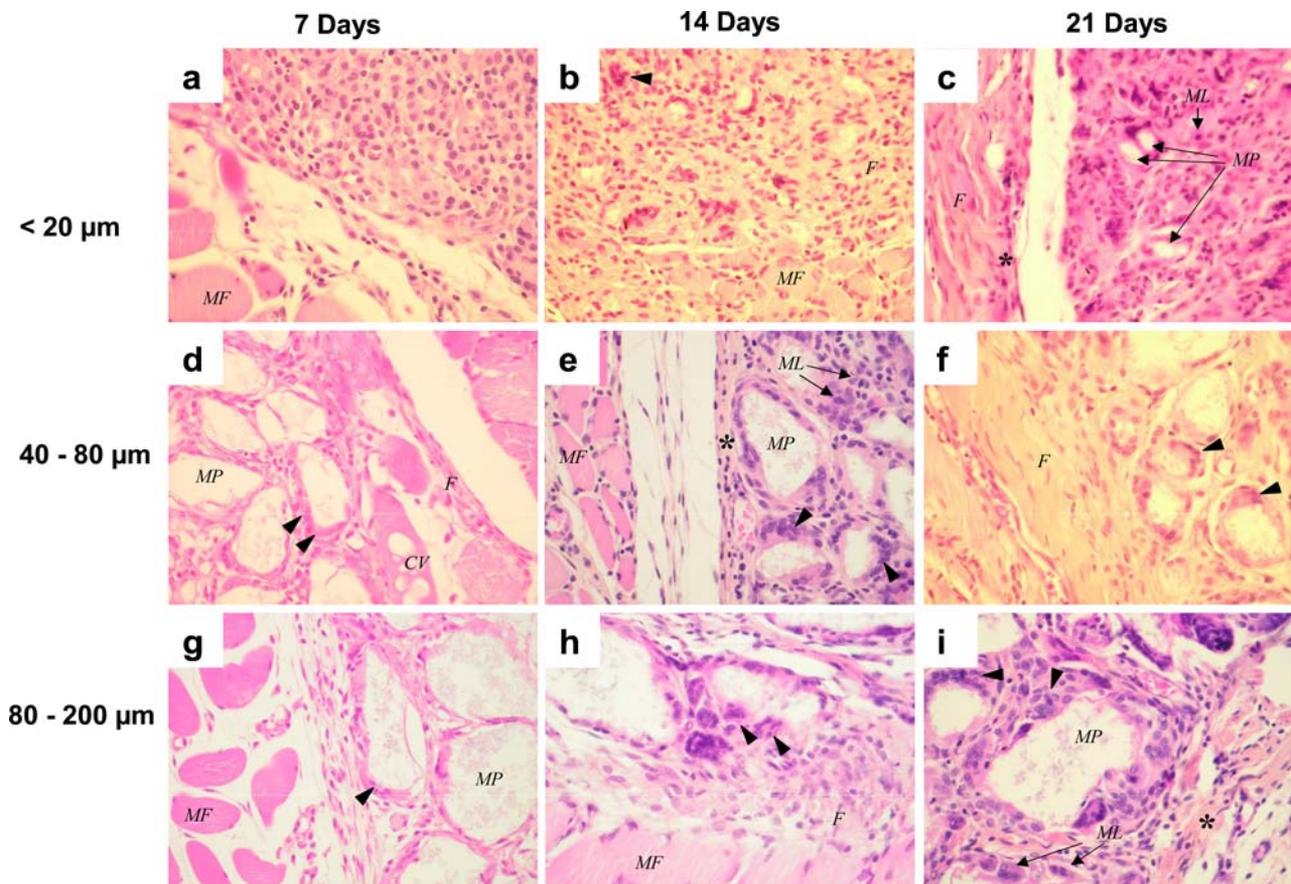


Fig. 3 Histological sections of BCP microparticles implanted in rats muscles. MF: muscle fiber, *: conjunctive capsule consists of fine collagen fibre, ML: mature lymphocyte, F: fibrosis which represents the last step of inflammation and isolate ceramic particles from rat muscles,

MC: macrophage cells, MP: micro particles, CV: congestive blood vessels, Arrowheads indicated multinucleated giant cells. Magnification × 800

the cellular response given for the 3 fractions indicated that the total number of cells were significantly higher for BCP <20 μm than for 40–80 and 80–200 μm ($p < 0.0001$). A similar trend was observed for the thickness of the tissue capsule around the implanted BCP micro particles. Fibrosis was similar for the smallest micro particles <20 μm over the 3 delays of implantation. For the intermediate size of 40–80 μm, fibrosis decreased with the implantation time while it maintained for the largest particles. However, the comparison of fibrosis for the 3 fractions was not significantly different due to the semi-quantitative scoring of the method.

Figure 3 illustrates the muscle tissue response towards the BCP micro particles of different size implanted for 7, 14 and 21 days. The muscles fibres (MF) are clearly identified around the implanted micro particles (MP). The BCP micro particles are not observable on these decalcified histological sections but their locations are visible as translucent spaces. For the smallest micro particles of <20 μm, numerous macrophages and some mature lymphocytes and giant cells were observed after all implantation delays (Fig. 3(a–c)). Non nucleated macrophages were noticed after 7 days (Fig.

3(a)). Various inflammatory cells and bounded macrophages were found after 14 days (Fig. 3(b)). At 21 days, a fibrous capsule surrounded the BCP microparticles <20 μm and the collagen layer was infiltrated by fibroblasts (Fig. 3(c)). For the intermediate fraction of 40–80 μm, a thin fibrous capsule (F) was formed after 7 days of implantation. Rather important vessel congestion was also observed (Fig. 3(d)). Vessel congestion is a fundamental step in body inflammatory reaction and characterized by an increase of blood vessel diameter.

A fibrous capsule was present on sample sections after 14 and 21 days (Fig. 3(e, f)). As previously observed, macrophages and Giant cells were the predominant type of cells while only few mature lymphocytes were observed in between the BCP micro particles of 40–80 μm. The cellular and tissue response towards BCP microparticles of 80–200 μm is shown in Fig. 3(g–i)). Neither inflammation nor fibrosis was observed after 7 days around the large implanted micro particles (Fig. 3(g)). After 14 days, a fibrous capsule was formed with a few cell reactions compared to 21 days (Fig. 3(h) and (i)). A congestive capsule with abundant lymphocytes and macrophages around BCP 80–200

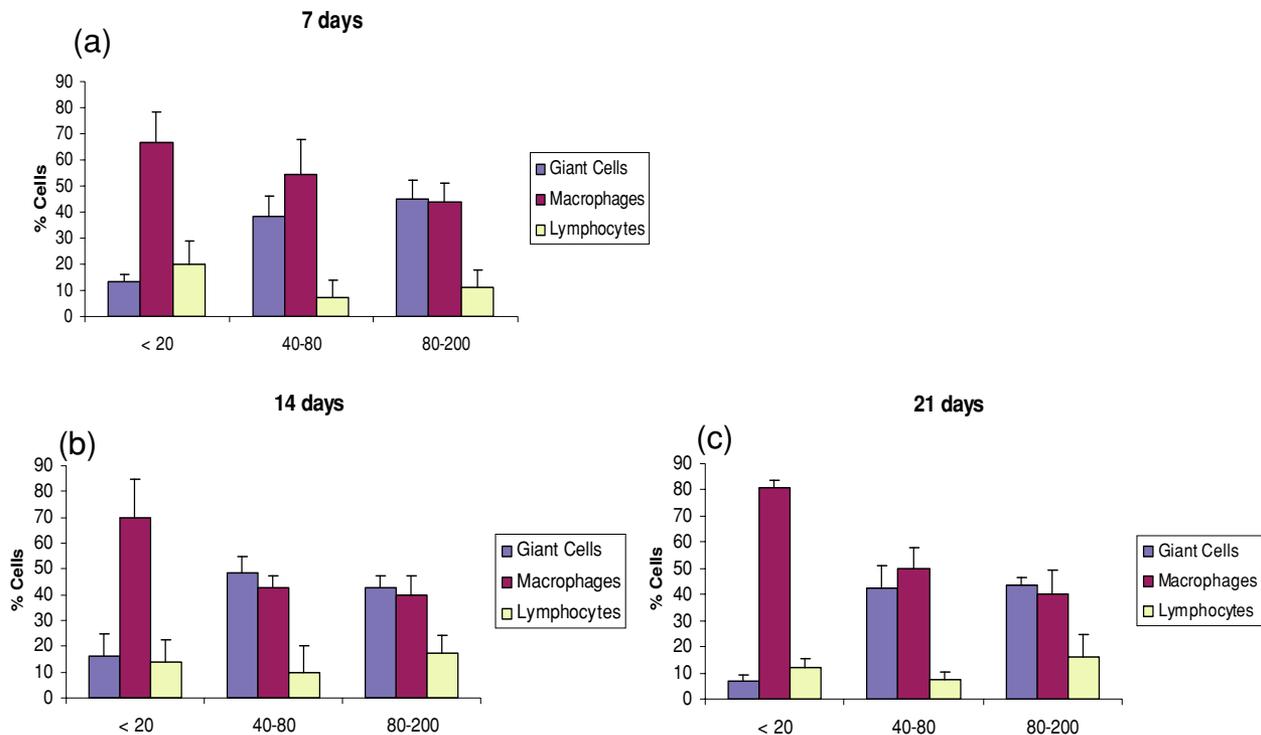


Fig. 4 Percentages of giant cells, macrophages and lymphocytes counted on histological sections of BCP micro particles with size of $<20 \mu\text{m}$, $40\text{--}80 \mu\text{m}$ and $80\text{--}200 \mu\text{m}$ implanted in muscles of rats for (a) 7 days, (b) 14 days and (c) 21 days

μm at 21 days (Fig. 3(i)) was more distinct. Qualitatively, the comparison of the population of lymphocytes for the 3 fractions suggested that less lymphocytes were present within implanted $40\text{--}80 \mu\text{m}$ than in <20 and $80\text{--}200 \mu\text{m}$ BCP microparticles. The relative percentages of macrophages, giant cells and lymphocytes were plotted as function of implantation time and size of BCP micro particles (Fig. 4). The number of macrophages was relatively higher for the smallest fraction of $<20 \mu\text{m}$ than for the intermediate $40\text{--}80 \mu\text{m}$ and largest $80\text{--}200 \mu\text{m}$ ones for all implantation time ($p < 0.0001$). The number of macrophages maintained over time for all considered groups of BCP particles. Whatever the delay of implantation, the giant cells were more important in the group of intermediate and largest size of particles than in the smallest size of BCP micro particles ($p < 0.0001$). The relative percentage of giant cells was comparable for the intermediate and largest size of particles and not significantly different after 7, 14 or 21 days. The number of lymphocytes was comparable for the 3 fractions and after the 3 delays.

4 Discussion

This study demonstrated that BCP micro particles with an average size around $5 \mu\text{m}$ (Table 1) induced an inflammatory response with macrophages and giant cells while implanted in muscles of rats. The cellular and tissue response

towards larger BCP particles was relatively moderate. The role of particle size of CaP ceramics towards inflammation and osteogenesis has been poorly investigated *in vivo*. Malard and coll. have shown that $10\text{--}20 \mu\text{m}$ implanted in femoral or tibial defects of rats provided with an early and strong inflammatory reaction. The larger particles with size ranging $80\text{--}100$ or $200\text{--}400 \mu\text{m}$ induced a moderate inflammation. Additionally, the smallest size of BCP particles led to the best bone ingrowth together with the higher resorption/degradation rate. The same authors have found that significant higher number of multinucleated giant cells with bone marrow cells cultured in contact with $10\text{--}20 \mu\text{m}$ BCP micro particles than for large size. Other studies have shown that high amounts of TNF- α and IL-6 cytokines were produced by macrophages cultured in the presence of micro particles [17–23]. It has been observed that conditioned culture medium of macrophages exposed to micro particles stimulated osteoblasts to produce inflammatory mediators which play an important role in bone resorption [20, 22, 25]. It has been also observed that macrophages, osteoclasts, osteoblasts and stem cells are present at bone fracture sites and all these cell types contribute to the healing process simultaneously [26–28].

Several studies have recently reported that specific materials are able to induce bone formation after implantation for 6–12 weeks in ectopic sites [8–11]. For instance, bone induction has been observed with synthetic hydroxyapatite

HA ceramics, biphasic calcium phosphate BCP, tricalcium phosphate ceramics, calcium phosphate cements, bioglass and even with titanium oxide and alumina ceramics implanted into the muscles of rabbits, dogs, goats, baboons and pigs [11, 12, 30–34]. Osteoinduction by biomaterials is a complex biological phenomenon that is not yet fully understood. It has been shown that ectopic bone formation is both material and animal dependant. Furthermore, surface microstructure is thought to play a key role in the osteoinductive capacity of bioceramics [12]. The micro porosity is due to the uncompleted sintering of ceramics at relatively low temperature. Two possible mechanisms have been proposed to explain this intriguing phenomenon of bone formation associated with materials. Both mechanisms are associated with the ceramic microstructure and the two cascades of biological events may be occurring in the same time.

In the first hypothesis, the surface microstructure may promote both the precipitation of biological apatite and cell adhesion on the surface of the materials. It has been shown that micro pores below $5\ \mu\text{m}$ in diameter greatly enhanced ceramic dissolution in body fluids and the reprecipitation of biological apatite at the surface [35]. Furthermore, the large surface area of microporous ceramics may favour the adsorption and entrapment of endogenous proteins including BMPs, which have a high affinity for calcium phosphates [36]. These osteogenic proteins on the surface of the material could promote both the adhesion and differentiation of progenitor cells into osteoblasts [37].

The second possible mechanism of biomaterial osteoinduction might be related to the release of microparticles due to the preferable dissolution of grain boundaries in body fluids. This release of micro particles might provoke an inflammatory reaction [14, 17]. The local release of inflammatory cytokines then stimulates circulating stem cells to differentiate into osteoblastic cells, thus producing bone tissue. This process could be similar to that observed during the healing of bone fractures by intra membranous ossification, where bone fragments are usually present. The degradation of the blood clot within a bone fracture might provoke a local inflammatory reaction leading to the release of cytokines. Those cytokines might in turn promote the differentiation of circulating stem cells into osteoblasts.

5 Conclusion

In this study, 3 sizes of BCP micro particles were characterized and implanted in muscles of rats for 7, 14 and 21 days. A similar fibrous tissue encapsulation was observed for the 3 groups while the total number of cells was significantly higher for BCP $<20\ \mu\text{m}$ than for 40–80 and 80–200 μm micro particles. Macrophages were relatively more present in the interstitial tissue for the smallest micro particles than for

the intermediate and largest fractions. On the opposite, more giant cells were found in the presence of intermediate and largest size of particles than for the smallest. Lymphocytes were present in comparable numbers for the 3 fractions and at the 3 delays. Therefore, the BCP micro particles $<20\ \mu\text{m}$ initiated a superior inflammatory reaction than larger sizes. These micro particles with a mean diameter around $5\ \mu\text{m}$ might mimic the release of grains associated to micro porous ceramics which have been found to be osteoinductive in various animal models.

