

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 602

Sciences pour l'Ingénieur

Spécialité : Mécanique des solides, des matériaux, des structures et des surfaces

Par

Ameni ZAOUALI

**Caractérisation multiéchelle par rayonnement synchrotron
des hétérogénéités mécaniques et microstructurales de l'os
au cours de la régénération en lien avec les processus biologiques**

Thèse présentée et soutenue à Saint-Nazaire, le 03/12/2019

Unité de recherche : Institut de recherche en Génie Civil et Mécanique (GeM)

Rapporteurs avant soutenance :

Daniel CHATEIGNER Professeur, Université de Caen Normandie
Hervé PETITE Directeur de recherche, INSERM 1271 CNRS 7052

Composition du Jury :

Président : Stephan ROTH Professeur, Institut Royal de Technologie de Stockholm
Examineurs : Ridha HAMBALI Professeur, Université d'Orléans
Pierre WEISS Professeur, Université de Nantes

Dir. de thèse : David GLOAGUEN Professeur, Université de Nantes
Co-dir. de thèse : Valérie GEOFFROY Directrice de recherche, Université de Nantes
Encadrant : Baptiste GIRAULT Maître de conférences, Université de Nantes

A mes parents, l'amour profond
A mes frères et ma sœur, les plus proches du cœur
A mes amis, l'arôme de ma vie

Remerciements

J'ai pu mener cette thèse à son terme grâce au concours de plusieurs personnes à qui je veux témoigner toute ma gratitude.

Je souhaite tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse Monsieur David GLOAGUEN. Je suis ravie d'avoir travaillé sous sa direction car, outre son appui scientifique, il a toujours su me conseiller et me guider en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Ces compétences professionnelles incontestables ainsi que ces qualités humaines valent l'admiration et le respect de tous.

Je remercie également Monsieur Baptiste GIRAULT qui est à l'origine du projet OMBRE et de cette thèse. J'adresse tous mon respect et ma gratitude à mon cher encadrant pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse et de profiter de cette expérience, ainsi que pour son suivi et ses encouragements tout au long de ce travail. Ces mots précieux m'ont donné confiance pour donner le meilleur de moi-même.

Je ne peux manquer d'exprimer ma reconnaissance chaleureuse et sincère à Madame Valérie GEOFFROY pour sa rigueur et sa disponibilité tout au long de mon travail (particulièrement pendant les dernières vacances d'été) ainsi que pour sa gentillesse, son accueil souriant en toutes circonstances. Son suivi de la partie biologique, ses conseils, ses remarques et son regard toujours avisé sur mon travail m'ont été bénéfiques. Elle est pour moi un exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice du métier de chercheur.

Monsieur Hervé PETITE et Monsieur Daniel CHATEIGNER m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse, ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Leurs remarques m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle. Pour tout cela je les remercie.

Je tiens également à remercier Monsieur Stephan ROTH et Monsieur Ridha HAMBLI pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse ainsi que le temps qu'ils ont consacré à mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Pierre WEISS pour toutes nos discussions et ses conseils qui m'ont accompagné tout au long de ce projet ainsi que pour l'honneur qu'il m'a fait d'être dans mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Eric LE BOURHIS pour les acquisitions des mesures de nanoindentation ainsi que pour son accueil à Poitiers.

Un grand merci à Pierre TOURNIER doctorant à RMeS et à Arnaud PARE, doctorant et chirurgien maxillofacial à Tours qui ont réalisé toute la partie chirurgicale du projet et rédigé les saisines pour le comité d'éthique. Pierre a contribué à la qualité de mon travail par sa présence, son aide et ces conseils durant plusieurs phases de l'analyse biologique réalisée à RMeS.

Je remercie également Joelle VEZIERs pour les acquisitions de la microtomographie et le temps qu'elle a passé à me former sur l'analyse de la partie μ CT.

Un immense merci à Solène TESSIER (assistante-ingénieur à RMeS) qui a réalisé toute l'analyse histologique de cette étude dans une courte période en toute efficacité et professionnalisme.

Je remercie également tous les membres de la plateforme SC3M du laboratoire RMeS qui regroupe les activités d'histologie et d'imagerie, les membres de l'équipe REGOS et de l'unité RMeS pour leur accueil à Nantes. Merci à l'ensemble des personnes qui sont intervenues de près ou de loin dans cet ambitieux projet : chercheurs, ingénieurs et techniciens.

Il m'est impossible d'oublier Marie-José MOYA pour son aide précieuse pour la rédaction et la correction de ce manuscrit. Elle a toujours fait tout son possible pour m'aider et me soutenir.

Mes derniers remerciements vont à la plus agréable des secrétaires, Sabrina SAMSON (secrétaire de l'équipe E3M), pour l'organisation de tous mes déplacements avec des ordres de mission faits en urgence mais toujours avec le sourire. Un grand merci également à Madame Carole Gauthier au secrétariat de RMeS.

Je tiens également à remercier tous les doctorants, toutes les personnes du laboratoire GeM et tous ceux qui m'ont témoigné leur amitié et qui m'ont accompagné pendant cette aventure de 3 ans.

Table des matières

Remerciements	III
Introduction.....	1
I. Étude bibliographique	9
I.1. Introduction.....	11
I.2. Le tissu osseux.....	11
I.2.1. Classification du tissu osseux : anatomie et histologie	11
I.2.2. Structure hiérarchique de l'os.....	12
I.2.2.1. Aspects généraux	13
I.2.2.2. Microstructure osseuse.....	13
a. Les systèmes haversiens : les ostéons	13
b. Les travées	14
I.2.2.3. Nanostructure osseuse.....	15
a. Phase organique	15
b. Phase minérale	16
I.2.3. Anatomie de l'os crânien.....	18
I.2.4. Les cellules osseuses	19
I.2.4.1. Les cellules souches.....	19
I.2.4.2. Les ostéoblastes	20
I.2.4.3. Les ostéocytes	21
I.2.4.4. Les ostéoclastes.....	21
I.2.5. Le remodelage osseux	21
I.2.6. L'ossification de l'os plat	23
I.2.7. La cicatrisation osseuse	25
I.3. La régénération osseuse.....	26
I.3.1. La régénération osseuse par implantation.....	26
I.3.1.1. Les autogreffes	27
I.3.1.2. Les allogreffes.....	27
I.3.1.3. Les xéno-greffes.....	28
I.3.1.4. Les greffes alloplastiques	28
I.3.2. L'ingénierie tissulaire.....	29
I.3.3. La régénération osseuse guidée (ROG)	30
I.4. Propriétés mécaniques de l'os : de la macrostructure au cristal	31

I.4.1.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle macroscopique	31
I.4.1.1.	Les propriétés mécaniques macroscopiques de l'os compact	32
I.4.1.2.	Les propriétés mécaniques macroscopiques de l'os spongieux.....	34
I.4.2.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle microscopique	35
I.4.3.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle nanoscopique	37
I.4.3.1.	Les propriétés mécaniques des monocristaux HA	38
I.4.3.2.	Les propriétés mécaniques du collagène	39
I.5.	Caractéristique mécanique de l'os crânien	40
I.6.	Caractérisations mécanique et microstructurale de l'os régénéré.....	42
I.7.	Conclusions.....	46
II.	Techniques expérimentales et procédés d'analyse de la reconstruction osseuse	49
II.1.	Introduction.....	51
II.2.	Protocole chirurgical	51
II.2.1.	Animaux.....	51
II.2.2.	Processus chirurgical	52
II.2.3.	Propriétés des implants utilisés.....	54
II.2.3.1.	La greffe osseuse (Bone Graft - BG)	54
II.2.3.2.	BCP (phosphate de calcium biphasé)	55
II.2.3.3.	BCP + TBM (phosphate de calcium biphasé + moelle osseuse)	56
II.3.	Analyses mécanique et microstructurale de l'os	56
II.3.1.	Étude de l'os régénéré par rayonnement synchrotron.....	56
II.3.1.1.	Élaboration des éprouvettes de traction.....	56
II.3.1.2.	L'essai de traction in situ en SAXS et WAXS	61
II.3.1.3.	Présentation des synchrotrons.....	62
II.3.1.4.	Diffusion des rayons X appliquée à l'étude des tissus osseux.....	63
a.	Analyse par diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS)	65
b.	Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	70
II.3.2.	Nanoindentation	74
II.3.2.1.	Préparation des échantillons de nanoindentation.....	74
II.3.2.2.	Protocole de la nanoindentation.....	75
II.3.3.	Évaluation micro architecturale et activité biologique de l'os régénéré	77
II.3.3.1.	Micro-tomographie X (Micro-computed Tomography : micro-CT).....	77
II.3.3.2.	Examens histologiques	79
II.4.	Conclusions.....	85
III.	Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation d'une allogreffe osseuse.....	87

III.1.	Introduction.....	89
III.2.	Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique	89
III.2.1.	Description des défauts vides (contrôle négatif)	90
III.2.2.	Description des défauts avec greffons osseux	91
III.3.	Evaluation microarchitecturale	97
III.4.	Épaisseur moyenne des particules minérales	101
III.5.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré	105
III.6.	Réponse mécanique des cristaux	108
III.6.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	108
III.6.2.	Nanoindentation	114
III.7.	Conclusions.....	117
IV.	Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)...	119
IV.1.	Introduction.....	121
IV.2.	Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique	121
IV.2.1.	Description générale de la repousse (comblement du défaut) en fonction du temps	121
IV.2.2.	Description des défauts comblés par le BCP seul.....	123
IV.2.3.	Description des défauts comblés avec BCP + TBM.....	126
IV.3.	Evaluation micro architecturale	130
IV.4.	Épaisseur moyenne des particules minérales	135
IV.5.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré	136
IV.6.	Réponse mécanique des cristaux	139
IV.6.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	139
IV.6.1.	Nanoindentation	143
IV.7.	Conclusions.....	148
V.	Discussion.....	149
V.1.	Introduction.....	151
V.2.	Évaluations biologiques.....	152
V.3.	Évaluation morphologique et distribution spatiale des orientations de la phase minérale HA	157
V.3.1.	Épaisseur moyenne des particules minérales (paramètre T).....	157
V.3.2.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré (paramètre H).....	159
V.4.	Évaluation du comportement mécanique.....	160
V.4.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	160
V.4.2.	Quantification des propriétés mécaniques de l'os par nanoindentation	161
V.5.	Description du processus de régénération au cours du temps suivant le type d'implant : confrontation des résultats des différentes techniques d'analyses	162

Conclusions générales et perspectives.....	167
Références bibliographiques.....	173

Introduction

L'ingénierie régénérative osseuse est un domaine multidisciplinaire qui allie la science des biomatériaux (matériaux biologiques ou synthétiques), la science des cellules souches et la biologie du développement cellulaire en médecine régénérative afin d'opérer une reconstitution osseuse et parvenir à un compromis optimal entre les propriétés mécaniques, biologiques et physiques des tissus régénérés. Aujourd'hui, la médecine régénérative évolue vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée de l'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie moins invasive a motivé le développement de matrices et d'implants injectables visant à accélérer la régénération osseuse et réparer les défauts osseux critiques. Une fois implantées, ces matrices injectables doivent pouvoir se fixer, acquérir la forme souhaitée et permettre la diffusion d'oxygène, de nutriments et de cellules. Historiquement, les techniques d'implantation ont débuté lorsque les chirurgiens ont commencé à remplacer une perte osseuse par des matériaux comme la céramique, les métaux et les os humains ou d'animaux. En effet, grâce aux avancées scientifiques dans le domaine des matrices injectables, différents types d'implants (notamment les biocomposites) ont été développés et adaptés pour la réparation osseuse. Parmi tous les implants cliniques disponibles, la greffe osseuse reste l'une des méthodes chirurgicales les plus couramment utilisées pour combler et réparer les pertes osseuses. L'autogreffe consiste à transférer un morceau d'os du corps du patient à un autre endroit de la même personne. Ayant des propriétés ostéogéniques, ostéoconductrices et ostéoinductives optimales requises pour l'implantation, les autogreffes sont considérées comme la référence en matière de régénération osseuse. Cependant, la morbidité et les dommages au site de prélèvement du donneur sont des limites importantes de son utilisation. Cette recherche de réduction de la morbidité a alors motivé l'utilisation d'allogreffes (greffe d'un tissu emprunté à une personne de la même espèce) car elles sont disponibles en grande quantité et sous plusieurs formes. Bien que l'os soit le matériau le plus favorable à la régénération osseuse, le recours à des biomatériaux synthétiques est nécessaire en raison du coût élevé des greffons humains. Aujourd'hui, les biomatériaux à base de phosphates de calcium (céramique phosphocalcique) synthétiques constituent la deuxième option, après les greffons osseux, pour les chirurgiens orthopédistes en raison de leur biocompatibilité (absence de toxicité et de réaction inflammatoire), leur bioactivité (interactions et échanges possibles avec les cellules de l'os autour de la zone implantée) et leur succès clinique dans l'accélération de la régénération osseuse et dans l'augmentation de la formation osseuse. Afin d'assurer un comblement parfait du défaut osseux, une meilleure intégration des biomatériaux et une récupération fonctionnelle rapide, une thérapie cellulaire est couramment associée à l'implantation de ces biomatériaux. L'utilisation de cellules autologues et de facteurs de croissance en combinaison avec le matériau de support est de plus en plus employée en raison des succès cliniques de cette association dans l'accélération de la régénération osseuse et dans l'augmentation de la formation osseuse. Cependant, le succès clinique de l'implant ne peut se limiter qu'à ces deux améliorations et doit également rendre compte de la qualité et de la vitalité du tissu régénéré. En effet, qu'il s'agisse de la greffe osseuse ou de l'implantation de matériaux dégradables avec l'ajout de facteurs de croissance, ces deux implants favorisent fortement la régénération de l'os perdu. Cependant, les différences de microstructure ainsi que les propriétés mécaniques induites entre les tissus régénérés et les tissus d'origine doivent être examinées avant la validation du succès clinique

des différents implants développés. Malheureusement, l'évolution des caractéristiques microstructurales de l'os nouvellement formé et son comportement mécanique après implantation ne sont pas encore complètement connus. Seules quelques rares études abordent l'évolution de la microstructure au cours du processus de régénération osseuse en lien avec les propriétés mécaniques induites. La majorité des études se concentre uniquement sur la microstructure des cristaux minéraux (taille et orientation) dans la matrice développée et non sur la caractérisation mécanique de l'os nouvellement formé. Ainsi, la motivation de ce travail était d'obtenir une compréhension fine et complète de la relation entre les processus biologiques, la microstructure et le comportement mécanique aux différentes échelles du matériau.

Ce travail vise donc à étudier les propriétés biomécaniques de la cicatrisation osseuse à différents stades de régénération osseuse afin de proposer des outils d'optimisation des matériaux implantaires dans l'ingénierie osseuse, et ainsi, de mieux évaluer leur succès clinique. Le principal défi consiste donc à corréliser le comportement mécanique de l'os dans le temps et dans l'espace avec les processus biologiques et la cinétique de régénération associés. Les expériences proposées ici visent en particulier à mettre en évidence la répartition des contraintes mécaniques induites par le processus de reconstruction, et principalement supportées par la partie minérale de l'architecture osseuse (hydroxyapatite - HA). L'étude de l'architecture de l'os nouvellement formé, y compris les propriétés microstructurales (dimensions, morphologies et distribution spatiale des orientations des cristaux) pendant la régénération, permet de mieux appréhender le rôle de ces paramètres dans la résistance osseuse et les propriétés mécaniques dans et autour du défaut réparé.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet OMBRE (time- and space-resolved Mechanical Behavior of Regenerating bones, 2016-2019) qui fait partie du projet BIOREGATE (Bio-Regenerative and Advanced Therapies Integration) qui s'inscrit dans le cadre des démarches Recherche-Formation-Innovation (RFI) initié par la Région des Pays de la Loire. Ce projet fait partie d'un partenariat entre les laboratoires GeM (Institut de Recherche en Génie Civil et Mécanique dont fait partie le porteur du projet, Baptiste GIRAULT) et RMeS (Regenerative Medicine and Skeleton).