References

1. G. P. RAJAN, J. FORNARO, O. TRENTZ and R. ZELLWEGER, *J. Trauma*. **60**(6) (2006) 1322.
2. H. BURCHARDT, *Orthop. Clin. North Am.* **18** (1987) 187.
3. F. TADDEI, M. VICECONTI, MANFRINI and A. TONI, *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* **216** (2002) 95.
4. W. NAM, H. J. KIM, E. C. CHOI, M. K. KIM, E. W. LEE and I. H. CHA, *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* **101**(3) (2006) e 65.
5. A. PIATTELLI, A. SCARANO and C. MANGANO, *Biomaterials* (18) (1996) 1767.
6. G. DACULSI, O. LABOUX, O. MALARD and P. WEISS, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14** (2003) 195.
7. B. H. FELLAH, P. WEISS, O. GAUTHIER, T. ROUILLON, P. PILET, G. DACULSI and P. LAYROLLE, *J. Orthop. Res.* **24**(4) (2006) 628.
8. G. DACULSI and P. LAYROLLE, *Key Eng. Mater.* **254**(56) (2004) 1005.
9. P. HABIBOVIC, T. M. SEES, M. A. VAN DEN DOEL, C. A. VAN BLITTERSWIJK and K. DE GROOT, *J. Biomed. Mater. Res. A*. **77**(4) (2006) 747.
10. D. ZAFFE, *Micron*. **36**(7–8) (2005) 583.
11. D. LE NIHOANNEN, G. DACULSI, A. SAFFARZADEH, O. GAUTHIER, S. DELPLACE, P. PILET and P. LAYROLLE, *Bone* **36**(6) (2005) 1086.
12. P. HABIBOVIC, H. YUAN, C. M. VAN DER VALK, G. MEIJER, C. A. VAN BLITTERSWIJK and K. DE GROOT, *Biomaterials* **26**(17) (2005) 3565.
13. N. KONDO, A. OGOSE, K. TOKUNAGA, H. UMEZU, K. ARAI, N. KUDO, M. HOSHINO, H. INOUE, H. IRIE, K. KURODA, H. MERA and N ENDO, *Biomaterials* **27**(25) (2006) 4419.
14. J. LU, M. C. BLARY, S. VAVASSEUR, M. DESCAMPS, K. ANSELME and P. HARDOUIN, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**(4) (2004) 361.
15. O. MALARD, J. M. BOULER, J. GUICHEUX, D. HEYMANN, P. PILET, C. COQUARD and G. DACULSI, *J. Biomed. Mater. Res.* **46**(1) (1999) 103.
16. K. EID, S. ZELICOF, B. P. PERONA, C. B. SLEDGE and J. GLOWACKI, *J. Orthop. Res.* **19**(5) (2001) 962.
17. P. LAQUERRIERE, A. GRANDJEAN-LAQUERRIERE, E. JALLOT, G. BALOSSIER, P. FRAYSSINET and M. GUENOUNOU, *Biomaterials* **24**(16) (2003) 2739.
18. M. NAGAE, T. HIRAGA, H. WAKABAYASHI, L. WANG, K. IWATA and T. YONEDA, *Bone* 2006
19. Y. HARADA, J. T. WANG, V. A. DOPPALAPUDI, A. A. WILLIS, M. JASTY, W. H. HARRIS, M. NAGASE and S. R. GOLDRING, *J. Biomed. Mater. Res.* **31**(1) (1996) 19.

20. A. RODRIGO, G. VALLES, L. SALDANA, M. RODRIGUEZ, M. E. MARTINEZ, L. MUNUERA and N. VILABOA, *J. Orthop. Res.* **24**(1) (2006) 46.
21. J. HUANG, S. M. BEST, W. BONFIELD, R. A. BROOKS, N. RUSHTON, S. N. JAYASINGHE and M. J. EDIRISINGHE, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**(4) (2004) 441.
22. S. M. HOROWITZ, B. P. RAPUANO, J. M. LANE and A. H. BURSTEIN, *Calcif. Tissue Int.* **54**(4) (1994) 320.
23. S. M. HOROWITZ and M. A. PURDON, *Calcif. Tissue Int.* **57**(4) (1995) 301.
24. J. M. BOULER, R. Z. LEGEROS and G. DACULSI, *J. Biomed. Mater. Res.* **51**(4) (2000) 680.
25. S. M. HOROWITZ and J. B. GONZALES, *J. Orthop. Res.* **15**(1) (1997) 50.
26. K. H. KRAUS and C. KIRKER-HEAD, *Vet. Surg.* **35**(3) (2006) 232.
27. A. M. PHILLIPS, *Injury.* **36** (Suppl 3) (2005) S5.
28. D. SHIRLEY, D. MARSH, G. JORDAN, S. MCQUAID and G. LI, *J. Orthop. Res.* **23**(5) (2005) 1013.
29. U. RIPAMONTI, J. CROOKS and A. N. KIRKBRIDE, *South African J. Sci.* **95** (1999) 335.
30. H. YUAN, M. VAN DEN DOEL, S. LI, C. A. VAN BLITTERSWIJK, K. DE GROOT and J. D. DE BRUIJN, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**(12) (2002) 1271.
31. F. BARRERE, C. M. VAN DER VALK, R. A. DALMEIJER, G. MEIJER, C. A. VAN BLITTERSWIJK, K. DE GROOT and P. LAYROLLE, *J. Biomed. Mater. Res. A* **66**(4) (2003) 779.
32. C. KLEIN, K. DE GROOT, W. CHEN, Y. LI and X. ZHANG, *Biomaterials* **15**(1) (1994) 31.
33. Z. YANG, H. YUAN, W. TONG, P. ZOU, W. CHEN and X. ZHANG, *Biomaterials* **17**(22) (1996) 2131.
34. P. HABIBOVIC, J. LI, C. M. VAN DER VALK, G. MEIJER, P. LAYROLLE, C. A. VAN BLITTERSWIJK and K. DE GROOT, *Biomaterials* **26**(1) (2005) 23.
35. G. DACULSI, R. Z. LEGEROS, M. HEUGHEBAERT and I. BARBIEUX, *Calcif. Tissue Int.* **46**(1) (1990) 20.
36. J. DE GROOT, *Tissue Eng.* **4**(4) (1998) 337.
37. S. A. KUZNETSOV, M. H. MANKANI, S. GRONTHOS, K. SATOMURA, P. BIANCO and P. G. ROBEY, *J. Cell. Biol.* **153**(5) (2001) 1133.

**Etude de la réponse de cellules macrophagiques et
d'ostéoblastes après culture avec des microparticules
de phosphate de calcium**

Macrophage and osteoblast responses to biphasic calcium phosphate microparticles

Borhane H. Fellah¹, Bruno Delorme², Jérôme Sohier¹, David Magne³, Pierre Hardouin³,
Daniel Chappard⁴, Pierre Layrolle^{1,*}

¹INSERM, U791, Laboratory for osteoarticular and dental tissue engineering
Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, France

²Laboratory of haematopoiesis, University François Rabelais
Faculty of Medicine, Tours, France

³Laboratory of Cellular and Molecular Biology, EA2603, IFR114, Boulogne/Mer, France
Université Nord de France

⁴INSERM, EMI 0335 - LHEA, Faculty of Medicine, Angers, France

*Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 20; Fax: +33 2 40 41 37 12.

E-mail address: pierre.layrolle@nantes.inserm.fr (Prof. Pierre Layrolle, PhD).

Abstract

The aim of the present work was to explore *in vitro* the biological events leading to ectopic bone formation in contact with microporous biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics. Macrophage-like (J774) and osteoblast-like (MC3T3-E1) cells were cultured in the presence of BCP microparticles of different sizes (<20, 40-80 or 80-200 μm). The smallest microparticles decreased the viability of both cell types as measured with LDH and MTS assays; and enhanced the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) by macrophages after 24 hours, as revealed by ELISA. Osteoblastic cells were then cultured for 96 hours in the presence of these pro-inflammatory cytokines and their differentiation studied by RT-PCR. MC3T3-E1 cells cultured with TNF- α showed a decrease in osterix, PTH receptor (PTH1R) and osteocalcin gene expression. On the contrary, IL-6 enhanced the expression of osterix, Runx2, alkaline phosphatase and osteocalcin compared to plastic. In conclusion, this study shows that the inflammatory response initiated by BCP microparticles may have both detrimental and beneficial effects on osteogenesis.

Keywords: Inflammation, macrophage, cytokine, osteoblast, osteogenesis.

Introduction

Biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics are widely used as bone substitutes and are available in a variety of different forms such as powders, granules and macroporous blocks for filling bone defects [1, 2]. Their biocompatibility and bioactive properties have been demonstrated in various animal models and in clinical studies [2, 3]. BCP ceramics are made of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) in different ratios. In the concept of bioactivity, the β -TCP phase dissolves in body fluids releasing calcium and phosphate ions and leading to the precipitation of biological apatite on to the insoluble HA crystals. This biological apatite layer incorporates various proteins and serves as a substrate for the osteoblastic cells that produce the bone extracellular matrix resulting in the direct apposition of mineralised bone tissue on the surface of BCP ceramics by osteoconduction [4]. It has also recently been shown that microporous BCP ceramics implanted in ectopic sites for several weeks are able to induce bone formation [5-7]. Mineralised bone tissue formation was observed despite ceramic materials that were not associated with osteogenic cells or growth factors prior to implantation (i.e. mesenchymal stem cells or bone morphogenetic proteins). However, the biological mechanisms of osteoinduction by bioceramics remain unknown. The microporosity of bioceramics seems to be a prerequisite for bone formation as it has a significant influence on the precipitation/dissolution process, the adsorption of proteins and thus the attachment of osteoprogenitor cells [5, 6, 8]. The dissolution of microporous bioceramics in a biological environment may lead to the release of small particles ($< 5 \mu\text{m}$). Our hypothesis is that these microparticles activate macrophages to release inflammatory cytokines that in turn promote the recruitment of mesenchymal stem cells and their osteoblastic differentiation. During bone fracture healing, an early inflammatory phase is indeed necessary to trigger efficient healing [9]. For instance, TNF- α is strongly induced in the first 24 hours after bone fractures and the absence of TNF- α signalling delays mesenchymal cell recruitment, proliferation and perhaps also the onset of skeletogenic cell differentiation, eventually leading to abnormal healing [10, 11]. IL-6 is also induced during the first hours after bone fracture and sequential application of IL-6 has a beneficial effect on experimental bone fracture healing in rats [12]. In addition, it is likely that IL-6 is a positive stimulator of osteoblast differentiation [13].

The aim of the present study was to investigate the effects of BCP microparticles on the release by macrophage cells of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in relation to osteoblastic cell differentiation. Both cytokines were studied because of their known

involvement in bone fracture healing. We first measured the viability of both macrophage and osteoblastic cells in contact with BCP microparticles. Then, we assayed the secretion of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 from macrophages in contact with these particles. Finally, the differentiation of osteoblastic cells was determined in the presence of TNF- α and IL-6.

Materials and methods

Preparation and characterisation of BCP ceramic microparticles

A calcium-deficient apatite (CDA) powder was supplied by Biomatlante SAS (Vigneux de Bretagne, France). The CDA powder was sintered in air at 1200°C for 5 hours (heating/cooling rate 5°/min) in alumina crucibles in a muffle furnace (Nabertherm, Germany). After sintering, the CDA transformed into a mixture of HA and β -TCP, called BCP. Immediately after sintering, a drop of phenolphthalein was added to a sample of powder. This simple test made it possible to detect the presence of calcium oxide CaO. The sintered BCP ceramic was then crushed and sieved into particle fractions of <20 μ m, 40-80 μ m and 80-200 μ m using certified sieves (Fritsch, Analysette, Germany). The 3 fractions were analysed using powder X-ray diffraction (Philips Analytical, PW1830 and PW1050 Holland) with a CuK α source operated at 40 kV and 30 mA. The HA/ β -TCP weight ratio was determined using the relative intensities of the 2 1 0 ($d=3.08\text{\AA}$) and the 0 2 10 ($d=2.880\text{\AA}$) diffraction lines of respectively HA (JCPDS card 9-432) and β -TCP (JCPDS card 9-169). The 3 fractions were also characterised by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Nicolet, Magnia 550) in order to confirm the absence of carbonate peaks or phases other than HA and β -TCP. Particle size distribution of the 3 fractions was measured using laser scattering (Coulter LS 230, Coultronics, France) and scanning electron microscopy (SEM, Leo 1450 VP) as previously described [14]. For SEM observations, the BCP microparticles were deposited on to a carbon tape and Au-Pd sputtered (Denton Vacuum, Desk III, UK). To determine particle size, samples were scanned using backscattered electrons and the images were analysed using a semi-automatic image analyser (Quantimet 500, Leica, UK). The size and number of particles were determined using a custom-made program. Specific surface areas of the BCP particles were measured by the Brunauer-Emmett-Teller method using (BET, Micromeritics Flowsorb III) equipment. Three measurements were taken for each fraction and values were averaged using standard deviation. The absence of microporosity in the 3 fractions of BCP microparticles sintered at 1200°C was corroborated using mercury

intrusion porosimeter (Autopore III, Micromeritics). After characterisation, the 3 fractions of BCP were put into glass Pasteur pipettes and sterilised by heating at 200 °C for 2 hours.

Cell culture

Macrophage-like cells (J774.1A) were obtained from the American Type Culture Collection (USA). These cells are derived from mice monocytes and differentiate into macrophages producing pro-inflammatory cytokines in culture. They were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-Glutamax™, Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS, Dominique Dutcher Brumath, France) and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (Invitrogen Corporation Paisley, UK). The J774 cells were seeded at a 2×10^4 / cm² cell density and expanded in T75 flasks (Corning, Koolhovenlaan, The Netherlands). At confluence, the J774 cells were dislodged with a cell scraper.

Osteoblast-like cells derived from mouse calvaria (MC3T3-E1 Subclone 4) were also purchased from ATCC. These cells were selected because of their ability to differentiate into osteoblasts and to produce a mineralised collagen matrix. MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM (Gibco) supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin antibiotics and 1% L-glutamine (Invitrogen Corp. Paisley, UK). All cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ and 95% air in a humidified incubator.

Cell viability and death assays

After 2 passages in T75 flasks, the J774 cells were seeded in triplicate at 2.5×10^5 cells per cm² in twenty four-well plates (Corning). Cells were allowed to attach on to culture plastic for 12 hours before treatments. After 2 passages in T75 flasks, the MC3T3-E1 cells were seeded in triplicate at a density of 10^4 cells per cm² in twelve-well plates (Corning), and also allowed to attach for 12 hours on plastic. Cells were then treated for 24 hours with 40 mg of BCP microparticles or Triton X 100® (1%, from Sigma-Aldrich, used as the recommended control in the normal procedure of the Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, Germany).

Cell death was determined using this colorimetric assay, based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells. In short, 100 μ l of cell culture media were transferred from each well into a 96-well culture plate. An identical volume (100 μ L) of LDH solution was added to each well for 30 minutes according to the manufacturer's instructions. Absorbance measurement to determine the percentage of cytotoxicity was performed on a spectrophotometer with an optical density reading at 490 nm.

Cell viability was measured using the CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay (Promega). In this assay, the formation of formazan from methyl tetrazolium salt (MTS) by mitochondrial NADH/NADPH-dependent dehydrogenases in living cells is quantified by colorimetric measurement at 490 nm. In short, after the same treatments as for LDH assay, 100 μ L of MTS solution was added to each well for 2–3 h according to the manufacturer's instructions before reading the optical density.

Cytokine assays

Secretion of TNF- α and IL-6 by J744 cells was first quantified in different triplicate culture conditions. Different cell densities, microparticle quantities, lypopolysaccharide levels {LPS from *Escherichia coli* (Sigma, USA) used as a control stimulating cytokine secretion}, and time points were tested. Selected culture conditions were as follows: J744 cells were seeded in triplicate in 24 multi-well plates at 2.5×10^5 /cm² and cultured for 24 hours in fresh medium containing 40 mg/mL of different BCP microparticles (< 20 μ m, 40-80 μ m and 80-200 μ m) or supplemented with 1 μ g/mL of LPS (positive control). TNF- α and IL-6 secretion was then measured with commercially available ELISA kits (Bender Medsystems, Austria), according to the manufacturer's instructions, and optical density was measured at 490 nm. The results were averaged with standard deviations and expressed in ng/mL for each cytokine.

Gene expression in MC3T3-E1 cells by RT-PCR

MC3T3-E1 cells were seeded in 25 cm² flasks at a density of 10^4 cells per cm². After cell attachment, three cell groups were selected. One cell group had only new, fresh medium, (negative control), the second received medium supplemented with cytokines (0.1, 1 or 10 ng/mL of TNF- α or IL-6), and the third received an osteogenic culture medium used as a positive control to induce osteoblastic differentiation and validate the primers {dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate (Sigma, France)}. MC3T3-E1 cells were then cultured for 96 hours with a refreshment of the corresponding culture media for all groups after 48 hours. After 96 hours of incubation, the medium was removed and cells washed with 4 ml of PBS. The flasks were dried carefully and 750 μ L of RLT buffer (QIAGEN, France) containing 1% of β -Mercaptoethanol was added to the cell layer for 5 minutes. After lysis, cells were dislodged with a scraper, aspirated and transferred into RNase-free tubes and divided in duplicate (350 μ L). RNA samples were extracted using an RNA easy kit (Qiagen SA., Courtaboeuf, France). RT-PCR reactions were done using SuperScript

One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The sequences of the oligonucleotides are reported in Table 1. RT-PCR products were analysed using agarose gel electrophoresis.

Statistical analysis

All data were expressed as average \pm standard deviation and examined using Fisher (LSD) analysis of variance ANOVA using XL Stat 6.0 software. The results were considered significant for p values < 0.0001 .

Results

Characterisation of BCP microparticles

After sintering at 1200°C, the BCP microparticles were solely composed of HA and β -TCP phases in a weight ratio of approximately 50/50. The corresponding atomic Ca/P ratio was 1.58. Figure 1 shows the three fractions of BCP micro particles, <20, 40-80 and 80-200 μm . They were composed of rounded microparticles with the expected sizes. At high magnification, the surface of the BCP microparticles appeared well-sintered with some remaining microporosity (Figure 1c). As shown in Table 2, the three fractions of BCP microparticles had an average particle size of 4.2, 62 and 102 μm using the SEM method and 6, 67 and 138 μm using laser scattering measurement. Both methods provided similar results for average particle sizes. Specific surface area was about 4, 1.2 and 1.7 m^2/g for BCP < 20, 40-80 and 80-200 μm , respectively.

Macrophage and osteoblast cell viability and death in contact with BCP microparticles

Figure 2 shows MTS conversion and LDH activity of macrophage J774 cells. Macrophages were cultured for 24 hours on plastic, in contact with the same quantity of the 3 fractions of BCP microparticles (< 20 μm , 40-80 and 80-200 μm) or in culture media supplemented with 1% of Triton X 100[®]. After incubation, the highest MTS conversion was observed in cells cultured on plastic (Figure 2a). The lowest mitochondrial activity was observed in cells cultured in media containing 1% of Triton X 100[®]. A decrease in J774 cell metabolism was also measured as particle size increased (Figure 2a). In parallel, Figure 2b shows LDH activity of J774 cells cultured on plastic, in contact with BCP microparticles or in the presence of Triton X. As expected, cell death was minimal for macrophages cultured on plastic while it was maximum in media supplemented with 1% of Triton X. BCP microparticles (< 20 μm) induced a high death rate compared to macrophages cultured in contact with BCP fractions of 40-80 and 80-200 μm ($p < 0.0001$).

Figure 3 shows MTS conversion and LDH activity of osteoblastic MC3T3-E1 cells cultured for 24 hours on plastic, in contact with BCP microparticles or in media containing 1% of Triton X. The MTS conversion was maximum for cells cultured on plastic and decreased significantly in the presence of Triton X (Figure 3a, $p < 0.0001$). An intermediate MTS conversion was measured for MC3T3-E1 cells cultured in contact with the 3 fractions of BCP microparticles without significant difference between groups. As shown in Figure 3b, low LDH activity was expressed by osteoblastic cells cultured on plastic. The highest LDH

activity was measured for cells cultured in the presence of Triton X. MC3T3-E1 cells cultured in contact with BCP microparticles had intermediate cell death rates with slightly higher mortality in the BCP < 20 μm fraction.

Release of inflammatory cytokines by macrophages cultured with BCP microparticles

In order to measure significant levels of TNF- α and IL-6, J774 macrophage-like cells were cultured at different cell densities and times with various doses of LPS. We observed that the production of cytokines increased with the number of cells and LPS dose. TNF- α and IL-6 production by macrophages was at a maximum of 2.5 and 4 ng/mL for a cell density of 5×10^5 cells/cm² and LPS dose of 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These conditions were selected for studying the release of cytokines by macrophages cultured in contact with BCP microparticles. Figure 4 shows cytokines production by J774 cells cultured for 24 hours on plastic, in contact with BCP microparticles or in culture media supplemented with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). As expected, macrophages cultured on plastic released small amounts of TNF- α and IL-6 while they delivered higher quantities in the presence of LPS. The difference between these two groups was statistically significant ($p < 0.0001$). BCP microparticles stimulated J774 cells and induced an increase in cytokine secretion for both TNF- α and IL-6. Cells cultured in contact with the smallest sized (< 20 μm) BCP microparticles produced a higher dose of IL-6 and TNF- α . Macrophages cultured in contact with the largest sizes (40-80 and 80-200 μm) presented low release of cytokines, similar to cells cultured on plastic.

Osteogenic expression of MC3T3-E1 cells by RT-PCR

Figure 5 shows the results of RT-PCR analysis of MC3T3-E1 cells cultured for 96 hours in standard, osteogenic or culture medium supplemented with 10 ng/mL of TNF- α or IL-6 cytokines. MC3T3-E1 cells cultured in standard medium expressed osteogenic markers: osterix, Runx2, PTHR1, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin. Expression of these markers seemed to increase in the osteogenic medium. Addition of TNF- α extinguished the expression of osterix and PTHR1 compared to cells cultured in standard medium (control). This cytokine diminished osteocalcin gene expression while Runx2 and ALP remained at similar levels in comparison to the control. On the contrary, the addition of IL-6 increased the expression of the osteogenic markers osterix, Runx2, PTHR1, ALP and osteocalcin, compared to cells cultured in standard medium. The expression of Runx2 and osteocalcin even seemed greater for MC3T3-E1 cells cultured in the presence of 10 ng/ml of IL-6 than for cells cultured in osteogenic medium (positive control).

Discussion

Recent studies have shown that microporous calcium phosphate bioceramics induce mineralised bone formation after implantation for several weeks in the muscles of various animals [5-7, 15, 16]. On the contrary, dense CaP ceramics of similar composition but sintered at higher temperatures fail to induce ectopic bone formation [8]. In addition, Malard *et coll.* have also shown that critical-sized bone defects filled with BCP microparticles of different sizes heal more rapidly with $<20\ \mu\text{m}$ than with larger sizes [17]. After implantation of BCP (granules, blocs, etc.) biological fluids cause the material to dissolve, which may induce a release of microparticles. Small BCP particles may play a key role in osteogenesis by acting on various cells and primarily on macrophages. In a previous study, we implanted BCP microparticles (< 20 , 40-80 and 80-200 μm) in rat muscle for several days. After 7 days, small BCP microparticles ($< 20\ \mu\text{m}$) enhanced a local inflammatory reaction including numerous cells with a prevalence of macrophages [14]. Our working hypothesis was therefore that small microparticles may stimulate macrophages to secrete cytokines, which may in turn induce osteogenesis.

In the aim of investigating the biological events preceding osteoinduction after implantation of BCP material, we analysed the response of J774 macrophage-like cells and MC3T3-E1 osteoblast-like cells in contact with different sizes of BCP microparticles for 24 hours. In the present study, we observed low mortality of both macrophages and osteoblasts in contact with BCP microparticles of 40-80 and 80-200 μm in size, and higher cell death in contact with the smallest particle size ($< 20\ \mu\text{m}$) (Figure 2 and 3). These *in vitro* results corroborate previous histological findings obtained after intramuscular implantation of BCP microparticles [14]. At the same time, BCP microparticles of $<20\ \mu\text{m}$ increased production of TNF- α , and above all IL-6, by J774 cells, confirming other studies [18-20], while larger sizes did not (Figure 4). That only the smallest microparticles are able to stimulate major cytokine release by macrophages might explain why this kind of microparticle is able to induce osteogenesis when they are the result of the dissolution of microporous bioceramics. TNF- α has effectively been shown to be necessary for normal bone fracture healing, at least by inducing mesenchymal stem cell recruitment and proliferation [10, 11]. In addition, secretion of TNF- α by macrophages activated by calcium phosphate crystals is suspected of inducing osteoblast differentiation of smooth muscle cells, and vascular bone formation during atherosclerosis [21, 22]. These reports indicate that TNF- α may play a positive role in osteogenesis. Nevertheless, TNF- α also probably inhibits osteoblast maturation, as illustrated in our study

by the decrease in osteocalcin expression. This type of inhibitory effect of TNF- α on osteoblastic differentiation has been extensively reported [23].

In contrast to TNF- α , IL-6 may be able to positively stimulate osteoblast differentiation. Although conflicting results have effectively been published, most of the effects of IL-6 on osteoblast differentiation appear stimulatory [13]. In our study, IL-6 was produced by macrophages in contact with the smallest microparticles, and enhanced expression of osteoblast markers in MC3T3-E1 cells.

In the context of osteoinduction by ceramics, a two-step mechanism can be hypothesised: TNF- α may initially be beneficial for inducing mesenchymal stem cell recruitment and at later stages, TNF- α may be detrimental for their differentiation whereas IL-6 may stimulate mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts. This hypothesis needs to be considered and will be addressed with much attention in future studies.

Conclusion

In this study, we tested the effects of three sizes of BCP microparticles: <20, 40-80 and 80-200 μm , on macrophages (J774) and osteoblasts (MC3T3-E1) for 24 hours. Small particle size (< 20 μm) was harmful for both macrophages and osteoblasts, compared to 40-80 and 80-200 μm . The secretion of the cytokines IL-6 and TNF- α was enhanced by culturing macrophage-like cells in contact with BCP microparticles measuring <20 μm . Osteoblasts cultured in the presence of TNF- α showed a decrease in osteocalcin accompanied by inhibition of PTHR1 and osterix. On the contrary, osteoblasts cultured with IL-6 presented an increase in osteogenic markers. These results suggest that inflammatory cytokines released by crystal-activated macrophages may have both positive and negative effects on new bone formation.

References

- [1] LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:201.
- [2] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19:1473.
- [3] Gauthier O, Khairoun I, Bosco J, Obadia L, Bourges X, Rau C, Magne D, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, Weiss P. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:47.
- [4] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002:81.
- [5] Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:723.
- [6] Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:747.
- [7] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36:1086.
- [8] Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26:3565.
- [9] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392.
- [10] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003;18:1584.
- [11] Zhou FH, Foster BK, Zhou XF, Cowin AJ, Xian CJ. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *J Bone Miner Res* 2006;21:1075.

- [12] Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M. Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. *Bone* 2007;41:437.
- [13] Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation? *Bone* 2005;37:601.
- [14] Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:287.
- [15] Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1996;17:31.
- [16] Yuan H. Osteoinduction of calcium phosphate. University of Leiden, The Netherland, 2001.
- [17] Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:103.
- [18] Horowitz SM, Purdon MA. Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int* 1995;57:301.
- [19] Horowitz SM, Rapuano BP, Lane JM, Burstein AH. The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements. *Calcif Tissue Int* 1994;54:320.
- [20] Rodrigo A, Valles G, Saldana L, Rodriguez M, Martinez ME, Munuera L, Vilaboa N. Alumina particles influence the interactions of cocultured osteoblasts and macrophages. *J Orthop Res* 2006;24:46.
- [21] Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, Landis RC, Haskard DO. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* 2005;96:1248.
- [22] Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res* 2002;91:9.
- [23] Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, Nanes MS. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 2000;141:3956.

Figure captions

Figure 1. SEM images of BCP microparticles. (a and c) microparticles < 20 μm , (b) particle size 40-80 μm and (d) 80-200 μm

Figure 2. Macrophage-like J774 cells cultured for 24 h on plastic, in contact with different sizes of BCP microparticles < 20, 40-80, 80-200 μm and in the presence of Triton X 100[®]. (a) Cell viability using MTS conversion, (b) Cell death assay using LDH activity (*: $p < 0.0001$ compared with BCP 40-80 and 80-200 μm).

Figure 3. Osteoblastic MC3T3-E1 cells cultured for 24 h on plastic, in contact with different BCP microparticles < 20, 40-80, 80-200 μm and in the presence of a surfactant Triton X 100[®]. (a) Cell viability using MTS conversion (*: $p < 0.0001$ compared with plastic), (b) Cell death assay using LDH activity (*: $p < 0.0001$ compared with plastic).

Figure 4. TNF- α and IL-6 cytokine secretion by macrophage-like J774 cells cultured for 24 h on plastic (negative control), in contact with different BCP microparticles < 20, 40-80, 80-200 μm or LPS (positive control) (*: $p < 0.0001$ compared with plastic).

Figure 5. Osteogenic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells measured by RT-PCR after culturing for 96 hours in standard medium (ctrl), with osteogenic supplements (+Osteo), TNF- α or IL-6 cytokines (10 ng/ml).