Une approche originale est mise en place afin de caractériser finement la réponse mécanique de l'os à différentes échelles (macroscopique, microscopique et nanoscopique) et à différents stades de régénération. Les techniques quantitatives non destructives, telles que la diffraction et la diffusion des rayons X, sont particulièrement appropriées pour les analyses de matériaux biologiques afin d'extraire des informations microstructurales et mécaniques détaillées à l'échelle nanométrique. Comme la plupart des tissus biologiques, l'os est structuré hiérarchiquement et présente un caractère composite à l'échelle nanométrique. Pour étudier la structure de ce composite organo-minéral, au niveau nanométrique, la diffusion des rayons X sur grands instruments (synchrotron), à petit et grand angle (respectivement SAXS et WAXS) a donc été utilisée dans cette étude, sur des os de calvaria de rats, prélevées à différents stades de régénération. La méthodologie de ce travail s'appuie donc sur l'analyse des champs de déformations sous sollicitations mécaniques *in situ* (traction) couplée à la diffusion des rayons X aux grands (WAXS) et petits angles (SAXS), permettant de mettre en évidence la

répartition des champs de déformations élastiques (ou de contraintes), dans les cristaux minéralisés, ainsi que leurs distributions spatiale et géométrique lors du processus de régénération. En complément, la quantification des propriétés élastiques de l'os à l'échelle des ostéons a été réalisée grâce à des mesures par nanoindentation. La corrélation de l'évolution du comportement mécanique à différentes échelles avec les processus biologiques et la cinétique de régénération a été entreprise au moyen d'analyses complètes de la microstructure à travers des examens histologiques et des caractérisations par microtomographie, explorant les phénomènes biologiques (résorption et/ou formation) ainsi que la nature des tissus présents (inflammatoire, fibreux, minéralisé...) au sein de défauts en reconstruction. Ce travail ambitionne ainsi de mieux appréhender l'influence des techniques d'ingénierie osseuse et la nature d'implant sur le comportement mécanique global à travers l'analyse de trois types d'implants : 1) une greffe osseuse (Bone Graft - BG, os spongieux de la métaphyse fémorale, prélevé sur un rat de la même espèce) ; 2) des grains de phosphate de calcium biphasé (Biphasic Calcium Phosphate - BCP) et 3) un mélange de BCP avec de la moelle osseuse (Total Bone Marrow – TBM).

Dans le domaine de la médecine régénérative osseuse, la fonction mécanique osseuse est un sujet de discussion fréquent puisqu'elle représente la plus importante fonction de l'os en tant qu'élément structurel supportant les sollicitations mécaniques dues au poids du corps. Il est généralement admis que la performance mécanique de l'os peut être largement couplée à sa structure interne hautement hiérarchique. Afin de mieux comprendre ce couplage, une description de sa structure et de son anatomie est nécessaire. Dans un premier chapitre, nous présentons donc des éléments d'anatomies ainsi qu'une revue de la littérature sur l'os afin d'avoir un bilan des connaissances de ses propriétés mécaniques à ses différentes échelles structurelles. Des notions de régénération osseuse ainsi qu'un bilan sur les principaux travaux sur la caractérisation de l'os régénéré seront également présentés.

Dans le deuxième chapitre, nous détaillerons notre méthodologie de travail dans le but de mettre en place le processus chirurgical et le protocole expérimental adapté pour la caractérisation de la régénération osseuse au cours du temps du point de vue biologique, microstructural et mécanique.

L'application de notre méthode de caractérisation et les résultats de l'analyse mécanique et biologique réalisée au cours de la régénération des défauts crâniens comblés par les trois implants étudiés seront présentés dans les chapitres trois et quatre.

Un dernier chapitre sera dédié à confronter les résultats de cette étude en fonction des différentes stratégies et à la lumière des résultats de la littérature afin de comparer l'efficacité des différents matériaux d'implantation utilisés et de donner quelques perspectives destinées à contribuer au développement de nouvelles générations d'implants.

Une conclusion générale et une présentation des perspectives clôtureront ce manuscrit.

Les résultats de mon travail de thèse font l'objet d'articles et de communications orales nationales et internationales :

Introduction

- Zaouali, A., Girault, B., Gloaguen, D., Jordana, F., Moya, M.-J., Dubos, P.-A., Geoffroy, V., Schwartzkopf, M., Snow, T., Gupta, H., Shebanova, O., Schneider, K., & Chang, B. (2018), In Situ Mechanical Behavior of Regenerating Rat Calvaria Bones Under Tensile Load via Synchrotron Diffraction Characterization, Materials Research Proceedings, 117-122.
- Zaouali, A., Girault, B., Gloaguen, D., Geoffroy, V., (en cours de préparation), In situ mechanical behavior of regenerating rat calvaria bones by grafting techniques via synchrotron diffraction characterization, Journal of bone and mineral research.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, F. JORDANA, M. SCHWARTZKOPF, K. SCHNEIDER, B. CHANG, T. SNOW, Time and space resolved mechanical behavior of regenerating rat calvaria bones via synchrotron X-ray micro-diffraction, Colloque EUROMECH Bone remodeling: multiscale mechanical models and multiphysical aspects, 15 - 19 mai 2018, Nancy, France.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, F. JORDANA, M.-J. MOYA, P.-A. DUBOS, V. GEOFFROY, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, *In situ* mechanical behavior of regenerating rat calvaria bones under tensile load via synchrotron diffraction characterization, 10th European Conference on Residual Stresses, 11-14 septembre 2018, Leuven, Belgique.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, F. JORDANA, M.-J. MOYA, P.-A. DUBOS, V. GEOFFROY, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, Towards a better understanding of restoring the mechanical properties of regenerating rat calvaria bones under tensile load via synchrotron diffraction characterization, Bioragat european regenerative medicine forum 11-14 décembre 2018, Nantes, France.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, V. GEOFFROY, P.-A. DUBOS, M.-J. MOYA, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, P. TOURNIER, A. PARE, Evolution of mechanical and microstructural properties in regenerating rat calvaria bones through synchrotron X-ray scattering methods, KI/KTH Workshop: Surfaces & Interfaces of Biomedical Surfaces, 21 février 2019, Stockholm, Suède.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, F. JORDANA, M.-J. MOYA, P.-A. DUBOS, V. GEOFFROY, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, Vers la compréhension de la restauration des propriétés mécaniques des tissus osseux lors du processus de régénération, Matériaux 2018, 19-23 novembre 2018, Strasbourg.
- A. ZAOUALI, B. GIRAULT, D. GLOAGUEN, V. GEOFFROY, P.-A. DUBOS, M.-J. MOYA, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, *In situ* mechanical behavior of bone graft for bone regenerative engineering via

synchrotron X-ray micro-diffraction, CMSM 2019 Eighth International congress on design and modeling of mechanical systems, 18-20 mars 2019, Hammamet, Tunisie.

- A. ZAOUALI, D. GLOAGUEN, V. GEOFFROY, P.-A. DUBOS, M.-J. MOYA, M. SCHWARTZKOPF, T. SNOW, H. GUPTA, O. SHEBANOVA, K. SCHNEIDER, B. CHANG, B. GIRAULT, Étude *in situ* par rayonnement synchrotron de la restauration des propriétés mécaniques des tissus osseux lors du processus de régénération, Colloque SF2M Ouest, caractérisations mécaniques des matériaux, développements et applications, 16 mai 2019, Rennes.

I. Étude bibliographique

I.1.	Introduction.....	11
I.2.	Le tissu osseux.....	11
I.2.1.	Classification du tissu osseux : anatomie et histologie	11
I.2.2.	Structure hiérarchique de l'os.....	12
I.2.3.	Anatomie de l'os crânien.....	18
I.2.4.	Les cellules osseuses	19
I.2.5.	Le remodelage osseux.....	21
I.2.6.	L'ossification de l'os plat	23
I.2.7.	La cicatrisation osseuse	25
I.3.	La régénération osseuse.....	26
I.3.1.	La régénération osseuse par implantation.....	26
I.3.2.	L'ingénierie tissulaire.....	29
I.3.3.	La régénération osseuse guidée (ROG)	30
I.4.	Propriétés mécaniques de l'os : de la macrostructure au cristal	31
I.4.1.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle macroscopique	31
I.4.2.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle microscopique	35
I.4.3.	Comportement mécanique de l'os à l'échelle nanoscopique	37
I.5.	Caractéristique mécanique de l'os crânien	40
I.6.	Caractérisations mécanique et microstructurale de l'os régénéré.....	42
I.7.	Conclusions.....	46

I.1. Introduction

L'os est une matière vivante qui grandit et qui, tout au long de la vie, se renouvelle et au besoin, se répare. La matrice osseuse minéralisée subit donc des phénomènes de destruction et de construction de façon continue durant la vie de l'individu grâce à une capacité de remodelage qui assure le maintien et la réparation de l'os en faisant intervenir des cellules osseuses spécifiques. L'activité de remodelage osseux dépend de la position, de la fonction et de la charge mécanique supportée par la structure osseuse [De Vernejoul et Marie 1993]. L'os possède des propriétés mécaniques particulières qui lui permettent souplesse et résistance grâce à une structure externe composée par un tissu dense (os compact ou cortical) qui renferme généralement une structure spongieuse moins dense (os spongieux ou trabéculaire). Dans le squelette, le tissu osseux assure des fonctions importantes, à la fois mécaniques, métaboliques (principalement métabolisme phosphocalcique) et de protection (organes vitaux, moelle osseuse qui est le site de l'hématopoïèse). D'une part, cette charpente osseuse est assez forte pour supporter le poids corporel, mais assez légère pour assurer des mouvements. D'autre part, les os agissent aussi comme un réservoir de minéraux et de protéines. Ils assurent l'équilibre phosphate/calcium dans le corps [Safadi et al. 2009]. Dans ce premier chapitre, une description de la structure hiérarchique osseuse et un aperçu de la littérature sur son comportement mécanique à tous les niveaux d'échelles sont présentés afin de définir le vocabulaire nécessaire à l'étude et de positionner notre travail par rapport aux études antérieures.

I.2. Le tissu osseux

I.2.1. Classification du tissu osseux : anatomie et histologie

Classification anatomique

- L'os compact (diaphyse osseuse) est un tissu dense, peu souple, qui prend aussi le nom d'os cortical et qui assure la résistance aux fractures.
- L'os spongieux ou trabéculaire est un os poreux et moins dense.

Classification histologique

Suivant le stade de développement osseux, on distingue deux types de tissu osseux :

- L'os primaire (premier formé) est caractérisé par une structure peu organisée (riche en fibres) qui est, dans la plupart des cas, remplacée par remodelage par une structure adaptée à la fonction mécanique ou métabolique dépendant de sa localisation.
- Le tissu osseux lamellaire, présenté par les deux types d'os compact et spongieux, est issu du remodelage de l'os primaire.

Certains chercheurs ont considéré l'ensemble os cortical et os trabéculaire comme un seul matériau qui peut être caractérisé par une forte variabilité de la porosité ou par une densité apparente [Carter et al. 1980]. D'autres considèrent que ces deux types d'os sont deux matériaux différents [Choi et al. 1990]. En effet, l'os trabéculaire est plus actif métaboliquement par rapport à l'os compact et il se renouvelle cinq fois plus rapidement que l'os cortical. Ceci explique la raison pour laquelle l'ostéoporose se déclenche en premier lieu sur des parties du squelette riches en os trabéculaire et/ou soumises à de nombreuses contraintes mécaniques (poignet, vertèbres, col fémoral, etc.).

I. Étude bibliographique

Bien que les deux types d'os se distinguent par leur degré de porosité (de 5 à 10 % pour l'os cortical et de 50 à 90 % pour l'os trabéculaire), la véritable différence vient du processus de formation osseuse au cours des phases de remodelage. L'os compact représente 20 % de l'activité cellulaire osseuse et l'os spongieux 80 %. L'os spongieux est constitué de lamelles osseuses formant un contour irrégulier, contrairement à l'architecture de l'os cortical lamellaire qui est formé par des ensembles répétés de faisceaux de fibrilles unidirectionnelles montrant des orientations régulières [Safadi et al. 2009].

I.2.2. Structure hiérarchique de l'os

L'os est un matériau composite avec une structure hiérarchique complexe [Rho et al. 1998 ; Sadat-Shojai et al. 2013] composé d'une matrice extracellulaire organique contenant des protéines collagéniques (90 %) et non-collagéniques. Celle-ci est minéralisée (calcium et phosphates principalement) et constitue le site de nombreuses activités cellulaires.

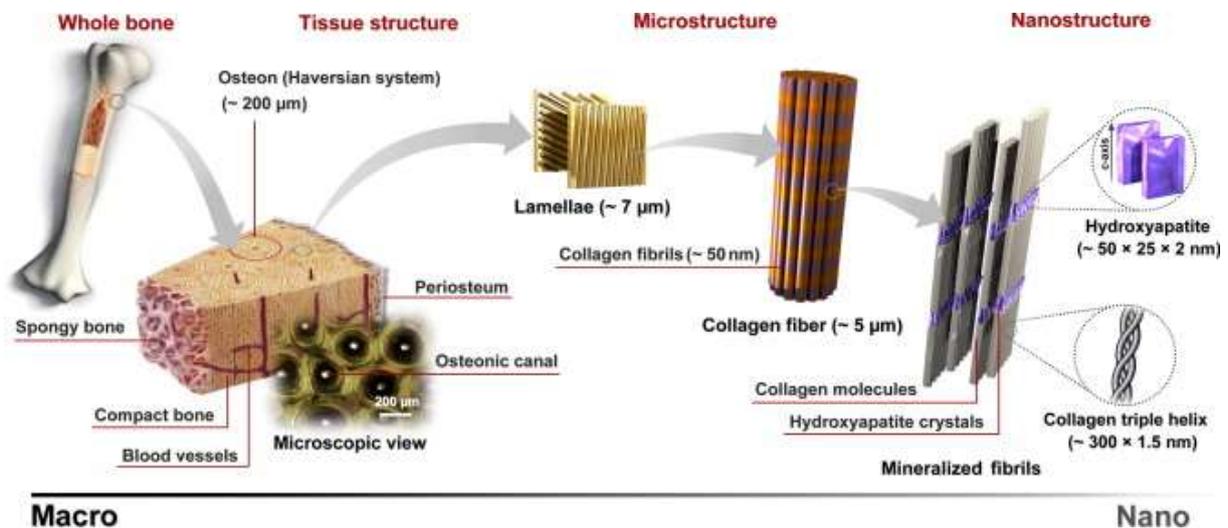


Figure I.1 : Structure hiérarchique de l'os mature [Sadat-Shojai et al. 2013].

L'ultra-structure osseuse (ou nano-architecture) est composée de constituants élémentaires tels que les minéraux, l'eau et le collagène (composé par les molécules de tropocollagène (TC) qui se regroupent pour former les fibrilles de collagène auxquelles s'associent des cristaux d'hydroxyapatite (noté par la suite HA)). À l'échelle microscopique, l'os est constitué de lamelles osseuses, réparties dans des travées au niveau de l'os spongieux et des ostéons dans l'os cortical. À l'échelle macroscopique, l'os se décompose en une phase compacte (l'os cortical) et une phase spongieuse (l'os trabéculaire) qui se répartissent différemment dans l'épiphyse (extrémités distales des os comprenant les deux types d'os), la diaphyse (partie centrale de l'os composé uniquement d'os compact) et la métaphyse (localisée entre les deux structures précédentes et composée majoritairement d'os trabéculaire). Le compartiment externe des os longs et des os plats est composé d'une membrane conjonctive, fibreuse et très cellularisée (riche en cellules) appelée périoste (periosteum ; Figure I.1). Le périoste

participe à la croissance des os et à leur réparation (réservoir de cellules à forte capacité ostéogénique (i.e. capable de former du tissu osseux) ainsi qu'au bon fonctionnement du système vasculaire).

1.2.2.1. Aspects généraux

Le squelette est constitué de 206 pièces osseuses qui se classent selon trois grandes catégories :

- Les os longs, tels que les os des membres (fémur, tibia, radius, etc.), se décomposent en plusieurs éléments. La diaphyse qui présente la partie centrale de l'os est considérée comme un fût d'os compact dont la cavité centrale contient de la moelle rouge chez l'enfant et de la moelle jaune chez l'adulte ; les épiphyses sont les extrémités proximales et distales, composées d'os compacts entourant l'os spongieux. Ils sont recouverts par du cartilage (cartilage articulaire) qui permet l'articulation des os entre eux. Enfin, les métaphyses qui se situent sous la plaque de croissance sont les zones de transition entre les épiphyses et la diaphyse et ils sont le siège de la croissance longitudinale de l'os.
- Les os courts, tels que les os de la main, du pied ou encore les vertèbres se composent d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.
- Les os plats, tels que les omoplates ou scapula, les côtes ou encore les os de la voûte crânienne présentent deux couches d'os compacts contenant de l'os spongieux.

Les os plats sont différents des os courts et des os longs de par leur mode de développement. Les os plats dérivent de la formation intramembranaire (os qui se forme directement au sein d'un tissu fibreux) alors que la formation endochondrale est à l'origine des os courts et longs (os qui se forme au sein d'une ébauche cartilagineuse transitoire).

1.2.2.2. Microstructure osseuse

a. Les systèmes haversiens : les ostéons

Intrinsèquement, l'os compact est composé d'une phase organique extracellulaire stratifiée, contenant des fibres de collagène, et d'une phase minérale. Il est constitué par des anneaux concentriques ou lamelles, disposés en systèmes haversiens (ostéons) (Figure I.2). Les ostéons sont de forme cylindrique d'environ 200 μm de diamètre et orientés le long de l'axe principal de l'os [Ascenzi et al. 1973 ; Rho et al. 1998 ; Rho et al. 1997]. Ils sont constitués d'une série de 5 à 15 lamelles (de 3 à 7 μm d'épaisseur [Safadi et al. 2009]) qui entoure un canal haversien central (30 à 40 μm de diamètre [Reznikov et al. 2014a]) où sont localisés des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs. L'orientation des fibres d'une lamelle à l'autre est alternée. En raison de cette organisation, l'os cortical est également appelé os lamellaire [Ascenzi et al. 1990].

Les canaux de Volkmann sont des canaux vasculaires, transverses aux canaux haversiens, qui relient les canaux haversiens les uns aux autres. Ils permettent également la connexion entre les vaisseaux du système haversien et ceux localisés dans le périoste. On distingue les ostéons primaires et secondaires. Les ostéons primaires entourent les vaisseaux sanguins de telle sorte qu'ils remplissent les cavités. Les ostéons secondaires sont le produit du remodelage osseux (cf. I.1.6). Ces deux types d'ostéons ont la même structure lamellaire concentrique, mais les ostéons primaires n'ont pas de ligne de ciment (la couche externe de l'ostéon secondaire). Les lignes de ciments marquent la frontière entre les ostéons néoformés et les anciens qui ont été dégradés.

I. Étude bibliographique

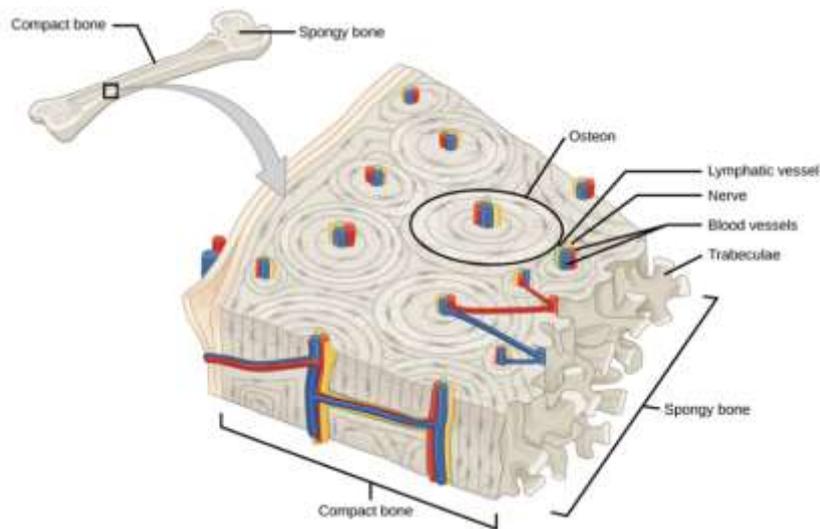


Figure I.2 : Structure lamellaire de l'os cortical : ostéons [Openstax 2016].

b. Les travées

Les travées osseuses, aussi appelées trabécules (os trabéculaire), sont de fines plaques lamellaires (série de lamelles à orientations alternées) [Rho et al. 1998 ; Rho et al. 1993 ; Rho et al. 1997 ; Miller et Fuchs 2005] arrangées en un lacs irrégulier (Figure I.3) formant les principaux éléments de l'os trabéculaire.

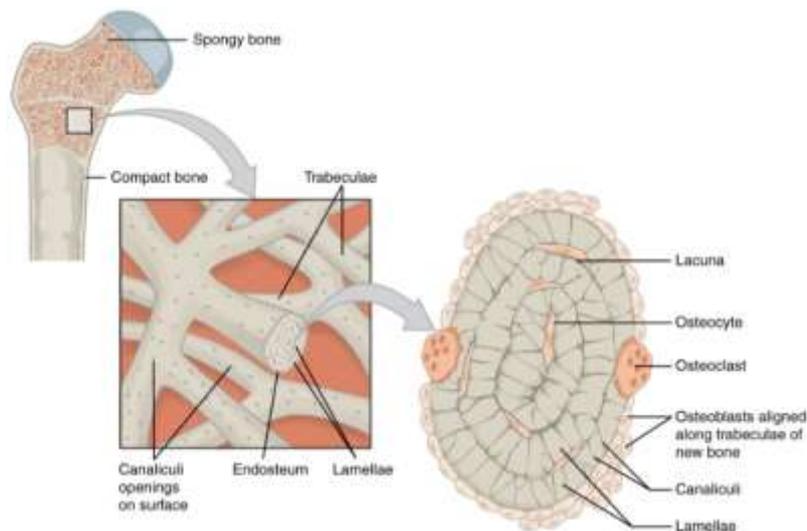


Figure I.3 : Structure lamellaire de l'os trabéculaire : travée [Openstax 2016].

Chaque travée osseuse n'a généralement pas plus de 0,2 à 0,5 mm d'épaisseur pour permettre la diffusion des nutriments aux ostéons [Safadi et al. 2009 ; Reznikov et al. 2014a ; Reznikov et al. 2014b]. L'architecture de ces travées osseuses dépend des lignes de forces s'exerçant

sur l'os. En effet, elles sont formées par les fibres entrecroisées qui sont disposées dans le même sens que les forces de pression et de compression subies par l'os. L'os trabéculaire est une apposition de lamelles de fibres de collagène disposées en couches et empilées les unes sur les autres (Figure I.3) à la manière des matériaux composites stratifiés [Rho et al. 1997]. Ces travées osseuses sont entourées par la moelle osseuse qui remplit l'espace entre les travées [Boskey 2006b].

1.2.2.3. Nanostructure osseuse

À cette échelle de description, les composantes structurelles de l'os spongieux et de l'os cortical sont les mêmes. L'os est un matériau composite organo-minéral composé essentiellement par des biomolécules organiques (molécules de tropocollagène (TC)) et des minéraux (cristaux d'hydroxyapatite (HA)) qui composent la matrice osseuse minéralisée [Rho et al. 1997 ; Landi et al. 2003 ; Reznikov et al. 2014a]. Cette matrice représente 95 % du volume osseux et les 5 % restants, les cellules osseuses telles que les ostéoblastes, les ostéocytes, les ostéoclastes et les cellules bordantes (cf. paragraphe I.1.4). La matrice extracellulaire est constituée d'une phase organique (~ 65 %), d'une phase minérale (~ 25 %) ainsi que de l'eau (~ 10 %). La matrice organique est majoritairement composée par des protéines collagéniques de type I (> 90 %). Les 5 à 10 % complémentaires sont constitués par des protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, la phosphatase alcaline, etc. Finalement, le phosphate de calcium cristallisé (HA) représente 85 % de la phase minérale du tissu osseux et les 15 % restants sont composés de carbonate de calcium, de phosphate de magnésium, de fluorure de calcium, de silice et de sels alcalins [Reznikov et al. 2014b].

a. Phase organique

La trame organique du tissu osseux est donc majoritairement (à 90 %) constituée de collagène de type I qui forme un réseau de fibrilles collagéniques. En effet, le collagène de type I est lui-même constitué par trois chaînes polypeptidiques (une chaîne alpha 2 et deux chaînes alpha 1) contenant chacune un motif de type – (Gly-X-Y)_n – qui groupe la glycine et deux autres acides aminés [Giudicelli et Souberbielle 1998 ; Landi et al. 2003]. Ces chaînes forment une triple hélice (Figure I.4) stabilisée par des molécules de pontage (pour réaliser la liaison hydrogène qui relie les 3 brins). La molécule résultante est le tropocollagène (TC) mesurant environ 300 nm de longueur et de 1,2 à 1,5 nm de diamètre. L'alignement de ces molécules permet d'obtenir une fibrille de collagène.

I. Étude bibliographique

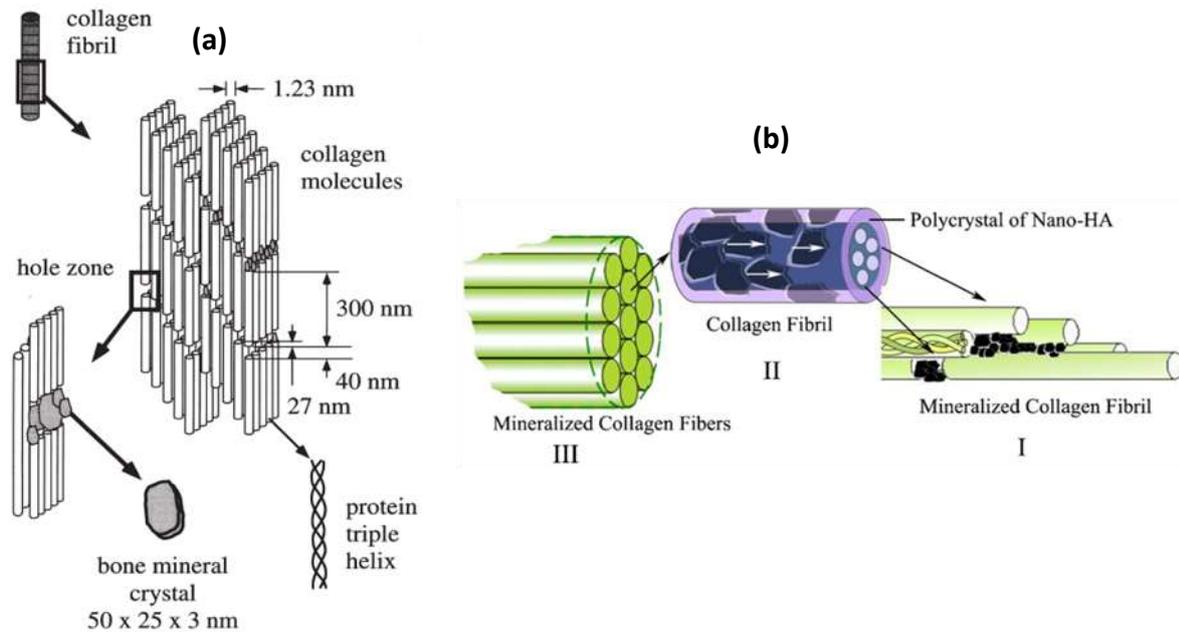


Figure I.4 : (a) Organisation des fibres de collagène dans la structure osseuse [Rho et al. 1997], (b) arrangement des molécules de collagène [Qiu et al. 2015].

Les molécules de tropocollagène de 300 nm de longueur sont alignées et séparées par des lacunes de 40 nm (Figure I.4.a) dans lesquelles se logent les cristaux d'hydroxyapatites. Gibert-Jove [Gibert-Jove 1995] a montré par spectrométrie d'absorption infrarouge que les fibres de collagène présentent des stries perpendiculaires tous les 68 nm qui correspondent au décalage existant entre deux rangées adjacentes.

Les 10 % restants de la matrice organique sont composés par des protéines non collagéniques (PNC), différents protéoglycanes (tels que le biglycane et la décorine) et par d'autres substances non protéiques comme les phospholipides. Les différents types de PNC dans l'os (ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine, phosphatase alcaline, etc.) sont impliqués dans la régulation de la minéralisation et l'activité des cellules osseuses. Cette phase a aussi un rôle dans le métabolisme et la croissance de l'os [Boskey 2015]. La matrice osseuse constitue d'ailleurs un réservoir de facteurs de croissance sous forme de précurseurs non actifs ou associés à des « binding protéines » qui sont libérés au cours du remodelage osseux sous l'action des ostéoclastes.

b. Phase minérale

La phase minérale des tissus osseux fait partie de la famille des apatites. Les apatites sont des solides ioniques cristallisés sous le système hexagonal et représentées par la formule chimique générale $M_{10}(XO_4)_6Y_2$; où M est un cation bivalent (Ca, Sr, Pb, etc.) ; XO_4 un anion trivalent (PO_4 , VO_4 , CrO_4 , etc.) et Y un anion monovalent (F, Cl, OH, etc.). La matrice inorganique (minérale) est composée à 85 % par les apatites phosphocalciques (hydroxyapatite phosphocalcique) cristallisées sous la forme de minces cristaux de HA de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [Rho et al. 1997 ; Boskey et Pleshko Camacho 2007 ; Liu et al. 2016] et de

structure cristallographique hexagonale. Les paramètres de la maille élémentaire sont $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ [Kay et al. 1964] (Figure I.5).

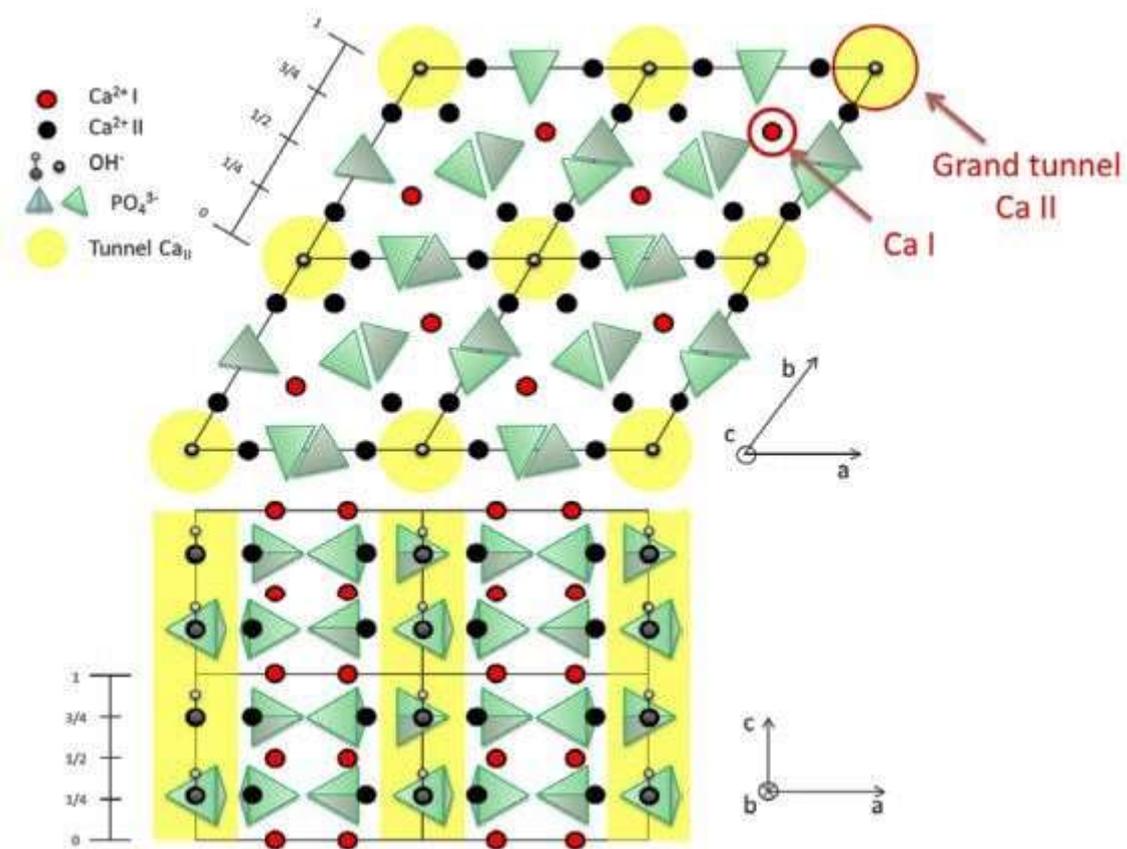


Figure I.5 : Maille élémentaire de l'hydroxyapatite : projection sur les plans (001) et (010) [Boyer 2014].