Figure 1

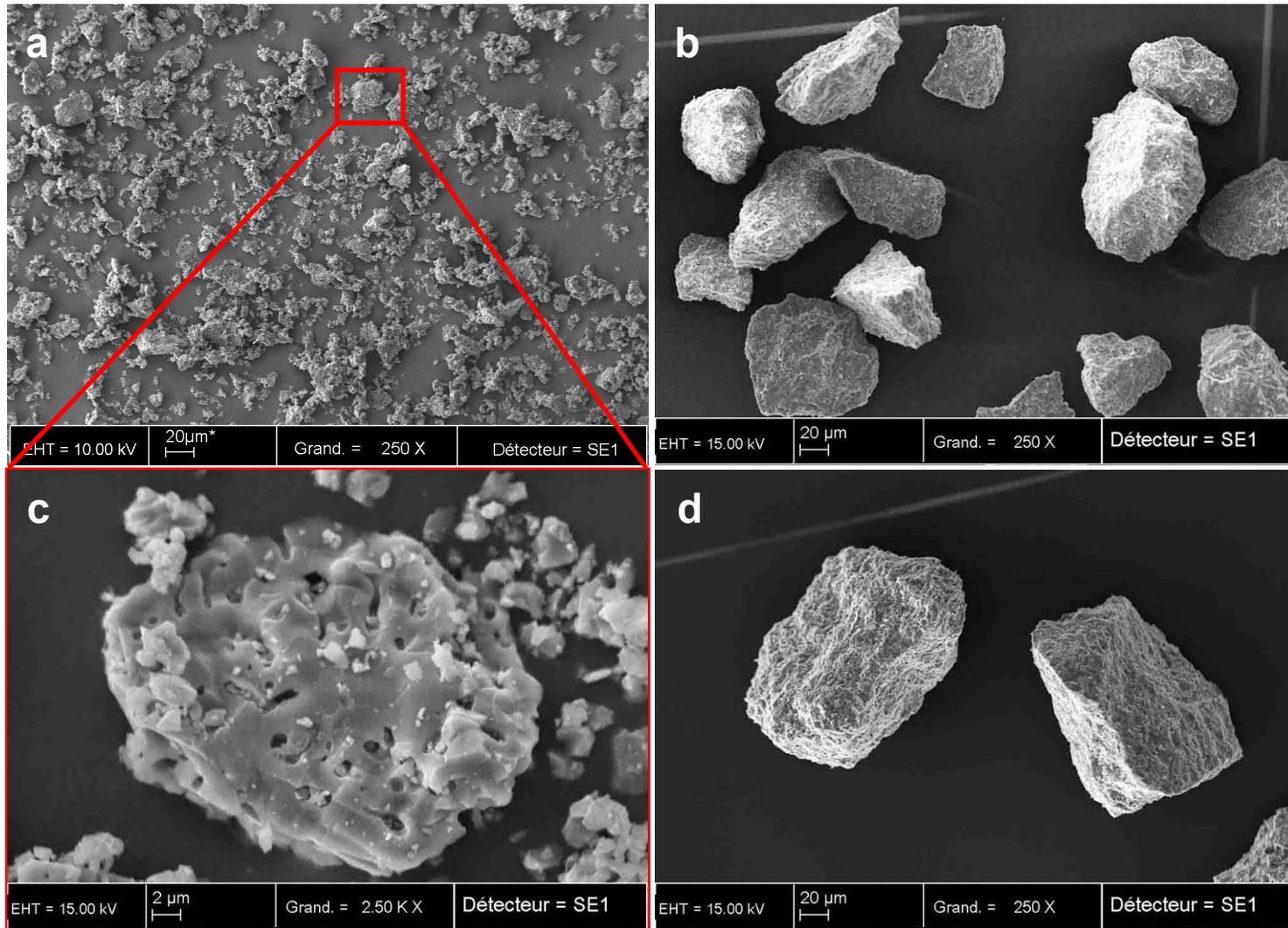
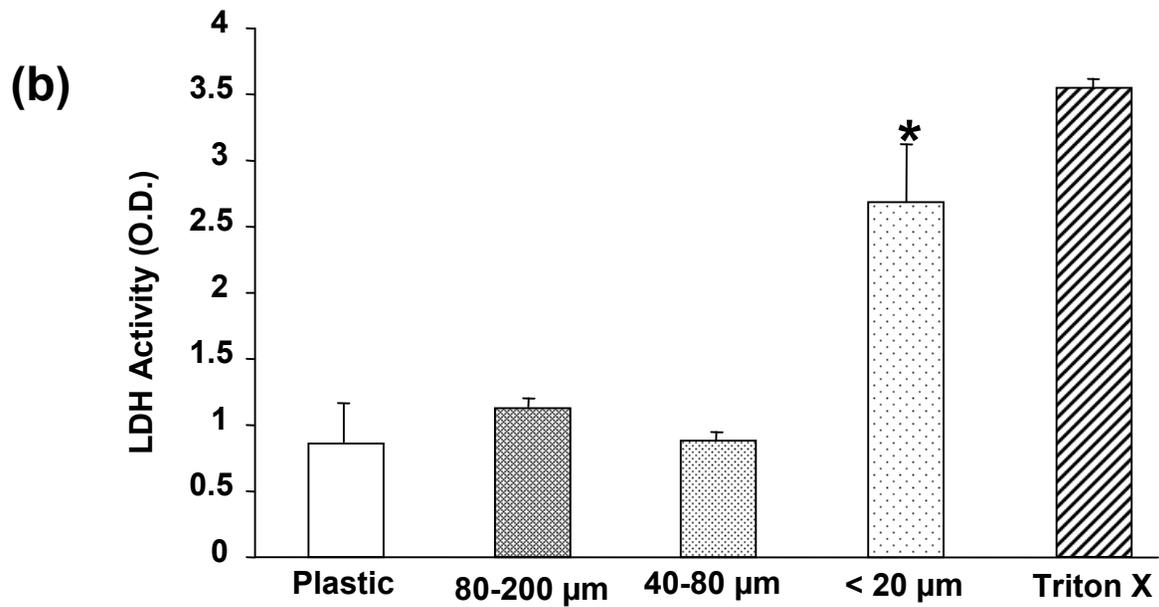
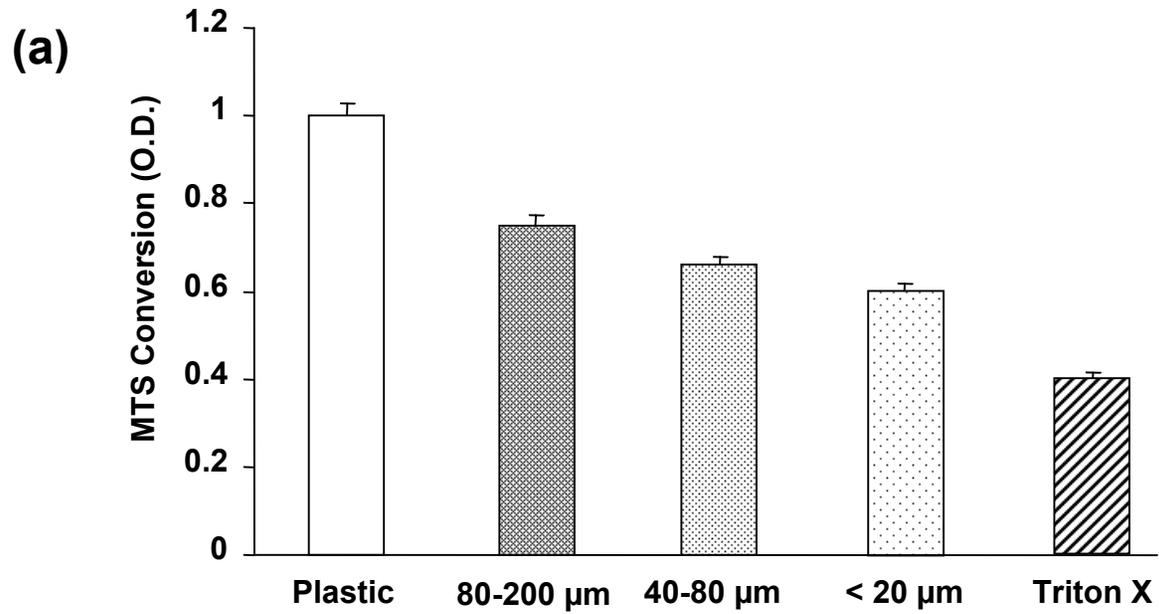
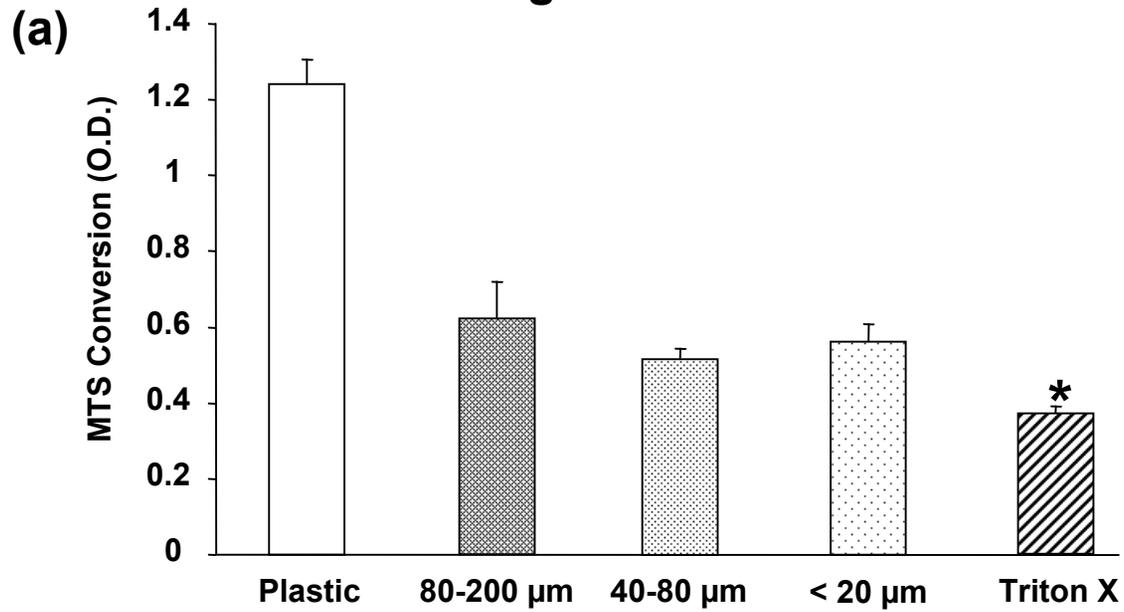


Figure 2



J774

Figure 3



MC3T3-E1

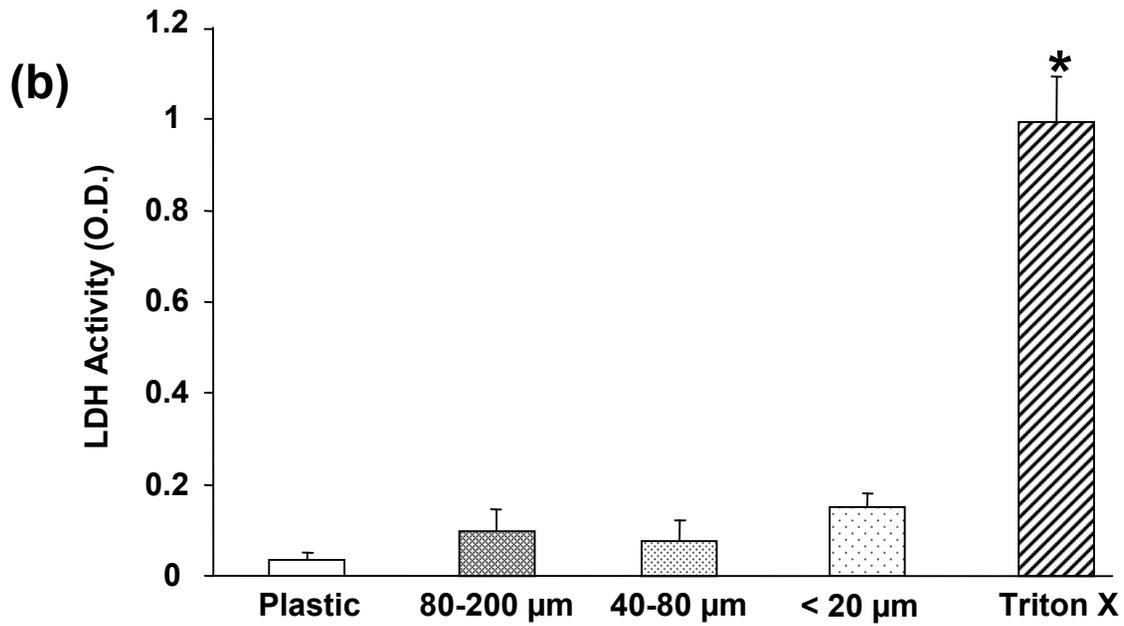


Figure 4

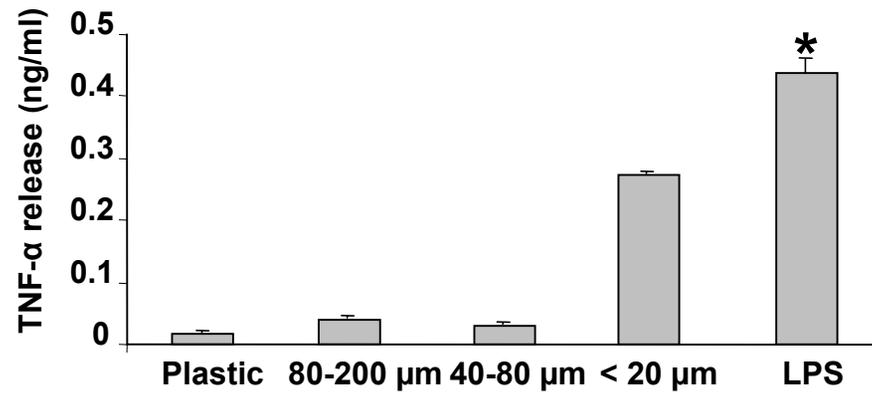
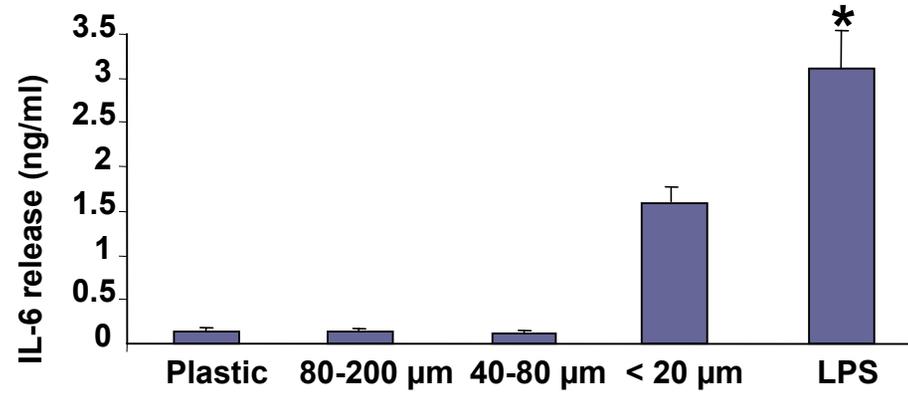
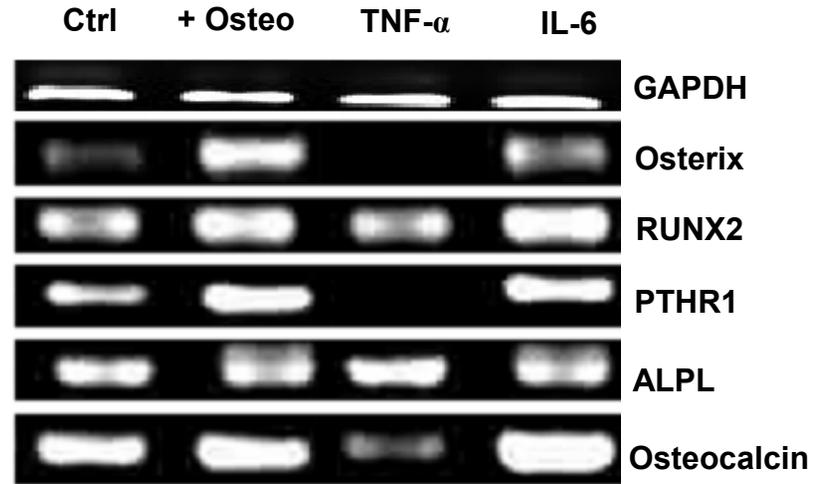


Figure 5

(a)



(b)

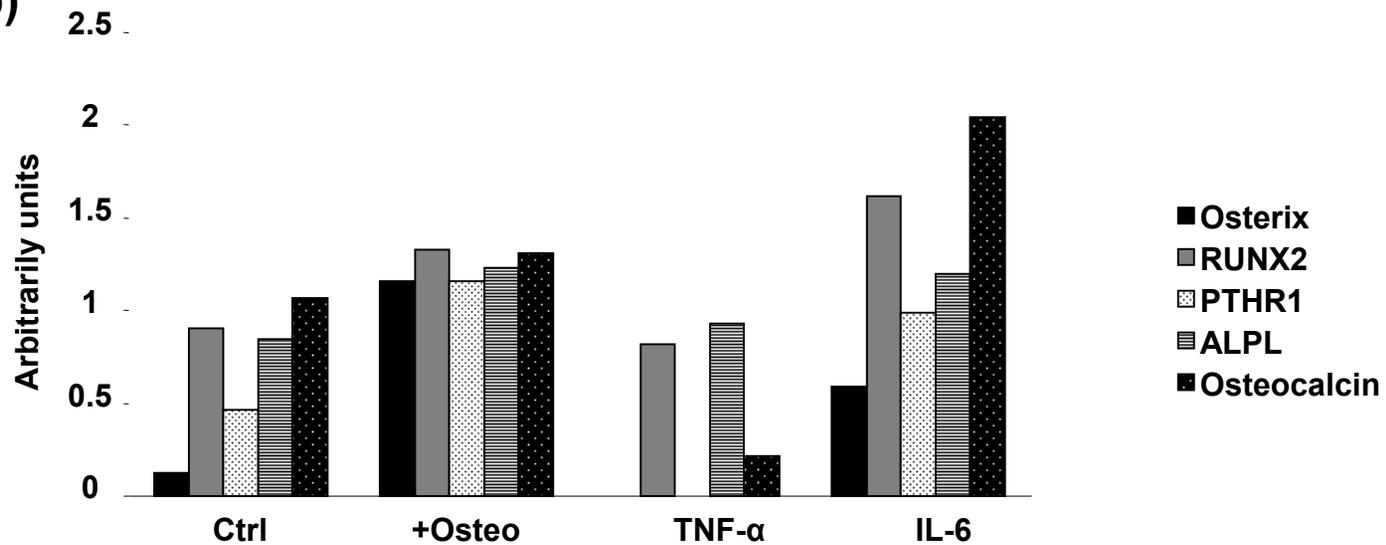


Table 1. Sequences of primer pairs used for RT-PCR analysis

Name	Primers 5'-3'
GAPDH	Forward AATCCCATCACCATCTTCCAGG
	Reverse AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG
Osterix	Forward GTCCTCGGTTCTCTCCATCTG
	Reverse TGTGTTGCCTGGACCTGGTG
RUNX 2	Forward CCTAGTTTGTCTCTGATCGCCTCA
	Reverse AATGCTTGGGAAGTGCCTGG
PTHR1	Forward CCTGGGCATGATCTACACCGT
	Reverse GGAAGAAGGTCACGGCCACA
ALPL	Forward CAATTAACATCTGACGCTGCC
	Reverse AGCTGATATGCGATGTCCTTGC
Osteocalcin	Forward CTGAGTCTGACAAAGCCTTC
	Reverse GCTGTGACATCCATACTTGC

Table 2. Characterisation of BCP microparticles.

Microparticles	< 20 μm	40-80 μm	80-200 μm
Average particle size \pm SD (μm)	$4.2 \pm 2.75^{(a)}$	$61.8 \pm 33.2^{(a)}$	$102.1 \pm 60.2^{(a)}$
	$6.1 \pm 6.1^{(b)}$	$66.9 \pm 11^{(b)}$	$137.6 \pm 26.8^{(b)}$
Specific surface area (m^2/g)	3.97 ± 0.02	1.25 ± 0.03	1.71 ± 0.04

^(a) Average size was measured by BSEM and image analysis, ^(b) Measured by laser scattering.

Specific surface area was measured by BET analysis.

IV.4. Discussion

Le rôle de la taille des particules de céramique phosphocalcique sur les processus d'inflammation et d'une ostéogénèse a été peu étudié *in vivo*. Nous avons observé que l'implantation des microparticules de BCP d'une taille moyenne de 5 μm en site intramusculaire chez le rat induisent une réponse inflammatoire avec la présence de macrophages et de cellules géantes [169]. La réponse cellulaire et tissulaire était relativement modérée par les grandes particules de BCP. Malard *et al* ont constaté que des microparticules de 10-20 μm induisent une réaction inflammatoire forte par rapport à des particules de plus grandes tailles (80-100 ou 200-400 μm). De plus, les petites particules de BCP (10-20 μm) ont conduit à une meilleure repousse osseuse ainsi qu'à un taux plus élevé de résorption/dégradation dans des défauts de taille critiques par rapport à des particules plus grosses [155]. Sous l'action de ces microparticules, des cellules macrophagiques ou des ostéoclastes peuvent libérer les facteurs de croissance ainsi que des cytokines pro inflammatoires (IL-6 ou TNF- α) qui stimuleraient la cicatrisation osseuse [210]. En effet, l'utilisation de souris déficientes en récepteur TNF- α provoque un retard de cicatrisation par rapport aux animaux témoins. Cette déficience du récepteur de TNF- α provoque une cicatrisation osseuse inachevée qui se traduit par des grands cals osseux non organisés. Certaines études ont démontré que des macrophages cultivés en présence de microparticules libéraient de fortes doses de cytokines (TNF- α et de IL-6) [165, 204-207]. Il a été rapporté que le milieu de culture de macrophages exposés à des microparticules, stimulait des ostéoblastes pour produire des médiateurs inflammatoires qui jouent un rôle important dans la résorption osseuse [208, 209, 211]. La présence de macrophages, ostéoclastes, ostéoblastes ainsi que des cellules souches a également été observée au niveau des fractures osseuses contribuant au processus de cicatrisation spontanée [212, 213].

Afin d'étudier les événements biologiques précédant l'ostéoinduction après implantation de matériau à base de BCP, nous avons analysé la réponse de macrophages (J774) et d'ostéoblastes (MC3T3-E1) en contact avec différentes tailles des microparticules (<20, 40-80 et 80-200 μm) pendant 24 heures. Nous avons observé un faible taux de mortalité des macrophages et des ostéoblastes en contact avec les microparticules de BCP 40-80 et 80-200

µm. Alors que les particules de <20 µm ont induit une mortalité plus élevée. Ces résultats *in vitro* vont dans les sens des résultats histologiques que nous avons obtenus après implantation intramusculaire des ces microparticules de BCP [169]. Les microparticules de BCP <20 µm ont stimulé la production de TNF-α et de l'IL-6 par les macrophages (J774), et plus particulièrement l'IL-6, alors que les particules de tailles supérieures n'ont pas influencé cette production. Ces résultats sont similaires avec d'autres études qui ont démontré que l'exposition de macrophages à des particules de différents biomatériaux stimulait la sécrétion de TNF-α et de l'IL-6 [206, 208, 214]. En outre, il a été démontré que ces médiateurs cellulaires augmentaient l'activité ostéoclastique qui est impliquée dans la résorption osseuse [215]. Mais aussi que le TNF-α inhibe la différenciation ostéoblastique *in vitro* [216]. Nous avons observé des résultats similaires avec réduction d'expression des gènes : Osterix, PTHR1 et d'Ostéocalcine en présence de TNF-α. L'interaction entre les macrophages et les ostéoblastes a été peu étudiée, et la source des cytokines n'a pas été clairement établie. Rodrigo *et al*, ont étudié un modèle de co-culture de cellules primaires ostéoblastiques humaines (hOB) et des macrophages de souris (J774) pour identifier l'origine des cytokines et l'interaction entre les cellules [206]. Ils ont observé une augmentation de production de TNF-α par les J774 cultivées seules avec les particules d'alumine en comparaison avec celle obtenue par co-culture avec des ostéoblastes. Ils n'ont pas observé d'augmentation significative de sécrétion d'IL-6 lorsque les macrophages ont été cultivés seuls avec les particules d'alumine. Par contre, le taux de sécrétion de l'IL-6 a augmenté par co-culture avec les ostéoblastes humains en présence des microparticules d'alumine. Ils ont aussi démontré que les ostéoblastes produisaient de l'IL-6 quand ils sont cultivés en contact avec des microparticules d'alumine. L'expression et la sécrétion de l'IL-6 par les ostéoblastes est modulée par la cytokine pro inflammatoire TNF-α [217, 218]. Ces expressions ont été décrites dans les macrophages stimulés [219] ainsi que par des fibroblastes [220]. Comparées aux particules d'alumine, les microparticules de BCP (<20 µm) stimulent la sécrétion d'IL-6 en l'absence des ostéoblastes. En même temps, l'expression des marqueurs ostéogéniques a augmentée quand les ostéoblastes ont été traités avec l'IL-6. En parallèle, les ostéoblastes traités avec les mêmes doses de TNF-α (10 ng/ml) présentent une inhibition de l'expression d'Osterix, de PTHR1 et de l'Ostéocalcine. Gilbert *et al* a rapporté que le TNF-α pourrait inhiber la différenciation ostéoblastiques et le recrutement des ostéoblastes à partir de cellules souches mésenchymateuses [216]. Il a également été mentionné que le TNF-α favorisait la résorption osseuse stimulant la prolifération et la différenciation des ostéoclastes et pourrait

activer les ostéoblastes indirectement [221]. L'expression des facteurs de transcription RUNX2 et Osterix est indispensable pour la différenciation vers le phénotype ostéoblastique. TNF- α inhibe la différenciation ostéoblastique par suppression d'IGF-1 et de RUNX2, et l'expression d'Osterix [222]. Ces résultats ont été obtenus *in vitro* malgré l'utilisation de lignées ostéoblastiques différenciées et non pas de cellules souches mésenchymateuses qui sont impliquées dans les premiers stades de la cicatrisation osseuse. Notre analyse RT-PCR suggère un double rôle de TNF- α et de l'IL-6 en physiologie osseuse. Le TNF- α inhibe la fonction ostéogénique par l'action sur des ostéoblastes mais augmente la résorption des débris osseux en stimulant les ostéoclastes. Alternativement, l'IL-6 sécrété par des ostéoblastes stimule des macrophages et augmente la dégradation des petites particules.

Afin, d'identifier les effets des cytokines sécrétés par les macrophages sur des ostéoblastes, il serait plus judicieux d'étudier un modèle de co-culture avec des macrophages et des ostéoblastes au contact de microparticules de BCP. Quelques auteurs ont également décrit l'implication des protéines de la morphogénèse osseuse (BMPs) produites par des macrophages sur la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes [160]. Il est connu que les BMPs sont largement impliquées dans le processus de formation et de la cicatrisation osseuse. Pour élucider ce processus, une co-culture de macrophages avec ces cellules souches mésenchymateuses (CSM) en contact avec des microparticules de BCP pourrait fournir des informations complémentaires sur les mécanismes de formation de tissu osseux ectopique au contact de ces implants.

Plusieurs études ont récemment indiqué que certains biomatériaux peuvent induire une formation osseuse après implantation dans des sites ectopiques pendant 6 à 12 semaines [129, 130, 202]. Actuellement, l'ostéoinduction a été observée avec des céramiques synthétiques d'hydroxyapatite, phosphate de calcium biphasé BCP, phosphate tricalcique, ciments phosphocalciques, bio verres et même avec l'oxyde de titane et l'alumine implantée dans les muscles de lapins, de chiens, de chèvres, de babouins et de porcs [119, 128, 129, 133, 136, 143]. L'ostéoinduction par les biomatériaux est un phénomène biologique complexe qui n'est pas encore entièrement élucidé. Il a été démontré que la formation d'os ectopique dépendait à la fois du matériau et du modèle animal. En outre, il a été décrit que la microstructure de surface jouait un rôle principal dans la capacité ostéoinductive des biocéramiques [136].

La microporosité est due au frittage inachevé de la céramique à une température relativement basse.

Dans ce chapitre, nous avons d'abord étudié l'effet de différentes tailles de microparticules de BCP caractérisées et implantées dans les muscles de rats pendant 7, 14 et 21 jours. Nous avons observé une encapsulation fibreuse similaire pour les 3 groupes tandis que le nombre total des cellules était significativement plus élevé pour les microparticules de BCP <20 μm que pour les 40- 80 et les 80-200 μm . Les macrophages étaient relativement plus présents dans le tissu interstitiel pour les plus petites microparticules que pour les autres fractions. Contrairement aux macrophages, les cellules géantes ont été plus présentes avec les particules de taille intermédiaire et grande taille que pour les plus petites. Les lymphocytes étaient présents en nombres comparables pour les 3 fractions et cela après les 3 délais. Par conséquent, les microparticules de BCP <20 μm induisent une forte réaction inflammatoire par rapport aux plus grandes tailles. Ces microparticules ayant un diamètre moyen autour de 5 μm pourraient mimer le détachement des grains liés aux céramiques microporeuses qui ont montrées des propriétés d'ostéoinduction dans divers modèles animaux.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié les effets de ces microparticules de BCP sur des macrophages (J774) et des ostéoblastes (MC3T3-E1) pendant 24 heures. Les petites particules (<20 μm) étaient nocives pour les macrophages et des ostéoblastes par rapport aux 40-80 et 80-200 μm . La sécrétion des cytokines, IL-6 et TNF- α était stimulée après culture des macrophages avec les BCP <20 μm . Les ostéoblastes cultivés en présence du TNF- α exprimaient une diminution de l'Ostéocalcine accompagné d'une inhibition de PTHR1 et d'Osterix. À l'inverse, les ostéoblastes cultivés avec les mêmes doses d'IL-6 présentaient une augmentation d'expression des marqueurs ostéogéniques. La stimulation des macrophages par de petites particules a induit la sécrétion de cytokines pro inflammatoires qui pourraient stimuler l'activité ostéoclastique par l'augmentation des interactions ostéoblastes/ostéoclastes par un mécanisme indirect. Les médiateurs cellulaires (cytokines, BMPs) peuvent jouer un rôle crucial dans la différenciation de la lignée ostéoblastique à partir de cellules souches mésenchymateuses et expliqueraient l'ostéogenèse observée au contact de céramique de BCP microporeuse dans les sites ectopiques.

Discussion générale

Discussion générale

Dans cette partie nous passons en revue les résultats amplement discutés dans les chapitres précédents (II-IV).