La maille d'hydroxyapatite (Figure I.6) est composée par 10 atomes de calcium, 2 groupements OH et 6 tétraèdres PO_4 qui constituent l'armature du réseau et qui fournissent une grande stabilité à la structure de l'apatite. Une des particularités structurales de la maille d'hydroxyapatite est de présenter deux types différents de sites calcium Ca(I) et Ca(II) organisés respectivement selon deux tunnels I et II parallèles à l'axe c de la structure hexagonale.

L'hydroxyapatite est la principale composante minérale osseuse qui se présente sous forme de plaquettes de petite taille (20 à 50 nm de longueur, 12 à 20 nm de largeur et de 2 à 5 nm d'épaisseur) [Hafiz Udden et al. 2010], allongées parallèlement à l'axe des fibrilles de collagène [Zamiri et De 2011b ; Pabisch et al. 2013] : la plus grande dimension de la plaquette est orientée le long de l'axe fibrillaire (Figure I.4.a). Le rapport surface/volume est très élevé comparativement à celui des cristaux géologiques. Ceci confère alors au minéral une réactivité chimique élevée et donc une forte capacité d'échange avec les ions environnants. L'anisotropie dans le comportement mécanique des minéraux osseux est due essentiellement

I. Étude bibliographique

à la morphologie marquée des cristaux, leur distribution spatiale et leur orientation au sein des lamelles. Elle se traduit par des propriétés mécaniques aux échelles supérieures qui dépendent de l'organisation des cristaux d'HA dans la matrice collagénique. Cet arrangement des molécules de collagène et des cristaux d'HA maximise la résistance en traction de la matrice collagénique et la résistance en compression des hydroxyapatites [Saber-Samandari et Gross 2009 ; Zamiri et De 2011b]. La rigidité de l'os est donc liée à la présence et à l'orientation des cristaux d'HA logés entre les molécules de TC qui confèrent à l'os son élasticité.

I.2.3. Anatomie de l'os crânien

L'os du crâne est de type plat, composé de trois couches : deux lames compactes (tables ou lames, interne et externe) séparées par le diploé (figure I.6). Les deux tables sont de type cortical et le diploé est une couche d'os spongieux [Boyde et al. 1990].

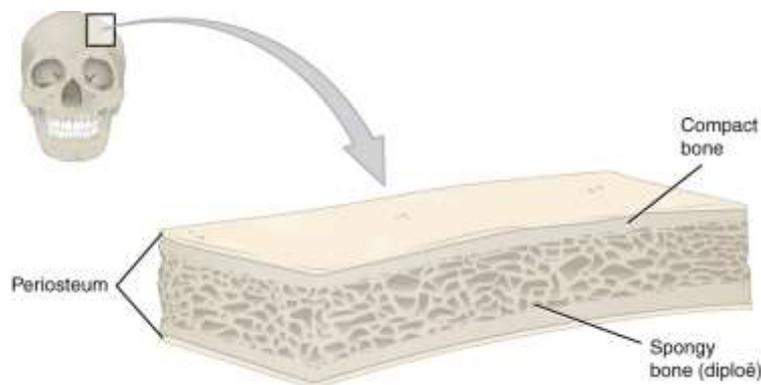


Figure I.6 : Structure de l'os crânien [Openstax 2016].

La voûte crânienne (i.e. la partie supérieure du crâne), connue aussi sous le nom de calvaria, se caractérise par un os uniformément convexe, lisse et d'épaisseur variable selon les zones [Coats et Margulies 2006]. En effet, l'épaisseur de l'os du crâne est le résultat de la variation dans l'épaisseur de la couche spongieuse alors que l'épaisseur des deux tables corticales reste constante [Wood 1971]. La géométrie variable (courbure et épaisseur de la couche spongieuse) de la calvaria explique la dispersion des réponses mécaniques des os crâniens dans la littérature. Il est à noter que l'os du crâne semble beaucoup moins affecté par le vieillissement que les autres types d'os qui perdent leurs propriétés mécaniques au cours du temps. Ceci est surtout vrai pour les os porteurs qui subissent des contraintes mécaniques répétées.

La détermination du grand axe (ou axe principal de l'os, parallèle aux lamelles) de l'os du crâne a été l'objet de plusieurs recherches, étant donné l'importance de cette information dans l'étude de la variation des propriétés élastiques de l'os cortical du squelette craniofacial. Dans tous les types d'os, les canaux de Havers et la plupart des fibrilles de collagène sont orientés selon un grand axe [Rho et al. 1997 ; Almer et Stock 2007]. En outre, il est communément admis que l'orientation des fibres de collagène est étroitement liée à celle des cristaux d'apatite, et que les cristaux maximisent la résistance mécanique de l'os. Wang et Dechow

[Wang et Dechow 2006] ont donc déterminé le grand axe de l'os en mesurant les propriétés élastiques du cortex externe du crâne d'un singe rhésus par une technique ultrasonore. En effet, à partir de l'orientation de la raideur maximale de l'os cortical qui est parallèle au grand axe de l'os, les auteurs en ont déduit la distribution spatiale des cristaux dans l'os plat. De plus, Nakano et ses collègues [Nakano et al. 2002] ont déterminé l'orientation préférentielle des cristallites d'apatite dans des tissus calcifiés (os longs, courts et plats) à l'aide d'un diffractomètre à rayons X à microfaisceau. En se basant sur le rapport d'intensité entre les pics de diffraction des familles de plans cristallographiques perpendiculaires $\{002\}$ et $\{310\}$, les auteurs ont pu estimer le degré d'orientation de l'axe c des cristaux d'HA connaissant la valeur théorique pour un matériau non texturé. La Figure I.7 montre que l'os crânien du lapin étudié est un os bidirectionnel avec une orientation favorisée des particules minérales et des fibres de collagène, parallèlement à la structure (direction B).

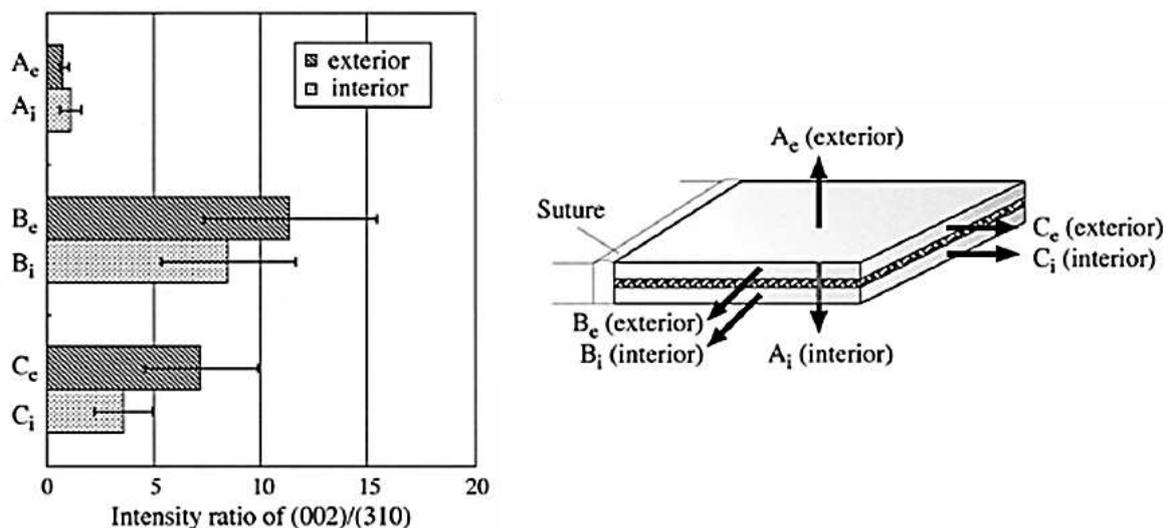


Figure I.7 : Variation du rapport d'intensité entre les familles de plans $\{002\}$ et $\{310\}$ selon la direction de mesure dans les lames extérieure et intérieure du crâne de lapin [Nakano et al. 2002].

1.2.4. Les cellules osseuses

1.2.4.1. Les cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui a le potentiel de se différencier en cellule spécialisée, nécessaire à la croissance et au développement d'un organisme, et de se maintenir dans un organisme vivant par prolifération (multiplication rapide en abondance) ou par division symétrique (par division d'elle-même). Elle peut donc se diviser ou se différencier selon les besoins. Les cellules souches sont divisées en plusieurs catégories en fonction de leur localisation (organes ou tissus) et de leur pluripotence (capacité de différenciation en cellules spécifiques) [Openstax 2016]. À titre d'exemple, dans la moelle osseuse adulte, on distingue trois types différents de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques, responsables de la production des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes ; les cellules souches endothéliales, capables de tapisser les vaisseaux sanguins ; les cellules souches mésenchymateuses (CSM), à l'origine des myocytes, fibroblastes, chondrocytes et

I. Étude bibliographique

ostéoblastes [Jorgensen et Deschaseaux 2011]. Les CSM ont des propriétés ostéogéniques grâce à leur capacité à se différencier en ostéoblastes (cellules ostéocompétentes, responsables de la formation osseuse) qui sont indispensables à la croissance, au modelage et au remodelage ainsi qu'à la réparation et la régénération du tissu osseux. Les propriétés anti-inflammatoires des CSM sont également intéressantes dans le cadre des greffes ou de l'ingénierie tissulaire osseuse pour traiter la réaction du greffon contre l'hôte ou l'inflammation post-chirurgicale. L'os est donc le siège d'une activité cellulaire forte et continue afin de remanier et de renouveler le tissu osseux en permanence dans des conditions physiologiques normales. Les principales cellules qui participent à l'homéostasie osseuse (maintien physiologique de la masse osseuse) sont les ostéocytes (90 % des cellules osseuses) et les ostéoblastes dont ils dérivent, et enfin, les ostéoclastes, responsables de la dégradation osseuse [De Vernejoul et Marie 1993 ; Giudicelli et Souberbielle 1998 ; Ott 2016]. Ces différentes cellules spécialisées vont permettre le modelage au cours de la croissance osseuse, le remodelage et la minéralisation (figures I.8 et I.9).

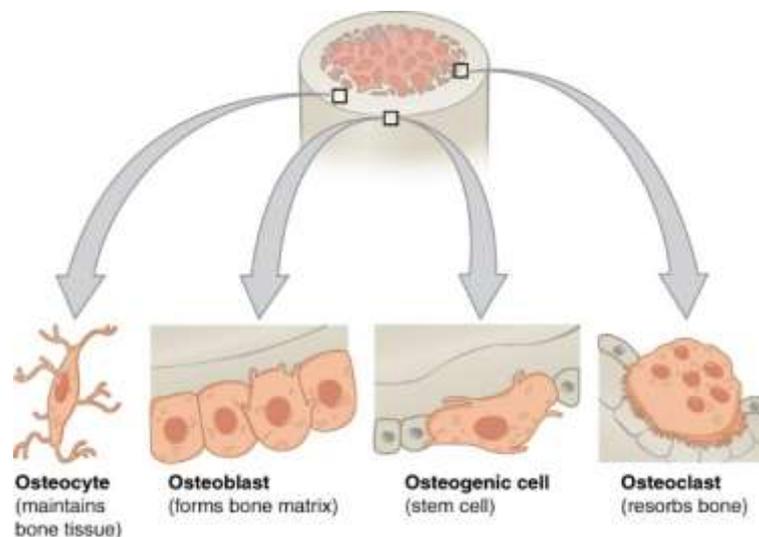


Figure I.8 : Les cellules osseuses [Openstax 2016].

1.2.4.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont situés généralement à l'interface entre la surface osseuse (figure I.8) et la moelle osseuse (i.e. entre les surfaces endostée (qui constitue la face interne de l'os cortical) et trabéculaire). Ce sont les cellules chargées de la synthèse des constituants de la matrice osseuse (collagène de type I, phosphatase alcaline, ostéocalcine, ostéopontine, etc.) et du contrôle de la calcification [Udagawa et al. 1990]. Les ostéoblastes sont issus de la différenciation des cellules souches mésoenchymateuses de la moelle. Les ostéoblastes actifs sont caractérisés macroscopiquement par une forme cuboïde possédant un noyau rond à la base de la cellule (figure I.8) et ils sont organisés en couches à la surface de l'ostéoïde (fibres de collagène non minéralisées qu'ils synthétisent). En fin de période de sécrétion (synthèse de la matrice osseuse), les ostéoblastes meurent dans la majorité des cas par apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée (autodestruction cellulaire selon un programme

génétique). Les ostéoblastes différenciés qui survivent se transforment soit en cellules bordantes (cellules ostéoblastiques inactives ou quiescentes capables d'être réactivées), soit en ostéocytes lorsqu'ils se trouvent emprisonnés dans la matrice osseuse qu'ils viennent de synthétiser.

1.2.4.3. *Les ostéocytes*

Les ostéocytes dérivent des ostéoblastes qui se retrouvent emmurés dans leur propre matrice collagénique qui vient d'être calcifiée. Les ostéocytes sont situés dans des lacunes entre les lamelles osseuses (Figure I.2) et ils sont connectés entre eux par des dendrites localisées dans les canalicules (figure I.8) pour former un réseau complexe. Les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'os et elles ont une durée de vie supérieure à celle des autres cellules osseuses. Leur rôle est central dans le contrôle du remodelage et du maintien de la masse osseuse au cours du temps. Ils ont une fonction de capteur qui leur permet de répondre à différents stress : mécanique, hypoxique, etc. En effet, dès qu'ils détectent un stress, les ostéocytes adressent des informations (cytokines ou autres médiateurs intercellulaires) à travers le réseau ostéocytaire aux cellules localisées à la surface du tissu (ostéoblastes, ostéoclastes et CSM) pour induire le déclenchement des cycles de remodelage de l'os et la réparation du tissu. Les ostéocytes assurent donc le maintien de la qualité et de la quantité de l'os au cours du temps. La diminution du nombre d'ostéocytes ainsi que la réduction du réseau ostéocytaire au cours du vieillissement explique en partie la perte de la capacité « d'auto-réparation » du tissu osseux chez le sujet âgé.

1.2.4.4. *Les ostéoclastes*

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées de grande taille (50 à 100 μm de diamètre). Ces cellules sont le produit de la fusion de cellules précurseuses issues de la lignée hématopoïétique monocyte/macrophage (figure I.8). Elles contiennent généralement plus de 3 noyaux. Les ostéoclastes sont des cellules hautement spécialisées, chargées de la résorption (i.e. la dégradation) du tissu osseux calcifié [Riggs et Parfitt 2005]. En effet, elles disposent d'une grande quantité d'enzymes permettant d'effectuer la résorption osseuse. Sa bordure en brosse, composée par des replis membranaires, est responsable de la destruction de la phase minérale de l'os grâce à la production de protons qui vont acidifier le milieu et solubiliser les minéraux. La phase organique est dégradée par d'autres enzymes appelées protéases qui hydrolysent les protéines en milieu acide ou neutre.

Ces ostéoclastes jouent notamment un rôle essentiel dans la croissance et la réparation (i.e. la reconstruction) de l'os. La différenciation et la fusion des cellules précurseuses sont régulées principalement par les cellules ostéoblastiques ce qui permet un couplage entre la formation et la résorption osseuse, et assure un équilibre entre les quantités d'os détruit et d'os néosynthétisé.

1.2.5. Le remodelage osseux

Les différentes cellules de l'os assurent un renouvellement permanent de la matrice osseuse (~ 10 % du squelette est renouvelé chaque année). Le remodelage osseux est une succession d'événements (résorption puis formation) permettant de remplacer l'os ancien par une nouvelle matrice dans le but de maintenir ses caractéristiques mécaniques [De Vernejoul et Marie 1993]. Ce phénomène concerne les différents types d'os, mais il est plus rapide au niveau de l'os trabéculaire. Le remodelage fait intervenir trois types de cellules osseuses selon un cycle constitué de 5 étapes [De Vernejoul et Marie 1993 ; Giudicelli et Souberbielle 1998 ; Riggs et Parfitt 2005] : activation, résorption, inversion, formation et quiescence (repos).