Nous avons proposé deux mécanismes possibles pour expliquer le phénomène intrigant de la formation d'os ectopique par des biomatériaux. Les deux mécanismes sont liés à la microstructure de la céramique. Les deux cascades d'événements biologiques suivantes peuvent se produire simultanément.

Dans la première hypothèse, la microstructure de surface peut favoriser la précipitation d'une apatite biologique par une surface d'échange accrue avec les fluides biologiques. Il a été démontré que des micropores (<5 μm de diamètre) augmentaient considérablement la dissolution de la céramique en contact avec les fluides biologiques et permettent la re-précipitation d'une apatite biologique sur la surface [107]. De plus, une surface spécifique plus importante dans la céramique microporeuse peut favoriser l'adsorption des protéines endogènes (ex. BMPs), qui ont une affinité élevée pour les phosphates de calcium [153]. Ces protéines ostéogéniques pourraient conduire à la différenciation de cellules souches en ostéoblastes sur la surface du matériau [152].

Le deuxième mécanisme possible de l'ostéoinduction par les biocéramiques pourrait être lié au détachement de microparticules après dissolution des joints de grains en contact avec les fluides biologiques. La libération de microparticules pourrait induire une réaction inflammatoire au contact de la céramique micro poreuse [154, 165]. Les cellules inflammatoires pourraient alors produire localement des cytokines qui stimuleraient alors les cellules souches circulantes pour se différencier en cellules ostéoblastiques, et ainsi produire le tissu osseux. Ce processus pourrait être semblable à celui observé pendant la cicatrisation osseuse de fractures, où des fragments osseux sont habituellement présents alors qu'une réaction inflammatoire est généralement observée.

Dans le chapitre II, nous avons synthétisé et caractérisé des poudres de phosphate de calcium amorphes de composition contrôlée. Ces poudres hautement réactives cristallisent autour de

650°C avec une importante diffusion de surface, la formation de joints de grains et un retrait de la céramique à des températures relativement basses. Ces poudres compactées avec des billes d'urée (700 µm) et frittées à basse température (1050°C) permettent d'obtenir des céramiques phosphocalciques composées d'HA, β-TCP ou de BCP. Ces céramiques possèdent une macro structure et d'une microporosité de surface. La macroporosité permet une diffusion optimale des fluides biologiques, l'invasion cellulaire et tissulaire. La microporosité de surface est indispensable à la bioactivité de la céramique par un processus de dissolution/re-précipitation et favorise l'adsorption de protéines ainsi que l'attachement des cellules. Cette surface constitue une zone bioactive qui servira à l'apposition d'une néoformation osseuse.

Influence de la microstructure sur l'ostéogénèse

Dans le chapitre III, nous avons comparé l'ostéogénicité de trois céramiques de phosphate de calcium biphasées (BCP) dans les muscles et dans les fémurs de chèvres pendant 6 et 12 semaines. Les céramiques avaient la même composition chimique (HA/β-TCP, 60/40) mais présentaient des microstructures différentes suivant les températures de frittage utilisées: 1050, 1125 et 1200°C. Ainsi, le diamètre moyen des micropores des céramiques BCP1050 et BCP1125 étaient de 0,36 et 0,45 µm alors que la céramique frittée à 1200°C (BCP1200) ne possédait pas de micropores mais une surface dense [110]. Ces différences de microstructure se sont traduites par des surfaces spécifiques de l'ordre de 2,66, 1,45 et 0,66 m²/g pour les céramiques BCP1050, BCP1125 et BCP1200. Ces matériaux ont montré des comportements biologiques différents. Après implantation dans les muscles et les fémurs de chèvre pendant 6 et 12 semaines, une zone de précipitation a été observée par MEB et sur les coupes histologiques à la surface des céramiques microporeuses BCP1050 et BCP1125. Cependant, nous n'avons pas observé de néoformation osseuse en site ectopique chez la chèvre après 12 semaines au contact de ces céramiques, alors qu'une étude précédente avec le même matériau avait montré une ostéogénèse (12% de tissu osseux minéralisé) après 24 semaines d'implantation chez le mouton [129]. Cette différence de résultat est probablement liée à plusieurs facteurs:

- le modèle animal pourrait être impliqué. En effet, le mouton et la chèvre ne présentent pas la même physiologie et des proportions différentes de cellules souches dans les tissus musculaires et adipeux [223, 224];
- la durée d'implantation semble jouer un rôle important. Dans notre étude, le délai le plus long était de 12 semaines, alors que dans l'étude chez le mouton il était de 24

semaines. Des études précédentes chez la chèvre ont montré que la formation d'os ectopique débutait à 12 semaines avec un pourcentage d'environ 2% (contact os/céramique) dans les pores de céramiques de BCP macro et microporeuses [168];

- la quantité du matériau implanté était différente dans les deux études. Nous avons implanté 0,3 g (0,8 cm³) dans les muscles de chèvre [110] et 1 g (2 cm³) de BCP dans les muscles de mouton [129]. L'effet de la quantité de matériau sur l'ostéoinduction a également été observé par Habibovic avec des céramiques semblables implantées dans les muscles de chèvre [130]. Une quantité plus importante de matériau pourrait favoriser la concentration de facteurs de croissance et le confinement des cellules au sein du matériau.

Effets des microparticules de phosphate de calcium sur l'ostéogénèse

Dans le chapitre IV, nous avons étudié l'effet de différentes tailles de microparticules de BCP (<20, 40-80 ou 80-200 µm) à la fois *in vivo* (muscles de rats) et *in vitro* (culture cellulaire de macrophages, ostéoblastes). Dans le but d'étudier le seul effet de la taille des particules, le même matériau (BCP) de rapport HA/β-TCP (60/40) fritté à 1200°C avec une surface non microporeuse a été utilisé.

Etude de l'inflammation in vivo par les céramiques phosphocalciques

Dans un premier article, nous avons évalué la réaction cellulaire et tissulaire par histologie suivant l'implantation de différentes tailles de microparticules de BCP (<20, 40-80 ou 80-200 µm) pendant 7, 14 et 21 jours dans les muscles de rats [169]. Comme nous l'avons rapporté dans les chapitre III et IV, cette étude a été réalisée afin de comprendre les étapes initiales de l'ostéoinduction par des céramiques microporeuses. En effet, nous avons proposé précédemment le caractère pro inflammatoire des microparticules libérées par des céramiques micro poreuses et son rôle dans l'ostéogénèse.

Dans cette étude, nous avons observé un nombre plus élevé de cellules au contact de microparticules de BCP<20 µm par rapport aux autres tailles. Ces petites particules (<20 µm) déclenchent une réaction inflammatoire plus forte avec une couche fibreuse infiltrée de macrophages, de cellules géantes et de lymphocytes. Dans une autre étude réalisée dans notre laboratoire avec le même matériau implanté en site osseux, une forte réaction inflammatoire a été observée au contact de microparticules (10-20 µm) de BCP 60/40 [155]. Il a été également constaté que les petites particules induisaient une meilleure cicatrisation osseuse dans des

défauts de taille critique chez le rat. Il a été proposé qu'une réaction inflammatoire intense mais limitée dans le temps (rapide), induite par des microparticules pourrait promouvoir l'ostéogenèse. Cette réaction inflammatoire serait associée à une libération importante de médiateurs cellulaires qui pourrait jouer un rôle primordial dans la différenciation des cellules souches en ostéoblastes [212, 213].

Effet des micro particules de céramiques sur le comportement cellulaire in vitro

Dans un deuxième article du chapitre IV, nous avons évalué l'effet de ces microparticules *in vitro* en présence de macrophages (J774) et d'ostéoblastes (MC3T3-E1). Nous avons observé une mortalité cellulaire plus élevée au contact de microparticules (<20 µm) par rapport aux autres tailles. Ces mêmes particules induisaient une forte libération de cytokines (TNF- α et IL-6) par les macrophages. L'analyse de l'expression ostéogénique par les ostéoblastes montre une inhibition du phénotype ostéoblastique en présence de TNF- α . La culture des ostéoblastes en présence d'IL-6 indique une surexpression de certains marqueurs ostéogéniques. Plusieurs travaux ont montré les effets de nano ou de microparticules *in vitro* sur la sécrétion de ces cytokines par des macrophages [165, 204-208, 214]. Selon Nanes, le TNF- α inhibe la fonction ostéogénique par son action sur les ostéoblastes tout en augmentant la résorption osseuse en stimulant les ostéoclastes [222]. D'autres auteurs ont confirmé l'implication du TNF- α dans l'ostéoclastogenèse [225-227]. Au contact de microparticules, la cytokine TNF- α sécrétée par les macrophages pourrait donc inhiber directement la différenciation ostéoblastique mais activer la résorption ostéoclastique. Ce processus de résorption de particules dans un environnement biologique a également été observé en proximité des prothèses orthopédiques [165, 228, 229]. Après analyse du tissu avoisinant une prothèse, on a trouvé une membrane granulomateuse, avec présence de macrophages, fibroblastes, lymphocytes ainsi que des cellules géantes [228]. Des cytokines ont été identifiées dans le surnageant de culture de cette même membrane. Des ostéoblastes ont été localisés au voisinage de la prothèse. Cependant, la réaction cellulaire (macrophages) dépend de la taille, la composition et la concentration des microparticules dans l'environnement biologique [230, 231].

Ces études *in vitro* montrent des réactions cellulaires variables dépendantes des caractéristiques du matériau utilisé (taille, composition) et des types cellulaires utilisés (lignées macrophages, ostéoblastes, cellules souches mésenchymateuses, etc.). Même si l'approche *in vitro* permet d'étudier un processus biologique au niveau de l'expression génétique et de la sécrétion de cytokines, elle reste limitée à des cultures monocellulaires ou à

des co-cultures relativement simples. La culture cellulaire ne permet pas de reproduire la complexité des environnements cellulaires rencontrés *in vivo* et l'étude histologique reste nécessaire pour la compréhension des interactions cellules/biomatériaux.

Comparaison des propriétés ostéogéniques des biocéramiques avec l'autogreffe

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, les propriétés biologiques et les capacités ostéogéniques des autogreffes osseuse sont liées à :

- la nature du greffon (vascularisation, taille) qui détermine également sa viabilité et sa résorption après transplantation [64, 65, 67];
- la technique de prélèvement (forage, aspiration, ostéotomie) et la durée de manipulation (température, oxygénation, nutriment) qui influe sur sa viabilité et ses capacités à régénérer le tissu osseux [62, 66];
- le site d'implantation de la greffe (cortical ou trabéculaire) qui détermine également la cicatrisation osseuse [64].

Des études précédentes ont décrit les capacités d'ostéoinduction de l'autogreffe osseuse [55, 61, 76] et des céramiques phosphocalciques [128, 129, 130]. Dans l'étude que nous avons réalisée chez la chèvre, nous n'avons pas observé de néoformation osseuse après implantation d'une autogreffe osseuse en site musculaire. L'autogreffe osseuse a été fortement résorbée en site musculaire par l'activité de cellules macrophagiques. L'absence d'ostéoinduction est probablement due à une résorption rapide de l'autogreffe avant une possible néoformation osseuse. Bien que l'autogreffe osseuse soit considérée comme ostéoinductrice par la présence de BMPs et de cellules ostéoprogénitrices, nous n'observons pas d'ostéogenèse en site ectopique. Cependant, l'implantation ectopique de DBM induit une ostéogenèse qui pourrait résulter d'une concentration supra physiologique de BMPs dans l'os humain déminéralisé [79].

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de néoformation osseuse au contact des céramiques implantée en site musculaire après 12 semaines. Les céramiques microporeuses BCP1050 et BCP1125 ont toutefois montré une zone de re-précipitation en surface alors que la céramique dense BCP1200 ne semblait interagir que très superficiellement avec les fluides biologiques. En comparaison à l'autogreffe, ces céramiques sont très faiblement résorbées et restent présentes dans les sites musculaires.

Les propriétés d'ostéogénicité de différentes céramiques ont été étudiées dans des défauts osseux de taille critique chez la chèvre [177, 232]. Dans ces modèles, les défauts osseux non comblés ne cicatrisent pas et sont remplis de tissu fibreux [38]. Toutefois, le comblement de ces défauts par des céramiques phosphocalciques a permis une cicatrisation osseuse partielle par ostéoconduction. Il a été montré que le contact os/céramique, la quantité d'os ainsi que la pénétration du tissu osseux dans les macro pores de la céramique étaient plus importants dans le cas d'une céramique microporeuse que dans le cas du même matériau fritté à plus haute température [177]. Cependant, ce modèle de défaut dans l'os iliaque de chèvre ne permet pas de s'affranchir de l'ostéoconduction et reste fortement conditionné par l'interconnexion de la céramique macro poreuse. Nous avons donc conçu un modèle qui permet l'implantation de céramiques ou d'autogreffe sans la contribution de l'ostéoconduction. Nous avons implantés des cylindres en PTFE creux et percés (diffusion de fluides biologiques et des cellules) dans des défauts de taille critique pendant 6 et 12 semaines dans les condyles fémoraux de chèvre. Les cylindres remplis d'autogreffe ne montrent pas de néoformation osseuse mais sa résorption. La quantité d'os minéralisé diminue fortement après 12 semaines. Dans ce modèle, les cylindres remplis de céramiques de BCP frittées à 1050 et 1125°C montrent une néoformation osseuse au contact de ces céramiques microporeuses. Cette formation osseuse n'était pas en continuité avec les berges du défaut osseux. Le même matériau fritté à 1200°C ne montrait aucune formation osseuse démontrant ainsi des propriétés biologiques fortement corrélées à la microstructure des céramiques.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales

Les objectifs de ce travail étaient, la synthèse d'une céramique phosphocalcique biphasée; et l'étude des phénomènes précoces de l'ostéoinduction par ces céramiques.

Ce travail nous a permis de :

- Synthétiser et de caractériser une céramique phosphocalcique macro microporeuse par ajout d'un porogène et grâce à un frittage à basse température (1050°C);
- Comparer l'ostéogénicité de l'autogreffe osseuse et des céramiques de phosphate de calcium dans des sites ectopiques et osseux chez la chèvre. Un modèle permettant d'étudier l'ostéogénicité dans des défauts osseux de taille critique sans la contribution de l'ostéoconduction a été conçu et validé. Nous avons observé une résorption rapide de l'autogreffe osseuse dans ces deux sites après 6 et 12 semaines alors que les céramiques sont faiblement résorbées. Il n'y a pas eu de néoformation osseuse en site ectopique ni au contact des céramiques ni au contact de l'autogreffe osseuse. Par contre, nous avons observé une néoformation osseuse au contact de céramiques microporeuses placées dans les cylindres creux. Nous avons constaté que la microstructure de surface influençait les propriétés biologiques des céramiques. Ces dernières présentaient une ostéogénicité variable selon la microstructure de surface;
- Etudier l'effet de taille des microparticules de phosphate de calcium sur les réactions tissulaires et cellulaires *in vivo* et *in vitro*. Nous avons montré que de petites particules (<20 µm) de BCP induisent une forte réaction tissulaire et cellulaire après implantation dans les muscles de rats. Dans le tissu réactionnel, de nombreuses cellules sont présentes (macrophages, cellules géantes et lymphocytes). La culture de macrophages en contact avec ces microparticules, a montré une libération de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF- α). Des ostéoblastes cultivés en présence de ces cytokines ont montré une augmentation de l'expression ostéogénique avec l'IL-6 mais cette expression était inhibée par le TNF- α .

Perspectives

Afin de comprendre le phénomène de l'ostéoinduction par certaines céramiques, il reste nécessaire d'étudier l'adsorption des protéines osseuses sur les biocéramiques au niveau de la microstructure de surface (micropores) après implantation ectopique. L'analyse qualitative et quantitative de ces protéines pourrait être réalisée sur les coupes histologiques par microscopie infra rouge (IRTF). Les techniques d'immunologie avec des anticorps spécifiques couplés à des particules d'or (Immunogold) observées en microscopie électronique en transmission ou à balayage (MET ou MEB) permettraient également de localiser des protéines adsorbées à la surface des céramiques implantées.

Les résultats obtenus chez la brebis [129] et ceux obtenus chez la chèvre [110] avec un matériau identique (granules de BCP 60/40) implanté en site musculaire ne sont pas concordants. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la quantité de matériau implanté, différentes compositions chimiques ou des tailles de particules plus petites sur l'ostéogenèse en site ectopique de différents animaux.

L'étude du mécanisme d'ostéoinduction par les céramiques et en particulier le rôle de l'inflammation devrait être étudié à la fois *in vitro* et *in vivo*. Des co-cultures macrophages/ostéoblastes ou macrophages/cellules souches en présence des microparticules permettraient de comprendre les interactions entre ces cellules qui interviennent dans la cicatrisation osseuse.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Derkx P, Nigg AL, Bosman FT, Birkenhager-Frenkel DH, Houtsmuller AB, Pols HA, et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone*. 1998 Apr;22(4):367-73.
2. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*. 2000 Jan;142(1):9-21.
3. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*. 1996 Jan 19;271(5247):360-2.
4. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*. 1999 Mar;17(2):269-78.
5. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Jan(346):26-37.
6. Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*. 2002 Dec 15;13(6):e2.
7. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1992 Oct;4(5):850-5.
8. Ripamonti U, Ma SS, Cunningham NS, Yeates L, Reddi AH. Reconstruction of the bone--bone marrow organ by osteogenin, a bone morphogenetic protein, and demineralized bone matrix in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg*. 1993 Jan;91(1):27-36.
9. Oshin AO, Stewart MC. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007;20(3):151-8.
10. Reddi AH. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll Relat Res*. 1981 Feb;1(2):209-26.
11. Sasano Y, Ohtani E, Narita K, Kagayama M, Murata M, Saito T, et al. BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo*. *Anat Rec*. 1993 Jun;236(2):373-80.
12. Kuboki Y, Saito T, Murata M, Takita H, Mizuno M, Inoue M, et al. Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively; geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Connect Tissue Res*. 1995;32(1-4):219-26.

13. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone*. 2005 May;36(5):745-57.
14. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1994 Oct;4(5):737-44.
15. Elima K. Osteoinductive proteins. *Ann Med*. 1993 Aug;25(4):395-402.
16. Desbois C, Karsenty G. Osteocalcin cluster: implications for functional studies. *J Cell Biochem*. 1995 Mar;57(3):379-83.
17. Flores ME, Heinegard D, Reinholt FP, Andersson G. Bone sialoprotein coated on glass and plastic surfaces is recognized by different beta 3 integrins. *Exp Cell Res*. 1996 Aug 25;227(1):40-6.
18. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.
19. Fredericson M, Jennings F, Beaulieu C, Matheson GO. Stress fractures in athletes. *Top Magn Reson Imaging*. 2006 Oct;17(5):309-25.
20. Duhamel P, Bonnet PM, Pons F, Jourdan P, Jancovici R. [Thoracic ballistic traumatism. Wounding agents and wound ballistic]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2003 Apr;48(2):128-34.
21. Revel M. [Whiplash injury of the neck from concepts to facts]. *Ann Readapt Med Phys*. 2003 Apr;46(3):158-70.
22. Marsh D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct(355 Suppl):S22-30.
23. Babhulkar S, Pande K, Babhulkar S. Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Feb(431):50-6.
24. Ring D, Barrick WT, Jupiter JB. Recalcitrant nonunion. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Jul(340):181-9.
25. Huang KY, Wang CR, Yang RS. Rare clinical experiences for surgical treatment of melanoma with osseous metastases in Taiwan. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jul 25;8(1):70.
26. Virk MS, Lieberman JR. Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S5.
27. Chrobok A, Spindel J, Mrozek T, Mischczyk L, Koczy B, Tomasik P, et al. Partial long-stem resection Austin-Moore hip endoprosthesis in the treatment of metastases to the proximal femur. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2005 Dec 30;7(6):600-3.

28. Biswas D, Gupta P, Gupta P, Prasad R, Arya M. A case of chronic osteomyelitis due to arcanobacterium hemolyticum. *Indian J Med Microbiol.* 2003 Jul-Sep;21(3):209-10.
29. Alarcon GS. Arthritis due to tuberculosis, fungal infections, and parasites. *Curr Opin Rheumatol.* 1992 Aug;4(4):516-9.
30. Malcius D, Barauskas V, Uzkuiraitė R. Some aspects of long-term results of treatment of acute hematogenous osteomyelitis. *Medicina (Kaunas).* 2007;43(6):472-7.
31. Chaffins JA. Paget disease of bone. *Radiol Technol.* 2007 Sep-Oct;79(1):27-40; quiz 1-3.
32. Bonnick SL. Osteoporosis in men and women. *Clin Cornerstone.* 2006;8(1):28-39.
33. Villa A, Vezzoni P, Frattini A. Osteopetroses and immunodeficiencies in humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006 Dec;6(6):421-7.
34. Labovitz JM, Revill K. Osteoporosis: pathogenesis, new therapies and surgical implications. *Clin Podiatr Med Surg.* 2007 Apr;24(2):311-32.
35. Thompson KG, Dittmer KE, Blair HT, Fairley RA, Sim DF. An outbreak of rickets in Corriedale sheep: evidence for a genetic aetiology. *N Z Vet J.* 2007 Jun;55(3):137-42.
36. Mahboubi S, Glaser DL, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Pediatr Radiol.* 2001 May;31(5):307-14.
37. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr(205):299-308.
38. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990 Jan;1(1):60-8.
39. Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(4):393-402.
40. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966 Dec;16(3):381-90.
41. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991 Fall;2(3):187-208.
42. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998 Sep-Oct;11(5):391-401.
43. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.
44. Senn, N S. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 1889;98(3):219–43.

45. Bridges JB, Pritchard JJ. Bone and cartilage induction in the rabbit. *J Anat.* 1958 Jan;92(1):28-38.
46. Huggins CB. The phosphatase activity of transplants of the epithelium of the urinary bladder to the abdominal wall producing heterotopic ossification. *Biochem J.* 1931;25(3):728-32.
47. Levander, G. On the formation of new bone in bone transplantation. *Acta Chir Scand.* 1934;74:425–6.
48. Levander, G. A study of bone regeneration. *Surg Gynecol Obstet.* 1938(67):705–14.
49. Urist MR, McLEAN FC. Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg Am.* 1952 Apr;34-A(2):443-76.
50. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res.* 1967 Jul-Aug;53:243-83.
51. Friedenstein AY. Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res.* 1968 Jul-Aug;59:21-37.
52. Wilson-Hench J. Osteoinduction. In: Williams D, editor. *Progress in biomedical engineering.* Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 29.
53. Schmid U, Thielemann F, Weise K, Ochs BG. [A novel therapeutic approach to bone replacement: vitalisation of industrial processed allogenic bone graft with autologous bone marrow]. *Z Orthop Unfall.* 2007 Mar-Apr;145(2):221-9.
54. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr(205):269-91.
55. Desai BM. Osteobiologics. *Am J Orthop.* 2007 Apr;36(4 Suppl):8-11.
56. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct(367 Suppl):S107-17.
57. Zarate-Kalfopulos B, Reyes-Sanchez A. Bone grafts in orthopedic surgery. *Cir Cir.* 2006 May-Jun;74(3):217-22.
58. Tampieri A, Celotti G, Landi E, Sandri M, Roveri N, Falini G. Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Nov 1;67(2):618-25.
59. Cornell CN. Osteobiologics. *Bull Hosp Jt Dis.* 2004;62(1-2):13-7.
60. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am.* 1982 Feb;64(2):270-9.

61. Helm GA, Dayoub H, Jane JA, Jr. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):E4.
62. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):175-85.
63. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 1988 Jan(226):292-8.
64. Petite H. La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Medecine/Sciences*. 2002;18:995-1002.
65. Chen WJ, Jingushi S, Jingushi K, Iwamoto Y. *In vivo* banking for vascularized autograft bone by intramuscular inoculation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and beta-tricalcium phosphate. *J Orthop Sci*. 2006 May;11(3):283-8.
66. Berengo M, Bacci C, Sartori M, Perini A, Della Barbera M, Valente M. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol*. 2006 Apr;55(4):189-98.
67. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Mar(360):71-86.
68. Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. *J Trauma*. 2006 Jun;60(6):1322-9.
69. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Aug(329):300-9.
70. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989;3(3):192-5.
71. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD. Osteogenicity of autologous bone transplants in the goat. *Transplantation*. 2004 Feb 27;77(4):504-9.
72. Axhausen W. The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historical and experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 1956 Jun;38-A(3):593-600.
73. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am*. 1975 Mar;57(2):237-52.
74. De Bruyn PP, Kabisch WT. Bone formation by fresh and frozen, autogenous and homogenous transplants of bone, bone marrow and periosteum. *Am J Anat*. 1955 May;96(3):375-417.

75. Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC, Schmelzeisen R, Schramm A, Dott B, et al. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Feb;18(1):69-73.
76. Thorwarth M, Srour S, Felszeghy E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Schlegel KA. Stability of autogenous bone grafts after sinus lift procedures: a comparative study between anterior and posterior aspects of the iliac crest and an intraoral donor site. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Sep;100(3):278-84.
77. Verhoeven JW, Cune MS, Terlouw M, Zoon MA, de Putter C. The combined use of endosteal implants and iliac crest onlay grafts in the severely atrophic mandible: a longitudinal study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Oct;26(5):351-7.
78. Macewen W. Intrahuman bone grafting and reimplantation of bone. *Ann Surg.* 1909 1909;50::959-68.
79. Urist MR, Strates BS. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1970;71:271-8.
80. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. *In vitro* osteoinduction of demineralized bone. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1998 May;26(3):309-15.
81. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Dec(357):219-28.
82. Brantigan JW, Cunningham BW, Warden K, McAfee PC, Steffee AD. Compression strength of donor bone for posterior lumbar interbody fusion. *Spine.* 1993 Jul;18(9):1213-21.
83. Chappard D, Zhioua A, Grizon F, Basle MF, Rebel A. [Biomaterials for bone filling: comparisons between autograft, hydroxyapatite and one highly purified bovine xenograft]. *Bull Assoc Anat (Nancy).* 1993 Dec;77(239):59-65.
84. Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Nov(200):322-42.
85. Tuominen T, Jamsa T, Tuukkanen J, Marttinen A, Lindholm TS, Jalovaara P. Bovine bone implant with bovine bone morphogenetic protein in healing a canine ulnar defect. *Int Orthop.* 2001;25(1):5-8.
86. Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater.* 2004;8:1-10; discussion -1.
87. Arnaud E. Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical prospects. *Childs Nerv Syst.* 2000 Nov;16(10-11):659-68.

88. Cunin G, Boissonnet H, Petite H, Blanchat C, Guillemin G. Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material. *Spine*. 2000 May 1;25(9):1070-6.
89. Yukna RA. Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1994 Feb;65(2):177-85.
90. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*. 1991;15:1-201.
91. Habibovic P. Properties and clinical relevance of osteoinductive materials: University of Twente; 2005.
92. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
93. Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, et al. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *J Orthop Res*. 2006 Apr;24(4):628-35.
94. Guan L, Davies JE. Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Dec 1;71(3):480-7.
95. Sanginario V, Ginebra MP, Tanner KE, Planell JA, Ambrosio L. Biodegradable and semi-biodegradable composite hydrogels as bone substitutes: morphology and mechanical characterization. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 May;17(5):447-54.
96. Llambes F, Silvestre FJ, Caffesse R. Vertical guided bone regeneration with bioabsorbable barriers. *J Periodontol*. 2007 Oct;78(10):2036-42.
97. Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthop Belg*. 2003;69(1):1-8.
98. Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans*. 2006 Nov 28(44):5211-20.
99. Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, et al. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. *Biomaterials*. 2007 Jul 3.
100. Fan H, Ikoma T, Tanaka J, Zhang X. Surface structural biomimetics and the osteoinduction of calcium phosphate biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007 Mar;7(3):808-13.
101. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Feb(395):81-98.
102. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(16):1473-8.

103. Daculsi G, Bouler JM, LeGeros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int Rev Cytol.* 1997;172:129-91.
104. Bouler JM, Trecant M, Delecrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res.* 1996 Dec;32(4):603-9.
105. Winter M, Griss P, de Groot K, Tagai H, Heimke G, von Dijk HJ, et al. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1981 Jul;2(3):159-60.
106. Basle MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delecrin J, Daculsi G, et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif Tissue Int.* 1993 Nov;53(5):348-56.
107. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int.* 1990 Jan;46(1):20-7.
108. LeGeros R, Daculsi G. The *in vivo* behaviour of biphasic calcium phosphate. Histological, ultrastructural and physico-chemical characterization. In: Yamamuro T, Hench LL, Wilson-Hench JW, editors.; 1990.
109. Eid K, Zelicof S, Perona BP, Sledge CB, Glowacki J. Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intrasosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *J Orthop Res.* 2001 Sep;19(5):962-9.
110. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* 2008;29:1177-88.
111. Benahmed M, Bouler JM, Heymann D, Gan O, Daculsi G. Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate by human monocytes *in vitro*: a morphological study. *Biomaterials.* 1996 Nov;17(22):2173-8.
112. Gross UM, Muller-Mai CM, Voigt C. The interface of calcium-phosphate and glass-ceramic in bone, a structural analysis. *Biomaterials.* 1990 Jul;11:83-5.
113. Benahmed M, Blottiere H, Praloran V, Daculsi G. Monocyte activity in the presence of calcium phosphate activated by 1,25 (OH)₂ VD₃ and interferon-gamma. *Biomaterials.* 1994 Jan;15(1):25-30.
114. Winter GD, Simpson BJ. Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs. *Nature.* 1969 Jul 5;223(5201):88-90.