I. Étude bibliographique

Phase d'activation

Les ostéocytes sont capables de détecter les microdommages présents dans le tissu osseux qui sont induits par la « fatigue » mécanique ou le vieillissement, et d'envoyer, en réponse, des signaux aux progéniteurs ostéoclastiques afin d'initier le processus de remodelage permettant le remplacement de l'os endommagé [Desoutter et al. 2012]. Les signaux initiateurs du remodelage peuvent être liés à des microfractures osseuses, mais aussi à une action hormonale systémique. Ils aboutissent à une activation de la prolifération et de la différenciation de cellules souches en ostéoclastes, cellules de la résorption osseuse. Or les cellules bordantes (les ostéoblastes inactifs) qui recouvrent la surface osseuse empêchent l'accès des ostéoclastes à la matrice osseuse. Sous l'action de différents facteurs locaux provenant en partie des ostéocytes (MMPs, TGF β), mais également de facteurs systémiques (PTH), les cellules bordantes se rétractent pour libérer l'accès aux ostéoclastes. L'activation de la résorption aura lieu lors de l'adhésion de ces derniers à la matrice osseuse minéralisée ainsi découverte.

Phase de résorption

Pendant la phase de résorption, chaque ostéoclaste va s'ancrer à la matrice osseuse pour créer un microenvironnement (lacune de résorption, nommée aussi lacune de Howship (figure I.9)) grâce à la formation d'une structure spécialisée, la bordure plissée. Dans un premier temps, la phase minérale de l'os est dissoute dans la lacune de résorption grâce à l'acidification de la lacune sous l'action conjuguée d'anhydrases et de pompes à protons. La matrice organique sera ensuite dégradée grâce à une production enzymatique importante (protéases acides, cathepsines). Lorsque la phase de résorption est terminée, la lacune de résorption est neutralisée et les résidus de matrice sont éliminés sous l'action de métalloprotéases synthétisées par l'ostéoclaste. Les ostéoclastes actifs peuvent alors migrer vers un autre site à résorber ou mourir par apoptose. À la fin de cette phase, l'os ancien ou abîmé est totalement résorbé.

Phase d'inversion

Lors de la phase d'inversion, les pré-ostéoblastes (futurs ostéoblastes) sont attirés par des facteurs de croissance (par exemple le TGF- β (Transforming Growth Factor beta)) qui ont été libérés par les ostéoclastes pendant la phase de résorption. Les ostéoblastes prennent alors la place des ostéoclastes dans la cavité précédemment creusée.

Phase de formation

La phase de formation présente deux étapes distinctes : production de la matrice à proprement parlé et sa minéralisation. Pendant la phase de formation, les ostéoblastes synthétisent les fibres de collagène sous forme lamellaire non minéralisée formant la matrice ostéoïde. Ensuite, la minéralisation de cette nouvelle matrice est initiée par les ostéoblastes grâce à l'action de la phosphatase alcaline et la génération de vésicules matricielles contenant le calcium et le phosphore qui permettront la synthèse des cristaux d'HA.

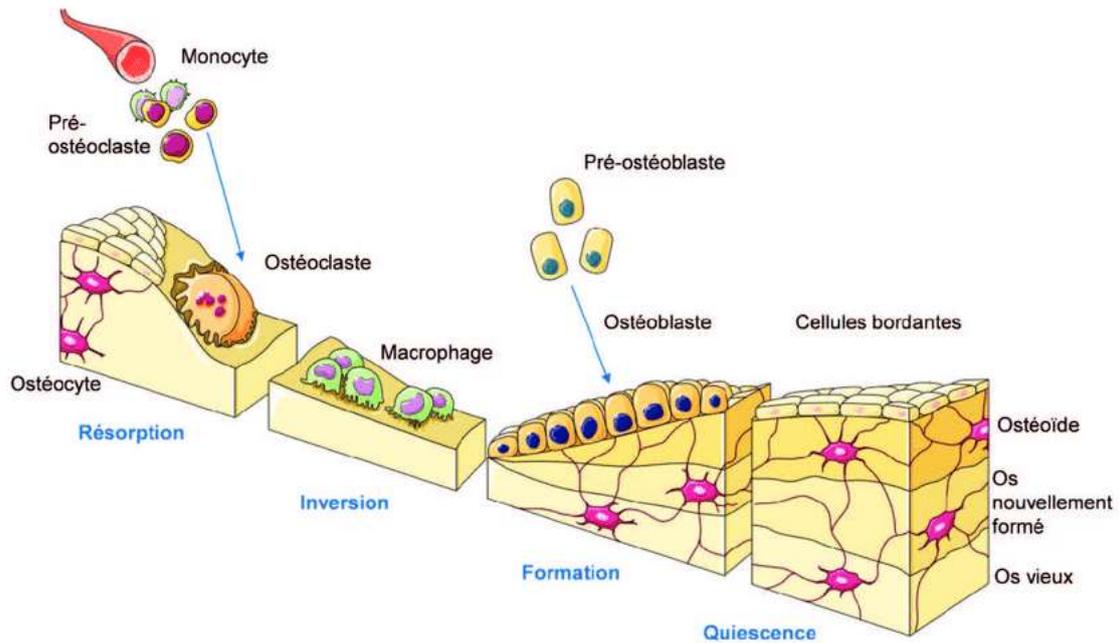


Figure I.9 : Les différentes phases du remodelage osseux
 [https://www.flickr.com/photos/serviermedicalart/9913728576/in/photostream/].

Phase de quiescence

Pendant la phase de formation, les ostéoblastes peuvent être soit emprisonnés dans leur matrice et se transformer en ostéocytes, soit devenir des cellules bordantes qui recouvrent le tissu et interdisent le passage des ostéoclastes. Dans ce cas, on peut dire que l'os est en phase de repos (ou de quiescence) tant qu'il n'est pas soumis à la résorption ou à la formation.

L'hétérogénéité de l'os est une conséquence du remodelage

Le remodelage se traduit par l'apparition progressive de nouveaux ostéons dans la matrice osseuse d'une manière non structurée (aléatoire) dans l'espace et le temps. Ce processus fait de la matrice osseuse un matériau intrinsèquement hétérogène. Cette hétérogénéité est due essentiellement à la variation du degré de minéralisation (i.e. la quantité de minéraux rapportée au volume de la matrice osseuse et exprimée généralement en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) dans la même zone, et est fortement liée à l'âge [Meunier and Boivin 1997]. En effet, l'os néoformé possède une fraction minérale moins importante qu'un os plus ancien. De plus, chez le sujet âgé, la diminution du taux de remodelage conduit à une augmentation globale du degré de minéralisation.

Cette particularité liée au remodelage explique en partie les différences de comportement mécanique de l'os aux différents niveaux de hiérarchie et au cours du temps. En effet, ces propriétés mécaniques sont directement dépendantes de la microstructure du tissu osseux et de sa densité minérale.

I.2.6. L'ossification de l'os plat

La formation et le développement du tissu osseux sont deux processus connus sous le nom d'ossification osseuse. Quels que soient le type et les fonctions de l'os qui compose notre

I. Étude bibliographique

squelette, il est complètement formé à la fin de l'adolescence, moment au-delà duquel il n'y aura plus d'augmentation physiologique de la masse ou de la longueur des os d'un individu. Tous les tissus osseux sont formés, directement (par l'évolution d'un tissu conjonctif) ou indirectement (par l'évolution d'un cartilage), grâce à l'activité des cellules différenciées à partir des CSM. On distingue deux processus d'ossification : intramembranaire et enchondrale. L'ossification enchondrale décrit le processus de l'ostéogenèse (formation) de tous les os longs et des os courts tels que les vertèbres. Dans ce cas, la formation de l'os est obligatoirement précédée par celle d'une ébauche cartilagineuse synthétisée par les chondrocytes qui se différencient également à partir des CSM. L'ossification intramembranaire correspond, quant à elle, à la synthèse directe d'une matrice osseuse par les ostéoblastes (centre d'ossification primaire) sans ébauche cartilagineuse préalable. Tous les os plats (la plupart des os crâniens, les os du visage, les clavicules, etc.) sont formés selon le mode d'ossification intramembranaire.

La figure I.10 représente les étapes de l'ossification d'un os plat. Au cours de l'ossification intramembranaire, les os compact et spongieux dérivent directement de la différenciation des cellules souches indifférenciées (mésenchymateuse) en ostéoblastes différenciés. Le phénomène d'ossification est amorcé par la migration et la condensation des cellules mésenchymateuses sur le site et leur différenciation en cellules spécialisées, les ostéoblastes (figure I.10.a). Les ostéoblastes matures se caractérisent par leur capacité à synthétiser la phase organique et ils commencent à déposer le tissu ostéoïde non calcifié/minéralisé (figure I.10.b). Ils amorcent la formation osseuse par la production du collagène de type I qui fournit le cadre structurel de l'os néoformé. Ce tissu ostéoïde est minéralisé après quelques jours, grâce à la formation de cristaux (hydroxyapatite) dans la matrice sous l'action des ostéoblastes (voir plus haut). À ce moment-là, certains ostéoblastes vont être piégés dans leur propre matrice et se transformer en ostéocytes comme présentés sur la figure I.10.b. L'emprisonnement des premiers ostéocytes traduit la formation de l'os nouveau, alors que les ostéoblastes situés en surface vont former le périoste, le futur compartiment extérieur de l'os compact, qui constitue un réservoir de cellules à activité ostéogénique. L'os spongieux est ensuite formé puis minéralisé (figure I.10.c). À partir du périoste se développent deux couches d'os compact sur les surfaces extérieures et intérieures de l'os néoformé (figure I.10.d). Les ostéoblastes s'organisent donc sur la surface de ces couches compactes et se transforment en cellules bordantes. Les vaisseaux sanguins se condensent alors et permettent aux cellules progénitrices de l'hématopoïèse (processus physiologique qui permet la formation et le renouvellement des cellules sanguines) de coloniser la future cavité médullaire et de participer à la formation de la moelle osseuse.

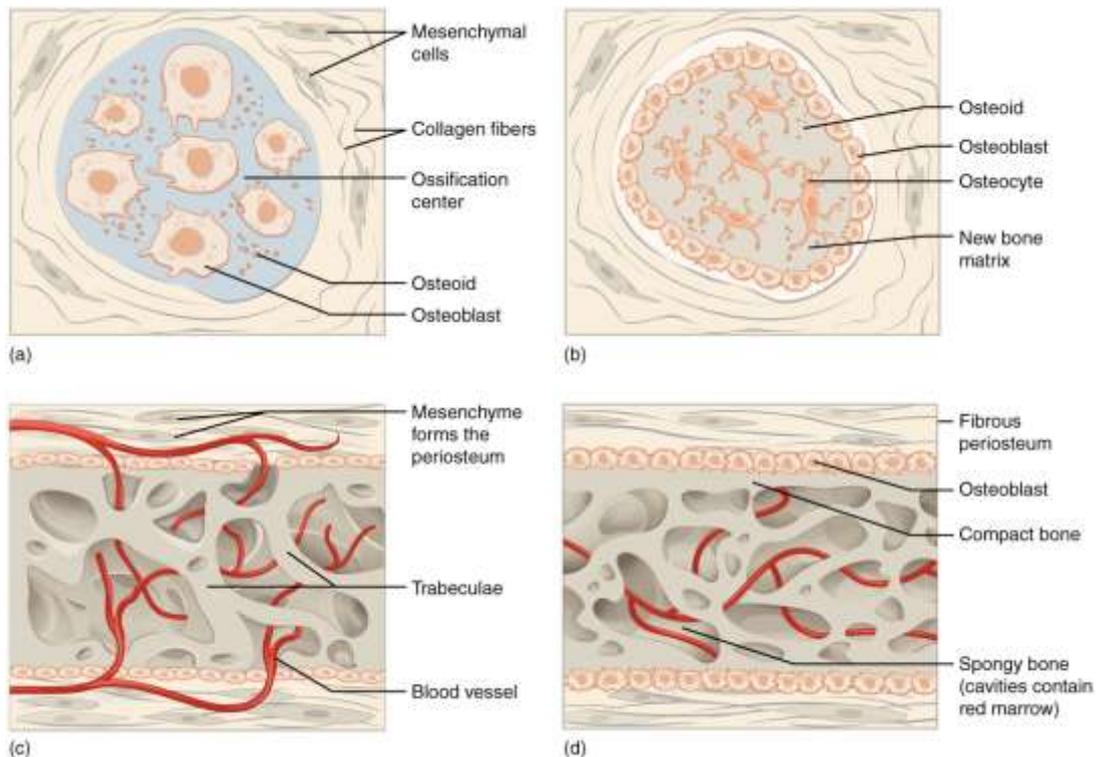


Figure I.10 : Les étapes d'ossification de l'os plat [Openstax 2016].

I.2.7. La cicatrisation osseuse

Dans des situations de perte de substance osseuse mineure (défaut non critique) ou lors de fractures, un phénomène de cicatrisation se déclenche afin de combler le défaut. La cicatrisation osseuse est un phénomène complexe qui fait appel à la réparation et au remodelage. Elle se présente comme la succession de trois phases successives : la phase inflammatoire, la réparation et le remodelage osseux (figure I.11).

Dès les premières heures qui suivent la lésion, le site devient le siège d'une réaction inflammatoire [Bonnel et Tachot 1989 ; Woodward et Riser 1991] qui permet de dégrader les tissus défectueux et de préparer le site pour la restauration de l'os. Pendant la cicatrisation, le site du défaut est irrigué grâce à la néovascularisation mise en place (formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Cette première phase permet donc la formation d'un caillot sanguin (figure I.11.1) appelé hématome afin d'alimenter le site en cellules hématopoïétiques (leucocytes, macrophages, etc.).

L'étape suivante de la cicatrisation consiste à remplacer le caillot sanguin par un tissu mou, fibreux, dont les propriétés mécaniques sont médiocres, appelé tissu de granulation. Ce tissu est ensuite remplacé par une ébauche cartilagineuse (dans le cas des fractures des os de type endochondral) ou directement par du tissu osseux grâce à la présence des cellules ostéocompétentes (figure I.11.2). Ces cellules proviennent principalement du périoste. Cette matrice osseuse primaire néoformée permet de combler la perte de substance et ce tissu osseux cicatriciel subit ensuite plusieurs cycles de remodelage afin de reconstituer la structure lamellaire de l'os mature (figure I.11.3).

I. Étude bibliographique

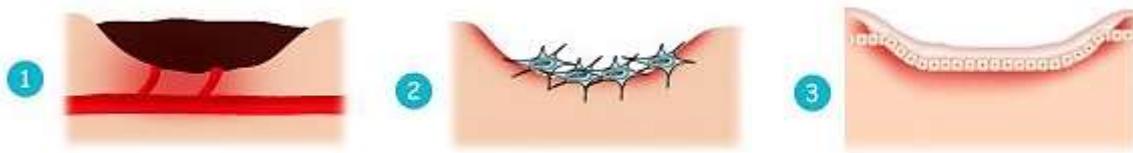


Figure I.11 : Les étapes de la cicatrisation osseuse, 1 : inflammation ; 2 : réparation ; 3 : remodelage [www.sante-sur-le-net.com/maladies/dermatologie/cicatrisation/].

I.3. La régénération osseuse

Dans le cas d'une perte osseuse trop importante (défaut critique), une assistance chirurgicale est alors nécessaire pour pallier la substance osseuse perdue. Les recherches réalisées en chirurgie osseuse au cours de ces dernières années visent à accélérer la régénération osseuse afin de minimiser le temps d'hospitalisation et le retard de cicatrisation. Le principal défi de ces travaux est de proposer de nouvelles méthodes et stratégies afin de réparer les défauts osseux critiques. Les différentes techniques et procédés qui favorisent la régénération osseuse reposent sur deux caractéristiques fondamentales qui rendent la néoformation possible [Albrektsson et Johansson 2001 ; Miron et Zhang 2012 ; Tollemar et al. 2016] :

- L'ostéo-induction : c'est la capacité d'induire la différenciation cellulaire pour synthétiser la matrice osseuse qui peut être minéralisée grâce à la présence de facteurs ostéoinducteurs (Bone Morphogenetic Protein, BMP) favorisant le recrutement, la différenciation et la prolifération des cellules mésenchymateuses (CSM) en cellules ostéocompétentes (ostéoblastes). L'ostéo-induction est donc le processus par lequel la néoformation osseuse est induite [Miron et Zhang 2012].
- L'ostéo-conduction : c'est la propriété d'une surface/d'un tissu préexistant à favoriser la croissance osseuse. Un matériau ostéoconducteur est donc un support dont la surface permet la formation/repousse osseuse et qui facilite l'invasion cellulaire du matériau, favorisant ainsi l'apposition d'un néo-os.

Le traitement des pertes de substances osseuses est basé essentiellement sur l'implantation d'une greffe osseuse (comblement par un greffon osseux autologue ou une allogreffe (cf. I.2.1)) ou sur le principe de l'ingénierie tissulaire osseuse (association d'une matrice tridimensionnelle (scaffold) avec des cellules autologues et des facteurs de croissance). Ces deux stratégies peuvent être associées à la pose d'une membrane permettant de guider les cellules ostéoprogénitrices présentes dans l'environnement vers le défaut osseux dans le cadre d'une régénération osseuse guidée (ROG).

I.3.1. La régénération osseuse par implantation

Historiquement, les techniques de greffes ont débuté lorsque les chirurgiens ont commencé à remplacer la substance osseuse retirée au cours de la chirurgie par des « corps étrangers » de différents matériaux biocompatibles comme les céramiques, les métaux et les os humains ou d'animaux. Grâce aux avancées scientifiques dans le domaine des matrices injectables, différents types d'implants (notamment les biocomposites) ont été développés et adaptés en ingénierie tissulaire osseuse pour accélérer la régénération et réparer des défauts critiques

[Trojani et al. 2006 ; Espitalier et al. 2009 ; Corre et al. 2013 ; Bléry et al. 2014 ; Corre et al. 2015 ; They et al. 2015]. La technique des implants ou des greffes consiste à transférer un tissu prélevé sur une personne. Le tissu peut provenir de la personne elle-même (on parle alors d'autogreffe), d'un individu de la même espèce (allo- ou homo-greffe), d'un individu d'une autre espèce (xéno- ou hétéro-greffe) ou encore correspondre à un matériau synthétique (greffe alloplastique). Quel que soit le type de greffe, le greffon doit avoir les propriétés ostéo-inductrice, ostéo-conductrice ou ostéogénique nécessaires à la néoformation osseuse [Wang et Yeung 2017]. La nature d'un implant et sa provenance ont un rôle fondamental dans une régénération osseuse réussie, du fait de sa capacité de livraison de biomolécules qui facilite la réparation des tissus osseux et le soutien de la croissance cellulaire. Le choix se fera notamment selon le volume et la position du site à combler.

1.3.1.1. Les autogreffes

C'est l'os qui est le matériau le plus favorable à la régénération osseuse. En effet, une autogreffe (greffe des propres tissus d'un individu à lui-même) possède les trois propriétés fondamentales (ostéo-induction, ostéo-conduction et ostéogénèse) permettant d'assurer un comblement réussi des défauts osseux et une néoformation rapide. Étant riche en protéines (collagène), en cellules spécialisées dans la formation osseuse et en facteurs de croissance (BMP, etc.), le greffon autogène (autogreffe) est considéré comme la référence (« gold standard ») de la régénération osseuse. En effet, il assure une revascularisation rapide et dense et il ne provoque aucune réaction immunitaire, ce qui est la clé du succès de la greffe. Cependant, la morbidité et les dommages induits au site donneur (deuxième intervention chirurgicale sur le patient) sont les limites importantes de l'utilisation des autogreffes. En effet, les greffons sont issus essentiellement d'os longs (péroné) ou d'os du bassin (crêtes iliaques). La disponibilité de cet os autogène peut donc constituer un inconvénient majeur lors de reconstructions importantes. Ceci limite donc son utilisation à des petites reconstructions appliquées essentiellement dans le cadre de la médecine dentaire et maxillo-faciale [Colat-Parros et Jordana 2009 ; Espitalier et al. 2009].

Les recherches visant la réduction de la morbidité ont motivé l'utilisation d'allogreffes (un tissu prélevé à une personne de la même espèce) car elles sont disponibles en grandes quantités et sous plusieurs formes différentes.

1.3.1.2. Les allogreffes

Aujourd'hui, les allogreffes osseuses constituent la deuxième option pour les chirurgiens orthopédiques en raison de leur succès clinique dans l'accélération de la régénération osseuse et dans l'augmentation de la formation osseuse. Dans le cadre d'allogreffes, les greffons sont issus essentiellement d'os longs prélevés sur cadavres humains dans les 24 heures suivant le décès (généralement des têtes fémorales congelées à -197°C dans de l'azote liquide). Il est aussi possible de prélever des greffons frais sur des donneurs vivants. Afin de réduire les contaminations, ce type de greffon subit des traitements spécifiques et sévères (radiations ionisantes, oxyde d'éthylène, chaleur) avant l'implantation. Néanmoins, les protéines et les facteurs de croissance qui assurent l'ostéoconduction doivent être conservés après traitements. En plus de la disponibilité de ce type de greffons (banques de tissus), l'avantage majeur des allogreffes tient en leur résorption totale après comblement du défaut. Cependant, l'ostéoconduction est hétérogène au sein du greffon et les propriétés mécaniques du greffon au niveau du site implanté sont variables car elles dépendent de son origine ainsi que du traitement réalisé. D'autre part, les greffons humains sont coûteux, d'où le recours à

I. Étude bibliographique

des greffons prélevés sur des animaux (xénogreffes) et la volonté de développement de biomatériaux synthétiques.

1.3.1.3. *Les xénogreffes*

Les greffons sont issus d'un individu d'une espèce différente de celle du receveur. Ils sont souvent d'origine bovine, mais les provenances sont diverses : corail, seiche, mammifères (cheval, porc, mouton). L'hydroxyapatite d'origine bovine de la marque « Le Bio-oss » est actuellement la plus utilisée. La structure poreuse des greffons facilite la migration des cellules compétentes et le développement des vaisseaux sanguins. Dans le cadre de la xénogreffe, le greffon est considéré comme un support favorisant l'apposition d'un néo-os sur ses surfaces qui permettent la repousse osseuse et qui facilitent l'invasion du greffon grâce à leurs propriétés ostéoconductrices. L'inconvénient majeur de ces greffons est l'hétérogénéité de leur résorption sur le site implanté. En effet, certains matériaux sont résorbables (tels que les substituts à base de corail) et sont remplacés progressivement par l'os néoformé au cours de la régénération (substitution complète de la xénogreffe à la fin du processus) et d'autres sont partiellement ou non résorbables (les substituts osseux déprotéinisés d'origine bovine, non résorbables, sont les plus utilisés). D'autre part, les traitements par immunosuppresseurs, utilisés pour atténuer le caractère immunogène des xénogreffes, peuvent interférer avec le processus de régénération.

1.3.1.4. *Les greffes alloplastiques*

Les greffes alloplastiques sont basées sur l'utilisation de biomatériaux synthétiques fabriqués en laboratoire. Elles sont de différentes variétés et possèdent des propriétés mécaniques et biologiques très diverses. En effet, elles peuvent être des céramiques phosphocalciques, des polymères (e.g. ciment acrylique), des bioverres contenant des silicates ou encore d'autres matériaux composites à deux ou plusieurs composants. Parmi eux, les phosphates de calcium (céramique phosphocalcique) synthétiques sont devenus la classe de matériaux la plus couramment utilisée pour l'ingénierie des tissus osseux pour des raisons de biocompatibilité (absence de toxicité et de réaction inflammatoire) et de bioactivité (interactions et échanges possibles avec les cellules de l'os autour de la zone implantée) [Daculsi et al. 2008].

- L'hydroxyapatite (HA) synthétique : de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, elle est obtenue par la réaction de CaCO_3 à l'état solide avec le $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ à 1200°C . L'HA se cristallise dans un système hexagonal de rapport atomique Ca/P égal à 1,67 et dont les paramètres de maille sont $a = b = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$. L'HA n'est pas résorbable, mais elle est considérée comme un biomatériau de comblement qui sert de support passif à la réparation osseuse grâce à sa surface ostéoconductrice. L'HA est utilisée généralement sous forme de matrice poreuse afin de permettre l'envahissement cellulaire et la néoformation osseuse.

- Le phosphate tricalcique (TCP) : le TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est la forme poreuse du phosphate de calcium qui existe en deux phases, α et β . Le β -TCP est produit par le chauffage (entre 800 et 1000°C) du phosphate de calcium amorphe. Le α -TCP est préparé à partir du β -TCP chauffé à une température supérieure à 1250°C . La forme la plus utilisée en ingénierie osseuse est le β -TCP puisqu'il présente des caractéristiques identiques aux propriétés de l'hydroxyapatite pure. En effet, le β -TCP se cristallise dans un système hexagonal contrairement à la phase α -TCP qui se cristallise dans un système monoclinique et présente une solubilité importante.

- Le phosphate de calcium biphasé (BCP) : le BCP est un mélange d'HA et de β -TCP. Les propriétés chimiques du mélange (BCP) se traduisent par une forte vitesse de résorption et

une ostéoconductivité importante et sont fortement liées aux proportions de ces deux composants. En effet, Nery *et al.* [Nery et al. 2012] ont montré que les mélanges ayant un rapport HA/ β -TCP entre 1,5 et 4 ont une meilleure ostéoconductivité (étude faite dans le cadre de régénération des défauts parodontaux, c'est-à-dire au niveau des tissus de soutien des dents tels que l'os alvéolaire (os de la mandibule) et de la gencive).

D'une manière générale, les matériaux synthétiques élargissent le choix des méthodes de comblement. Selon leur composition moléculaire, ils peuvent être résorbables ou non avec des temps de résorption très variables, bioactifs et biodégradables. Pour qu'il y ait une bonne réparation osseuse, le choix et l'application de ces greffons peuvent être limités par la forme, la taille et la position du défaut. En effet, certains matériaux fragiles par exemple ne peuvent pas être implantés dans des zones à fortes contraintes. Le développement de nouveaux implants osseux à base de biomatériaux, qui assurent un comblement parfait, une récupération fonctionnelle rapide et une bonne résistance mécanique, est, quant à lui, encore un sujet d'étude prégnant.

I.3.2. L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est basée sur une thérapie cellulaire qui a pour but de repousser les limites des techniques chirurgicales conventionnelles. L'approche biologique de l'ingénierie tissulaire osseuse consiste à utiliser des cellules autologues et des facteurs de croissance en combinaison avec le matériau de support pour la régénération osseuse afin d'aboutir à des biomatériaux ostéoconducteurs [Collignon et al. 2017]. Les CSM (cellules souches mésenchymateuses) sont généralement utilisées comme cellules réparatrices grâce à leur capacité d'amplification et de différenciation dans la voie ostéoblastique [Jorgensen et Deschaseaux 2011]. La régénération osseuse basée sur l'ingénierie tissulaire peut être réalisée par l'injection de moelle osseuse allogénique (riche en cellules) ou par l'injection de CSM cultivées *ex vivo* [Frayssinet et al. 1998 ; Tollemar et al. 2016]. La présence des cellules répond au problème de vascularisation des greffons utilisés pour le comblement des défauts critiques (de grande taille) et stimule le phénomène d'ossification osseuse naturel (figure I.12).

I. Étude bibliographique

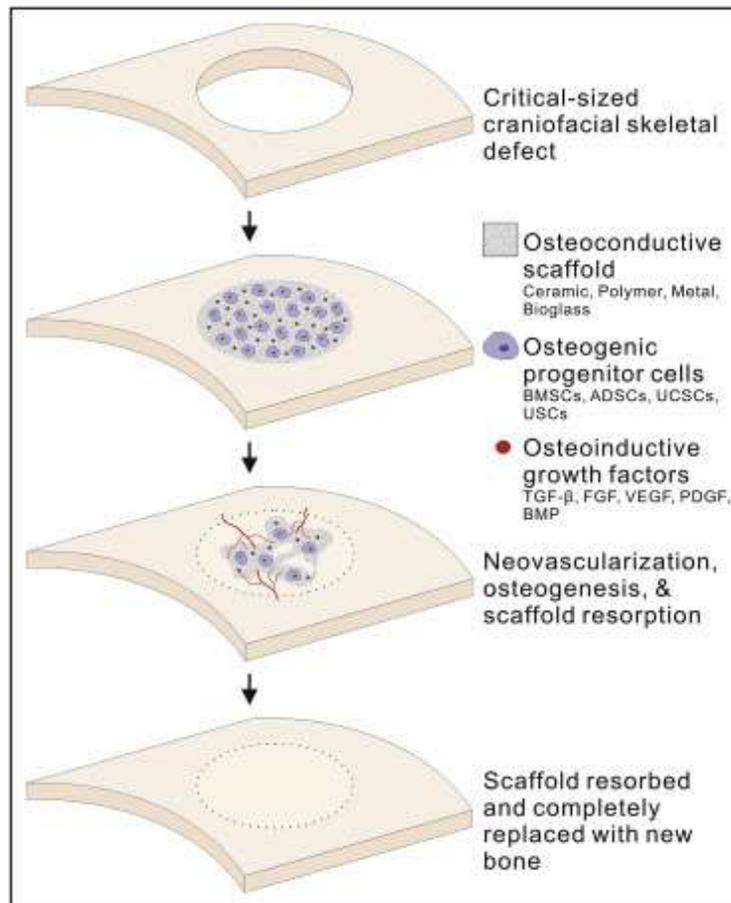


Figure I.12 : Les étapes de la réparation d'un défaut osseux par ingénierie tissulaire osseuse [Tollemar et al. 2016].

Des recherches montrent qu'au cours de la cicatrisation (figure I.12), les facteurs de croissance présents à la périphérie du défaut stimulent rapidement le recrutement des MSC autour des lésions [Al-Aql et al. 2008]. De la même manière que dans l'ossification osseuse, les MSC se différencient en ostéoblastes pour assurer la formation d'os nouveau. Les surfaces ostéoconductrices des biomatériaux adoptés dans l'ingénierie tissulaire facilitent la migration des cellules compétentes et permettent la croissance de la repousse du néo-os [Corre et al. 2015]. De nouveaux vaisseaux sanguins vont être créés et un tissu inflammatoire va être déposé [Miron et Zhang 2012]. Selon un bilan réalisé par [Dimitriou et al. 2011], l'association d'un biomatériau à des facteurs de croissance ou à des MSC semble constituer la combinaison qui donne les meilleurs résultats.

I.3.3. La régénération osseuse guidée (ROG)

La régénération osseuse guidée se base sur la capacité migratoire des cellules osseuses pendant la cicatrisation et profite du potentiel de l'os à restaurer sa structure originale. Cette technique peut se faire avec ou sans aucun matériau de substitution osseuse (tout dépend de la forme et la taille du déficit osseux [Buser et al. 1996]).

Le principe de la ROG est fondé sur l'interposition d'une membrane (barrière physique) entre le défaut osseux et le tissu conjonctif [Antoun et al. 2013]. La ROG est utilisée surtout dans les reconstructions osseuses maxillofaciales dans le but d'isoler la zone cicatrisée et de permettre la sélection et le guidage des cellules osseuses pendant la période de régénération sans que les cellules conjonctives (cellules de la gencive par exemple), inhibitrices de la néoformation, ne s'interposent ou remplissent le défaut, empêchant ainsi l'accès du site aux cellules osseuses [Jordana et Colat-Rarros 2010].

On distingue deux catégories de membranes et le choix de celle-ci se fait en fonction du cas clinique traité (site et taille de lésion) et de la technique la mieux adaptée pour la régénération :

- Membranes résorbables : les membranes collagéniques (de bovin ou de porcine), ou les membranes synthétiques. Étant résorbables, elles ne demandent pas de chirurgie supplémentaire afin de les retirer du site de régénération.
- Membranes non résorbables : les membranes en téflon, renforcées ou non en titane, ou encore des membranes en titane pur. Ce sont les premières membranes qui ont été utilisées en ROG. Elles doivent être posées pendant 4 à 6 semaines dans le site à cicatriser, sans infection ou exposition.

I.4. Propriétés mécaniques de l'os : de la macrostructure au cristal

La transformation morphologique de l'os lors du remodelage est caractérisée par un changement de masse au cours de la phase de formation et par une évolution de ses propriétés mécaniques. L'os est donc un matériau vivant en évolution architecturale permanente afin de s'adapter à l'état de contraintes mécaniques qu'il subit. D'un point de vue mécanique, l'os est un milieu fortement hétérogène du fait de son architecture complexe, pouvant être représenté par trois niveaux structurels principaux : macroscopique (os trabéculaire et cortical), microscopique (ostéons et travées) et nanoscopique (molécules de tropocollagène et cristaux d'HA formant les fibres de collagènes).