115. Shehab D, Elgazzar AH, Collier BD. Heterotopic ossification. *J Nucl Med.* 2002 Mar;43(3):346-53.
116. LEDOUARIN, N. Embryologie cellulaire et moléculaire. Paris: Académie des Sciences; 1988-2000.
117. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Feb(395):4-10.
118. de Groot K. Letter: Some considerations about bone-induction. *Calcif Tissue Res.* 1973 Dec 31;13(4):335-7.
119. Klein C, de Groot K, Chen W, Li Y, Zhang X. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. *Biomaterials.* 1994 Jan;15(1):31-4.
120. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials.* 1996 Jan;17(1):31-5.
121. Yamasaki H, Sakai H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials.* 1992;13(5):308-12.
122. Ripamonti U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg Am.* 1991 Jun;73(5):692-703.
123. Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Aug;53(8):915-22; discussion 22-3.
124. Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Feb;109(2):619-30.
125. Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 1998 Dec;9(12):723-6.
126. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1999 Oct;20(19):1799-806.
127. Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med.* 2001 Jan;12(1):7-13.
128. Yuan H, Van Den Doel M, Li S, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med.* 2002 Dec;13(12):1271-5.

129. Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone*. 2005 Jun;36(6):1086-93.
130. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jun 15;77(4):747-62.
131. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials*. 2000 Jun;21(12):1283-90.
132. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr;15(4):373-80.
133. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep 15;66(4):779-88.
134. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res*. 2001 May 1;58(3):270-6.
135. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):443-50.
136. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*. 2005 Jan;26(1):23-36.
137. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jan-Feb;1(1):25-32.
138. Ripamonti U. Tissue morphogenesis and tissue engineering by bone morphogenetic proteins. *Sadj*. 1999 Jun;54(6):257-62.
139. Yuan H. Osteoinduction of calcium phosphate: University of Leiden, The Netherland; 2001.
140. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed *in vivo* in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res*. 1991 Jan(262):298-311.
141. Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, Tabata S. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1993 Nov;27(11):1401-7.

142. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res*. 1989;7(4):568-78.
143. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 1996 Nov;17(22):2131-7.
144. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1992 Jun;32(2):160-7.
145. Ripamonti U, Crooks J, Kirkbride A. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *South African Journal of Science*. 1999;95:335-43.
146. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3230-7.
147. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed *in vivo* with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials*. 1991 Mar;12(2):253-8.
148. Sempuku T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Osteogenic potential of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics: a histological study. *J Orthop Res*. 1996 Nov;14(6):907-13.
149. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Koerten HK, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1997 Oct;37(1):122-9.
150. Yuan H. Rapid osteogenesis in porous biphasic calcium phosphate ceramics implanted in domestic pigs. *Biomed Eng Appli Bas Com*. 1997;9:268-73.
151. Green JP, Wojno TH, Wilson MW, Grossniklaus HE. Bone formation in hydroxyapatite orbital implants. *Am J Ophthalmol*. 1995 Nov;120(5):681-2.
152. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):1133-40.
153. De Groot J. Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein *in vivo*. *Tissue Eng*. 1998 Winter;4(4):337-41.
154. Lu J, Blary MC, Vavasseur S, Descamps M, Anselme K, Hardouin P. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr;15(4):361-5.

155. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary *in vitro* and *in vivo* study. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jul;46(1):103-11.
156. Solheim E, Sudmann B, Bang G, Sudmann E. Biocompatibility and effect on osteogenesis of poly(ortho ester) compared to poly(DL-lactic acid). *J Biomed Mater Res.* 2000 Feb;49(2):257-63.
157. Xia ZD, Zhu TB, Du JY, Zheng QX, Wang L, Li SP, et al. Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite(CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An *in vivo* study. *Chin Med J (Engl).* 1994 Nov;107(11):845-9.
158. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 1975 Jan;78(1):71-100.
159. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81.
160. Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone.* 2002 Jan;30(1):26-31.
161. Takebe J, Champagne CM, Offenbacher S, Ishibashi K, Cooper LF. Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Feb 1;64(2):207-16.
162. Danon D, Kowatch MA, Roth GS. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(6):2018-20.
163. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol.* 2001 Oct;70(4):478-90.
164. Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Kanda A, Sasaki H. Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis. *J Immunol.* 2005 Jun 15;174(12):7531-8.
165. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes *in vitro*. *Biomaterials.* 2003 Jul;24(16):2739-47.
166. Layrolle P, Lebugle A. Characterization and Reactivity of Nanosized Calcium Phosphates Prepared in Anhydrous Ethanol. *Chem Mater.* 1994;6:1996-2004.

167. Layrolle P, Lebugle A. Synthesis in Pure Ethanol and Characterization of Nanosized Calcium Phosphate Fluoroapatite. *Chem Mater.* 1996;8:134-44.
168. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(17):3565-75.
169. Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Feb;18(2):287-94.
170. De Groot k. *Bioceramics of calcium phosphate.* CRC Press Inc; Boca Raton, Florida, 1983.
171. Heughebaert JC, Montel G. Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate. *Calcif Tissue Int.* 1982;34 Suppl 2:S103-8.
172. Layrolle P, Ito A, Tateishi T. Sol-Gel synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81(6):1421-28.
173. Li SH, De Wijn JR, Layrolle P, de Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jul;61(1):109-20.
174. Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, et al. Biphasic calcium phosphate: A comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Jan;84(1):1-6.
175. Shihong LI, Wijn JRD, Jiaping LI, Layrolle P, De Groot K. Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tiss Eng.* 2003;9(3):535-48.
176. Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martinez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(17):3671-80.
177. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):867-76.
178. Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Jul;78(1):139-47.
179. Burchardt H. *Biology of bone transplantation.* *Orthop Clin North Am.* 1987 Apr;18(2):187-96.

180. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Mar;14(3):195-200.
181. Ripamonti U, Crooks J, Rueger DC. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Apr 1;107(4):977-88.
182. Le Nihouannen D, Goyenvalle E, Aguado E, Pilet P, Bilban M, Daculsi G, et al. Hybrid composites of calcium phosphate granules, fibrin glue, and bone marrow for skeletal repair. *J Biomed Mater Res A*. 2007 May;81(2):399-408.
183. Bouler JM, LeGeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 15;51(4):680-4.
184. Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 May;16(5):467-75.
185. Petit JC, Ripamonti U. Tissue segregation enhances calvarial osteogenesis in adult primates. *J Craniofac Surg*. 1994 Feb;5(1):34-43.
186. Gauthier O, Goyenvalle E, Bouler JM, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 May;12(5):385-90.
187. Soballe K, Brockstedt-Rasmussen H, Hansen ES, Bunger C. Hydroxyapatite coating modifies implant membrane formation. Controlled micromotion studied in dogs. *Acta Orthop Scand*. 1992 Apr;63(2):128-40.
188. Clemens JA, Klein CP, Sakkers RJ, Dhert WJ, de Groot K, Rozing PM. Healing of gaps around calcium phosphate-coated implants in trabecular bone of the goat. *J Biomed Mater Res*. 1997 Jul;36(1):55-64.
189. Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.
190. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Jan;3(1):49-57.
191. Jensen SS, Broggin N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Jun;17(3):237-43.

192. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001 May;30(3):157-61.
193. Kim KW, Ha KY, Moon MS, Kim YS, Kwon SY, Woo YK. Volumetric change of the graft bone after intertransverse fusion. *Spine*. 1999 Mar 1;24(5):428-33.
194. van der Meij AJ, Baart JA, Prahl-Andersen B, Valk J, Kostense PJ, Tuinzing DB. Computed tomography in evaluation of early secondary bone grafting. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994 Jun;23(3):132-6.
195. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Jun;9(3):151-62.
196. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*. 1989 Aug;23(8):883-94.
197. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res*. 2007 Jun;25(6):741-9.
198. Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Dec;9(12):717-21.
199. Taddei F, Viceconti M, Manfrini M, Toni A. Growth and remodelling of the autologous bone transplant used in a pediatric femoral reconstruction. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2002;216(2):95-104.
200. Nam W, Kim HJ, Choi EC, Kim MK, Lee EW, Cha IH. Contributing factors to mandibulotomy complications: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Mar;101(3):e65-70.
201. Piattelli A, Scarano A, Russo P, Matarasso S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials*. 1996 Apr;17(8):791-6.
202. Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron*. 2005;36(7-8):583-92.
203. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Umezumi H, Arai K, Kudo N, et al. Osteoinduction with highly purified beta-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4419-27.
204. Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone*. 2006 Nov;39(5):1107-15.

205. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, et al. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages *in vitro*. *J Biomed Mater Res*. 1996 May;31(1):19-26.
206. Rodrigo A, Valles G, Saldana L, Rodriguez M, Martinez ME, Munuera L, et al. Alumina particles influence the interactions of cocultured osteoblasts and macrophages. *J Orthop Res*. 2006 Jan;24(1):46-54.
207. Huang J, Best SM, Bonfield W, Brooks RA, Rushton N, Jayasinghe SN, et al. *In vitro* assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr;15(4):441-5.
208. Horowitz SM, Rapuano BP, Lane JM, Burstein AH. The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements. *Calcif Tissue Int*. 1994 Apr;54(4):320-4.
209. Horowitz SM, Purdon MA. Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. *J Biomed Mater Res*. 1995 Apr;29(4):477-84.
210. Iqbal J, Sun L, Kumar TR, Blair HC, Zaidi M. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14925-30.
211. Horowitz SM, Gonzales JB. Effects of polyethylene on macrophages. *J Orthop Res*. 1997 Jan;15(1):50-6.
212. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*. 2006 Apr;35(3):232-42.
213. Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res*. 2005 Sep;23(5):1013-21.
214. Horowitz SM, Purdon MA. Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int*. 1995 Oct;57(4):301-5.
215. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):49-60.
216. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):3956-64.

217. Kurokouchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H, et al. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.* 1998 Aug;13(8):1290-9.
218. Takei H, Pioletti DP, Kwon SY, Sung KL. Combined effect of titanium particles and TNF-alpha on the production of IL-6 by osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res.* 2000 Nov;52(2):382-7.
219. Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, Stow JL. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *J Cell Biol.* 2007 Jul 2;178(1):57-69.
220. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):510-4.
221. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):4858-64.
222. Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene.* 2003 Dec 4;321:1-15.
223. Rouger K, Fornasari B, Armengol V, Jouvion G, Leroux I, Dubreil L, et al. Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J Histochem Cytochem.* 2007 Jun;55(6):607-18.
224. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab.* 2006 Nov;32(5 Pt 1):393-401.
225. Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* 1995 Aug;17(2 Suppl):63S-7S.
226. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996 Aug;11(8):1043-51.
227. Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. *J Pathol.* 2002 Oct;198(2):220-7.
228. Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, et al. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br.* 1998 May;80(3):531-9.
229. Malik A, Maheshwari A, Dorr LD. Impingement with total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Aug;89(8):1832-42.

230. Olivier V, Duval JL, Hindie M, Pouletaut P, Nagel MD. Comparative particle-induced cytotoxicity toward macrophages and fibroblasts. *Cell Biol Toxicol.* 2003 Jun;19(3):145-59.
231. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res.* 1994 Jan;28(1):81-90.
232. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, et al. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *J Orthop Res.* 2004 May;22(3):544-51.

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1 : Défauts osseux de « taille critique » chez différentes espèces

Tableau 2 : Les propriétés des autogreffes et allogreffes osseuses

Tableau 3 : Substituts des greffes osseuses

Tableau 4 : Ostéoinduction par les phosphates de calcium chez différentes espèces

Tableau 5 : Néoformation osseuse en site musculaire après implantation de BCP dans les muscles de chiens en fonction du temps d'implantation

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale du tissu osseux

Figure 2 : Structure osseuse d'une zone trabéculaire

Figure 3 : Les cellules du tissu osseux

Figure 4 : Ossification endochondrale

Figure 5 : Ossification intra membranaire (crâne de souris 16 jours)

Figure 6 : Remodelage osseux

Figure 7 : Schéma d'une fracture (1 à 10 jours)

Figure 8 : Cicatrisation suite à une fracture

Figure 9 : Comblement de défauts osseux. (a) défaut cicatrisable, (b) défaut de taille critique (*DTC*)

Figure 10 : Prélèvement et aspect d'une autogreffe osseuse au niveau de la crête iliaque

Figure 11: Ostéoinduction par précipitation d'une apatite biologique et adsorption de BMPs sur la surface d'une céramique à base de phosphate de calcium

Figure 12 : Ostéoinduction par une céramique phosphocalcique, effet de microparticules et rôle de l'inflammation

SUMMARY

Autologous bone graft is considered as the “gold standard” for filling bone defects, however it presents some disadvantages. Synthetic bone substitutes represent alternatives to autologous bone autograft. Macro and microporous ceramics were prepared using calcium amorphous phosphate powders. An animal model to study osteogenicity was designed and validated. The osteogenicity of different ceramics was compared with bone autograft after implantation in the muscles and the femoral condyles of goat. We observed newly formed bone in contact with microporous ceramics sintered at 1050 and 1125°C after 6 and 12 weeks. On the other hand, ceramics having a dense surface sintered at 1200°C did not contain bone tissue. We also noted an important resorption of bone autograft without neoformation both in muscle and femoral sites. The role of inflammation on the osteogenic properties of these ceramics was then studied. The implantation of microparticles in rats muscles induced an inflammatory reaction. The culture of macrophages in the presence of these microparticles increased the secretion of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). Osteogenic markers expressed by osteoblast cells were respectively increased in the presence of IL-6 and inhibited with TNF- α . The overall work demonstrated that the osteogenic properties of calcium phosphate ceramics strongly depend on their microstructure.

KEY WORDS

Biphasic calcium phosphate; macrostructure; microporosity; animal model; osteogenicity; inflammation

Hakim-Borhane FELLAH

Etude des propriétés ostéogéniques de céramiques phosphocalciques

Nombre de pages : 116; nombre de tableaux : 5; nombre de figures : 12

Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2008)

RESUME

L'autogreffe osseuse est considérée comme le modèle de référence dans la reconstruction de défauts osseux, mais présente des inconvénients. Les substituts osseux synthétiques constituent une alternative d'avenir à l'autogreffe osseuse. Des céramiques macro et micro poreuses ont été préparé à partir de poudres amorphes de phosphate de calcium. Un modèle animal permettant d'étudier l'ostéogénicité de céramiques et d'os autologue sans la contribution de l'ostéoconduction a été conçu et validé. L'ostéogénicité de ces céramiques a été comparé à celle de l'autogreffe osseuse après implantation dans les muscles et les condyles fémoraux de chèvre. Nous avons observé une néoformation osseuse au contact de céramiques microporeuses frittées à 1050 et 1125°C après 6 et 12 semaines d'implantation. Par contre, les céramiques présentant une surface dense frittée à 1200°C ne contenait pas de tissu osseux. Nous avons également noté une forte résorption de l'autogreffe osseuse sans néoformation à la fois en site intra musculaire et fémoral. Le rôle de l'inflammation dans les propriétés ostéogéniques de ces céramiques a ensuite été étudié. L'implantation de microparticules dans les muscles de rats a donné lieu à une réaction inflammatoire. La culture de macrophages en présence des microparticules a induit une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF- α). Les marqueurs ostéogéniques exprimés par des cellules ostéoblaste ont été respectivement augmentés en présence d'IL-6 et inhibés avec TNF- α . L'ensemble de ce travail a permis d'étudier les propriétés ostéogéniques de substituts osseux à base de céramiques phosphocalciques en fonction de leur microstructure.

DISCIPLINE : Ingénierie tissulaire osseuse / Biomatériaux

MOTS CLES : Céramiques phosphocalciques biphasées; macrostructure; microporosité; modèle animal; ostéogénicité; inflammation