I.4.1. Comportement mécanique de l'os à l'échelle macroscopique

Le niveau macroscopique est représenté par les deux types d'os, cortical et spongieux. Étant donnée la différence d'architecture entre ces derniers, leurs propriétés mécaniques sont sensiblement différentes. Rho *et al.* [Rho et al. 2002] ont mis en évidence l'hétérogénéité et l'anisotropie mécanique de la structure osseuse en réalisant des essais de nano-indentation sur des éprouvettes prélevées dans différentes zones du fémur humain. Les résultats montrent une différence claire et constante entre la rigidité de l'os dans la partie compacte et dans les zones trabéculaires. Bien que l'os spongieux et l'os compact soient composés des mêmes constituants (fibres de collagène et cristaux d'HA), une différence significative (de l'ordre de 20 %) de leurs propriétés mécaniques a été montrée dans différentes études [Reilly et al. 1974 ; Ashman et Rho 1988 ; Rho et al. 1997 ; Rho et al. 2002 ; Bayraktar et al. 2004]. L'os trabéculaire est moins rigide et moins résistant par rapport à l'os cortical. Les résultats issus d'essais de traction sur des fémurs humains, réalisés par Bayraktar *et al.* en 2004, sont résumés dans le Tableau I.1.

I. Étude bibliographique

Espèce	Nature d'os	Module élastique (GPa)	Limite d'élasticité conventionnelle (0,2 %) (MPa)
Humain (fémur)	Trabéculaire	19,3	77,4
	Cortical	20,9	114,3

Tableau I.1: Propriétés élastiques de l'os spongieux (trabéculaire) et de l'os cortical [Bayraktar et al. 2004].

Ces différences peuvent être expliquées par la teneur en minéraux reflétant l'activité du remodelage, qui est plus intense dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical, et par leurs porosités respectives.

1.4.1.1. Les propriétés mécaniques macroscopiques de l'os compact

La structure de l'os compact, composé d'ostéons, eux-mêmes constitués de fibres de collagène orientées, confère à ce matériau un comportement mécanique fortement anisotrope. Ceci explique la variation du module élastique et du module de cisaillement mesurée par Dong et Guo [Dong et Guo 2004] entre les directions transversales (E_T ; G_T) et longitudinale (E_L ; G_L) lors d'essais de traction sur un os cortical d'un fémur humain (Tableau I.2). L'analyse de cette anisotropie a été complétée par Seto *et al.*, en 2008 [Seto et al. 2008], qui ont étudié la réponse mécanique en traction d'un os cortical bovin par des techniques de mesure par diffraction des rayons X. Dans cette étude, des éprouvettes avec différentes orientations de fibres ont été testées dans des conditions sèches et humides (figure I.13). Les résultats présentés sur la figure I.13 montrent que le module élastique peut varier de 10 GPa (dans la direction des fibres) à 1 GPa (dans la direction transverse). Le module élastique de l'éprouvette humide est 5 fois moindre que le module de l'éprouvette sèche.

Propriétés	E_L (GPa)	E_T (GPa)	G_L (GPa)	G_T (GPa)	ν
Valeur	17 ± 2	10 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	$0,37 \pm 0,03$

Tableau I.2 : Propriétés élastiques de l'os cortical. E = module élastique ; G = module de cisaillement ; L = longitudinal ; T = transversal ; ν : coefficient de Poisson [Dong and Guo 2004].

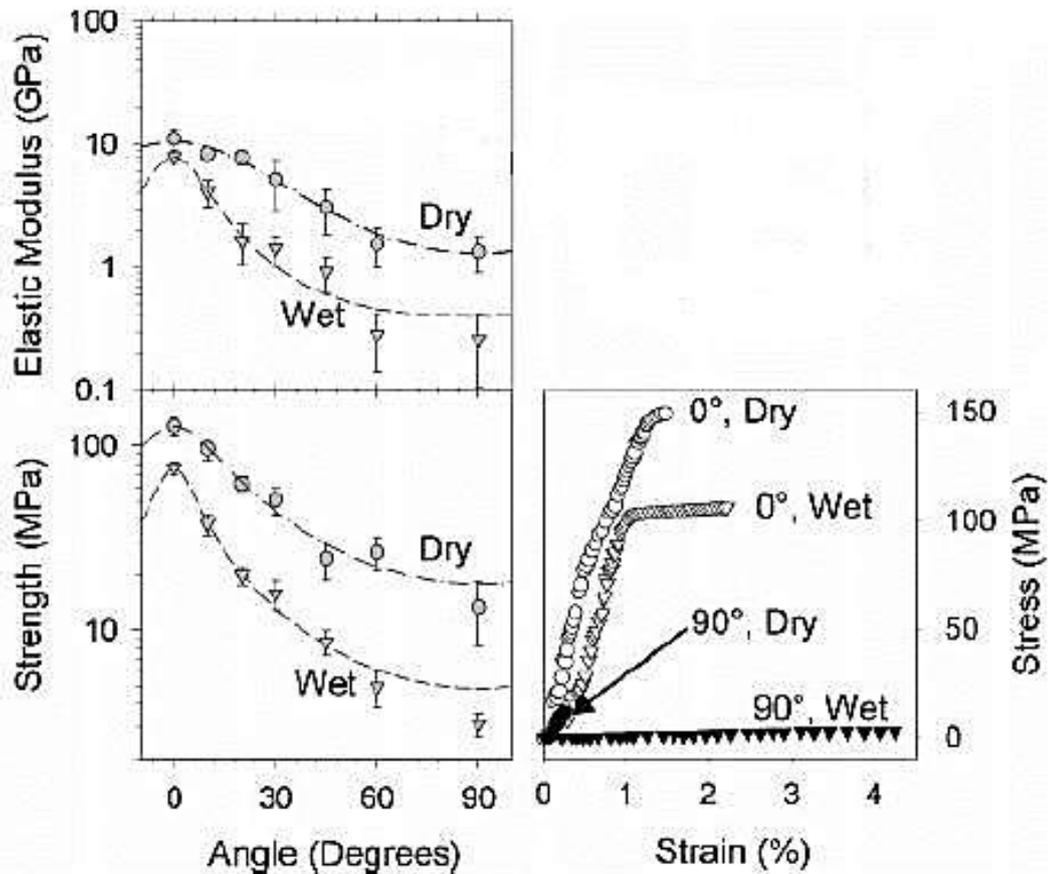


Figure I.13 : Évolution du module élastique et de la limite d'élasticité de l'os cortical en fonction de l'orientation des fibres dans des conditions sèches (dry) et humides (wet) [Seto et al. 2008]. L'angle en abscisse correspond à l'orientation des fibres par rapport à la direction longitudinale des éprouvettes (0°, 30°, 60°, 90°).

Dans la même étude, Dong et Guo [Dong et Guo 2004] ont montré que ce degré d'anisotropie dans le comportement de l'os cortical est inversement proportionnel à la porosité alors que la limite élastique ne semble pas dépendre, quant à elle, de la porosité. Ce constat a été confirmé par la suite (figure I.14), dans des conditions d'analyse similaires par Bayraktar *et al.*, [Bayraktar et al. 2004] qui ont montré que la variation maximale du module élastique avec la porosité (qui varie de 5 à 40 %) est de 15,7 % (les valeurs de module élastique allaient de 12,1 à 22,2 GPa).

I. Étude bibliographique

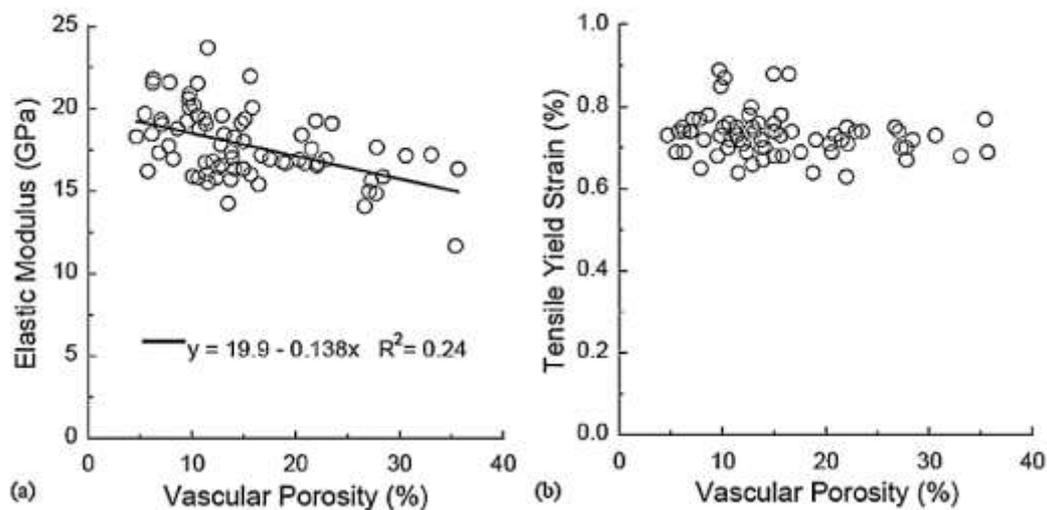


Figure I.14 : (a) Module élastique de l'os cortical en fonction de la porosité ; (b) limite élastique (à 0,2 %) en fonction de la porosité [Bayraktar et al. 2004].

L'os cortical est à la fois plus résistant et plus rigide lorsqu'il est sollicité selon la direction longitudinale (correspondant à la direction des fibres de collagène) (Tableau I.2). Pour cette direction préférentielle, l'os compact présente alors une asymétrie traction-compression et il est également plus résistant en compression qu'en traction (Tableau I.3) [Reilly et al. 1974 ; Reilly et Burstein 1975].

Espèce	Test	Contrainte à la rupture (MPa)	Déformation à la rupture
Humain (fémur)	Traction	133 ± 15	0,038 ± 0,005
	Compression	203 ± 28	0,019 ± 0,003
Bovin (fémur)	Traction	144 ± 6	0,016 ± 0,005
	Compression	272 ± 3	0,016 ± 0,001

Tableau I.3 : Propriétés mécaniques à la rupture de l'os cortical humain et bovin lors d'essais de traction et de compression [Reilly et Burstein 1975].

1.4.1.2. Les propriétés mécaniques macroscopiques de l'os spongieux

Comme tous les tissus biologiques composés de fibres, l'os spongieux montre également une anisotropie dans ses propriétés mécaniques due essentiellement à l'orientation des travées [Ashman et al. 1989] qui le constituent. Le degré d'anisotropie de l'os trabéculaire est faible comparé à celui de l'os compact, mais il reste toutefois significatif à l'échelle macroscopique (Tableau I.4).

Propriétés	E_1	E_2	E_3	G_{12}	G_{13}	G_{23}
Valeur (MPa)	347 ± 218	457 ± 282	1107 ± 634	98 ± 66	133 ± 78	165 ± 94

Tableau I.4 : Constantes élastiques de l'os spongieux humain mesurées par ultrasons. E et G désignent respectivement le module élastique et le module de cisaillement ; 1, 2 et 3 sont les directions de mesures suivant l'axe de la travée. 1 correspond au grand axe de l'os [Ashman et al. 1989].

En plus de l'anisotropie mécanique de l'os trabéculaire, différentes études ont mis en évidence la variabilité du module élastique suivant la zone de prélèvement. Goldstein [Goldstein 1987] a ainsi pu relier cette variabilité non seulement à la localisation, mais aussi à la fonction mécanique de l'os dans le corps. Ashman *et al.* [Ashman et al. 1989] ont pu établir l'existence d'une relation linéaire entre le module élastique mesuré par ultrasons et la densité apparente (la quantité de matière osseuse par unité de volume) de l'os spongieux d'un tibia humain.

I.4.2. Comportement mécanique de l'os à l'échelle microscopique

L'os a été caractérisé mécaniquement à l'échelle de l'ostéon ou de la travée par : nano-indentation [Rho et al. 1997 ; Zysset et al. 1999 ; Rho et al. 2002 ; Wang et al. 2006 ; Rho et al. 2008 ; Bala et al. 2011 ; Zamiri et De 2011b ; Mirzaali et al. 2016 ; Schneider et al. 2017], traction [Ascenzi et Bonucci 1964 ; Ascenzi et al. 1973 ; Ascenzi et Bonucci 1976 ; Ascenzi et al. 1990 ; Rho et al. 1993], compression, flexion et torsion [Ascenzi et al. 1973 ; Ascenzi et al. 1990]. Ashman *et al.* [Ashman et al. 1989] ont notamment adapté la technique d'ultrasons pour déterminer le module élastique des travées osseuses. L'étude a par la suite été complétée sur les ostéons par Rho *et al.* [Rho et al. 1993].

Dans certaines études [Rho et al. 1998 ; Zysset et al. 1999 ; Bala et al. 2011], la valeur du module élastique dans la direction longitudinale des travées individuelles est considérablement inférieure à celles trouvées dans les études à l'échelle macroscopique sur des échantillons d'os spongieux (Tableau I.5), alors que la valeur du module élastique (E_L) des ostéons simples est plus élevée que celle de l'os compact. Ces différences peuvent être expliquées en premier lieu par les volumes analysés différents suivant les techniques employées et donc un effet d'échelle, mais aussi, dans une moindre mesure, par les différences d'âge, de sexe et de mode de vie du cadavre étudié, qui compliquent la comparaison entre ces différentes observations expérimentales.

Espèce	Type d'os	Direction	Module élastique (GPa)	Dureté (GPa)
Fémur humain (Rho et al., 1998)	Ostéon	Longitudinale	21,7	0,63
		Transversale	16,8	0,57
	Travée	Longitudinale	18,2	0,59
		Transversale	16,2	0,56

Tableau I.5 : Module élastique et dureté dans les directions longitudinale et transversale de l'ostéon et de la travée déterminés par nanoindentation.

I. Étude bibliographique

La structure osseuse dans sa globalité présente une hétérogénéité importante, qu'elle soit structurale ou mécanique. L'anisotropie mécanique des ostéons et des travées au niveau microscopique reste cohérente avec les caractéristiques de l'os compact et spongieux au niveau macroscopique (Tableau I.1). D'autre part, l'hétérogénéité de la structure osseuse est plus marquée à l'échelle microscopique. En effet, les propriétés élastiques déterminées par nanoindentation et présentées dans le Tableau I.6 mettent en avant, non seulement les différences entre les ostéons formant l'os compact et les travées de l'os spongieux, mais aussi l'hétérogénéité pour un même type d'os selon l'espèce et la localisation de l'os dans l'organisme. En outre, les résultats de nanoindentation sur fémur humain présentés par Zysset *et al.* et Rho *et al.* montrent clairement que la détermination d'un module élastique unique pour les ostéons ou pour les travées est difficile du fait de la variabilité biologique et des différences de degré de minéralisation au niveau du site indenté. De plus, l'âge des cadavres n'est pas mentionné dans les deux études alors qu'il pourrait expliquer en partie ces variations.

Référence bibliographique	Espèce	Site (des)		
		ostéons	interstitiels	travées
Zysset <i>et al.</i> , 1999	Fémur humain	15 ± 5	17 ± 5	11 ± 5
Wang <i>et al.</i> , 2006	Tibia bovin	25 ± 3	30 ± 2	20 ± 2
Rho <i>et al.</i> , 2002	Fémur humain	22 ± 2	24 ± 2	
Bala <i>et al.</i> , 2011	Vertèbre humaine	16,75	21,23	
Mirzaali <i>et al.</i> , 2016	Fémur humain	18 ± 1	20 ± 1	

Tableau I.6 : Modules élastiques (en GPa) de l'os dans les ostéons, les travées et les sites interstitiels déterminés par nanoindentation.

À l'échelle microscopique, l'os compact est composé de lamelles concentriques, qui forment les ostéons reliés par les lamelles qui constituent le tissu interstitiel. Les résultats de nanoindentation dans différents sites de l'os montrent que le tissu interstitiel est plus rigide que les ostéons (cf. tableau I.6). Selon Wang *et al.* [Wang *et al.* 2006], ceci pourrait s'expliquer par le fait que les travées et les ostéons constituent des tissus osseux plus récents, comparés aux lamelles interstitielles qui proviennent des anciens ostéons partiellement résorbés, et donc plus minéralisés. En effet, l'os le plus récent est le moins minéralisé, ce qui expliquerait un module élastique inférieur. Ceci a été confirmé par Bensamoun *et al.* [Bensamoun *et al.* 2008] qui ont démontré l'inhomogénéité mécanique sur une lame (coupe fine) d'un os compact (fémur) par des essais de nanoindentation dans des zones présentant des degrés de minéralisation différents. Les trois niveaux de gris (White, Gray et Dark) des ostéons indiqués sur la figure I.15 reflètent les différents degrés de minéralisation, haute, intermédiaire et faible, respectivement. Les résultats de l'étude montrent clairement une évolution du module élastique ainsi que de la dureté avec le degré de minéralisation de l'ostéon considéré. Cette

augmentation souligne la corrélation entre degré de minéralisation et propriétés mécaniques, et soutient donc les hypothèses de Wang *et al.*.

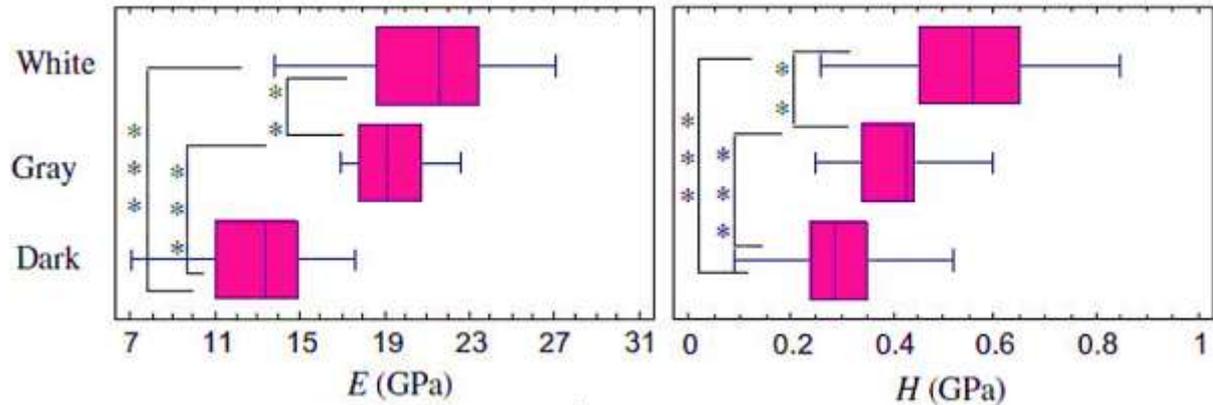


Figure I.15 : Gamme de valeurs de module d'élasticité (E) et de dureté (H) pour des ostéons de degrés de minéralisation différents évaluées par nanoindentation [Bensamoun et al. 2008].

I.4.3. Comportement mécanique de l'os à l'échelle nanoscopique

La prise en compte de chaque niveau d'analyse est nécessaire pour bien caractériser les propriétés mécaniques de l'os, considéré comme un biocomposite structuré hiérarchiquement. En effet, la réponse de la structure osseuse à une contrainte appliquée est fortement dépendante des propriétés des éléments individuels à chaque niveau de l'architecture, ainsi que de l'interaction entre ces éléments. Le collagène, ayant une capacité élevée à se déformer plastiquement, confère à l'os une ténacité (i.e. la résistance du matériau à la propagation des fissures) importante [Yuan et al. 2011]. De même, le minéral ayant un module d'élasticité important donne à la structure osseuse sa rigidité (figure I.16).

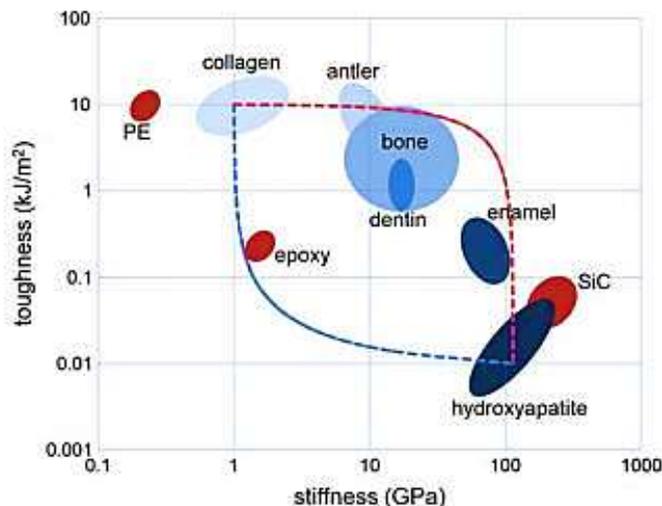


Figure I.16 : Tracé de la ténacité (toughness) en fonction de la rigidité (stiffness) pour les os et les matériaux biologiques qui sont principalement composés de collagène et d'hydroxyapatite [Yuan et al. 2011] ; PE= polyéthylène.

I. Étude bibliographique

I.4.3.1. Les propriétés mécaniques des monocristaux HA

La phase minérale correspond à environ 50 % du volume osseux dont le phosphate de calcium ainsi que le carbonate de calcium sont les principaux constituants. Ces sels minéraux sont présents sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Différentes études de nanoindentation ont été réalisées sur des monocristaux d'HA de synthèse afin d'identifier les propriétés mécaniques de la phase minérale de l'os [Saber-Samandari et Gross 2009 ; Zamiri et De 2011a]. Plusieurs études ont été réalisées par essais de traction ou de compression *in situ* sous diffusion des rayons X aux grands angles WAXS (Wide-Angle X-ray Scattering) afin de caractériser le comportement de l'os à l'échelle nanoscopique [Almer et Stock 2005 ; Gupta et al. 2006 ; Almer et Stock 2007 ; Akhtar et al. 2008 ; Neil Dong et al. 2011 ; Giri et al. 2012]. Les cristaux d'apatite confèrent à l'os une rigidité importante dont le module élastique varie entre 100 et 170 GPa et le coefficient de Poisson entre 0,25 et 0,45. Saber-Samandari et Gross [Saber-Samandari et Gross 2009] ont mis en évidence l'anisotropie d'un monocristal d'HA par une étude détaillée dans différentes directions cristallographiques de sa structure hexagonale. Ils ont également mis en évidence que la dureté et le module élastique mesurés au niveau d'une surface parallèle au plan basal (001) sont plus élevés (respectivement d'environ 11 % et 5 %) par rapport à la face latérale correspondant au plan prismatique (100) (Tableau I.7). En effet, les résultats de la modélisation de la réponse contrainte-déformation en élastoplasticité développée par Zamiri et De [Zamiri et De 2011a], basée sur les données de nanoindentation de Saber-Samandari et Gross, montrent que le cristal présente une limite élastique plus faible et un comportement plus souple en plasticité le long de la direction [100] (figure I.17).

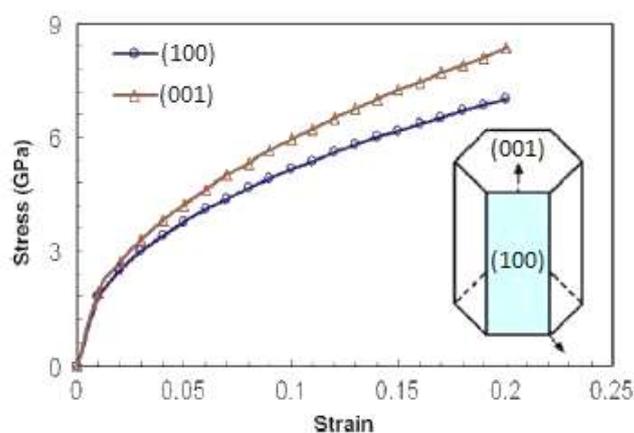


Figure I.17 : Réponse contrainte-déformation modélisée du monocristal d'hydroxyapatite [Zamiri et De 2011a].

Direction cristallographique	Module élastique (GPa)	Dureté (GPa)
[001]	150,38	7,06
[100]	143,56	6,41

Tableau I.7 : Module élastique et dureté d'un monocristal d'hydroxyapatite dans les directions cristallographiques [001] et [100] [Saber-Samandari and Gross 2009].

Les propriétés mécaniques aux échelles supérieures de la structure osseuse dépendent de l'organisation des cristaux d'HA dans la matrice collagénique. Gupta *et al.* [Gupta et al. 2006] ont montré que la contrainte macroscopique en traction induit un processus de déformation couplé et coopératif au niveau des cristaux et des fibres de collagène. Ils ont constaté que la déformation élastique de la phase minérale, mesurée par WAXS, est linéairement corrélée à la déformation élastique des fibres de collagène obtenue par SAXS (Small-Angle X-ray Scattering), dans des environnements humides et secs (figure I.18). Par ailleurs, Neil Dong *et al.* ont étudié la relation entre le comportement mécanique global de l'os en compression et les déformations locales (internes) au niveau des cristaux minéralisés et des fibres de collagène, mesurées par WAXS et SAXS, respectivement. Les auteurs ont montré que les déformations internes des cristaux et des fibrilles varient considérablement durant la déformation de l'os sous compression, mais la déformation relative entre les deux phases présente peu de corrélation avec le comportement global de l'os [Dong et al. 2011].

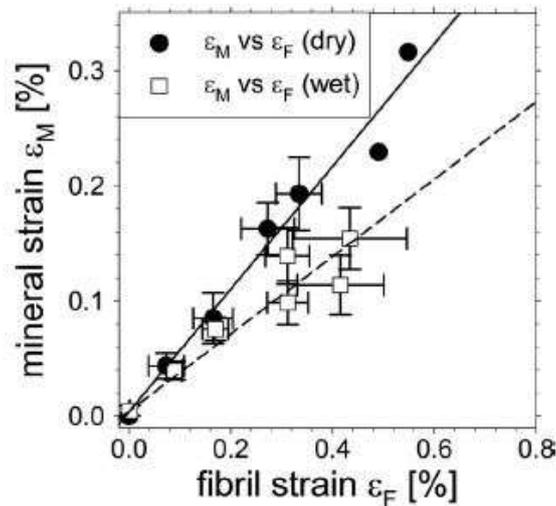


Figure I.18 : Déformation élastique de la phase minérale en fonction de la déformation élastique des fibres de collagène dans des conditions humide (wet) et sèche (dry) [Gupta et al. 2006].

1.4.3.2. Les propriétés mécaniques du collagène

Les techniques les plus adaptées pour étudier les molécules de collagène sont : les pinces optiques (outil optique basé sur la réfraction d'un faisceau laser en milieu transparent) [Sun et al. 2004], le WAXS [Sasaki and Odajima 1996] et le SAXS [Puxkandl et al. 2002 ; Almer et Stock 2005 ; Gupta et al. 2005 ; Gupta et al. 2006 ; Almer et Stock 2007 ; Akhtar et al. 2008 ; Dong et al. 2011 ; Karunaratne et al. 2012a]. Pour les deux dernières techniques de mesure citées, les différentes études ont montré que la molécule de tropocollagène a un comportement linéaire et que son module élastique varie entre 1 et 5 GPa.

I. Étude bibliographique

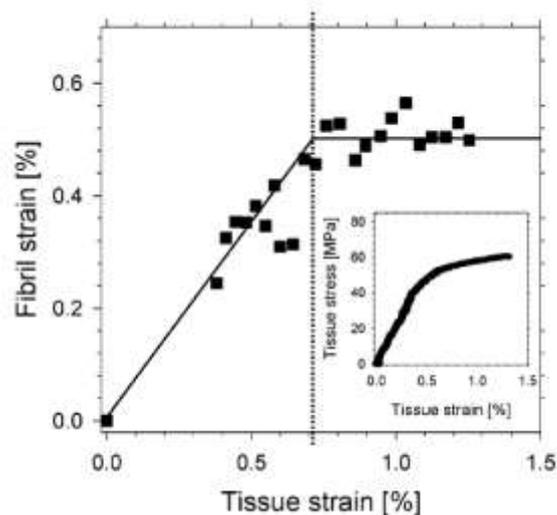


Figure I.19 : Variation de la déformation des fibres de collagène avec la déformation macroscopique [Gupta et al. 2005].

Les essais de traction *in situ* sous diffusion des rayons X (technique présentée plus en détails dans la section suivante) permettent de quantifier la déformation de l'os à différents niveaux simultanément : tissu (niveau macroscopique), fibres et particules minérales (niveau nanoscopique). Les expériences de SAXS réalisées par Gupta *et al.* ont permis de définir l'évolution de la déformation dans les fibres en fonction de la déformation macroscopique imposée à l'os, qui est présentée sur la figure I.19. Dans un premier temps (de 0 à 0,7 % de déformation globale du tissu), les déformations nanométrique et macroscopique sont proportionnelles. Au-delà d'un certain seuil (0,7 %), la déformation des fibres se stabilise en s'approchant d'une valeur constante de 0,5 %. Gupta *et al.* ont fait l'hypothèse que lorsque le tissu est sollicité au-delà de sa limite élastique, les fibres ne se déforment plus. Pour les auteurs, cette hypothèse s'expliquerait par le fait que la déformation des fibres atteint son maximum quand le tissu dépasse son seuil d'élasticité (cf. figure I.19). Ces observations permettent de mieux comprendre la relation entre le comportement macroscopique global de l'os et la déformation locale des cristaux et des fibres de collagène.

I.5. Caractéristique mécanique de l'os crânien

Les études caractérisant le comportement mécanique de l'os plat, tel que l'os du crâne, sont rares. Bien qu'il soit composé essentiellement par deux tables d'os compacts séparées par de l'os spongieux, dont les propriétés individuelles ont été largement étudiées dans la littérature, sa structure stratifiée lui confère un comportement particulier comparativement aux autres types d'os. Les études faites sur l'os du crâne sont essentiellement des études macroscopiques réalisées au travers d'essais de traction sur éprouvettes à section réduite [McElhaney et al. 1970 ; Wood 1971 ; Jaslow 1990], de compression [Barber et al. 1969 ; McElhaney et al. 2017] et de flexion trois et quatre points [Delille 2008 ; Rahmoun et al. 2014]. Un bilan des différentes études de la littérature montre clairement une forte variabilité dans les propriétés mécaniques de l'os crânien. Cette variabilité est essentiellement due aux irrégularités de l'épaisseur du crâne. En effet, selon Barber *et al.*, cette non-uniformité est due à l'hétérogénéité d'épaisseur du diploé dans l'os crânien. Ils ont ainsi prouvé que la réponse

mécanique de l'os plat à une contrainte de compression uniaxiale est fortement sensible à l'épaisseur de la composante spongieuse (figure I.20).

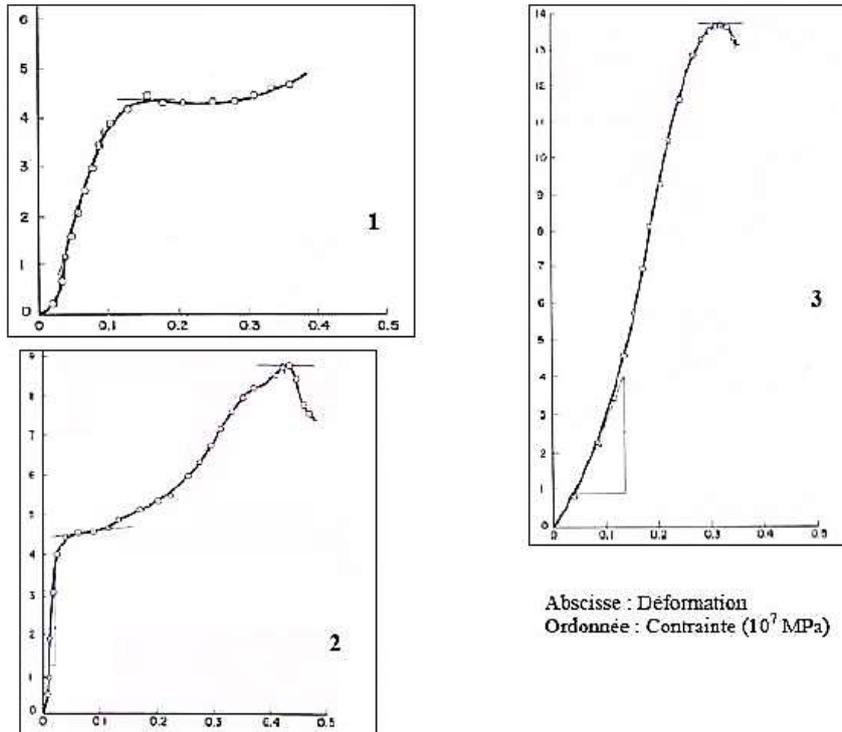


Figure I.20 : Réponse mécanique de l'os plat humain en compression [Barber et al. 1969].

La courbe 1 de la figure I.20 correspond à des éprouvettes de compression possédant un diploé épais. Elles subissent une rupture à faible contrainte correspondant à l'écrasement du diploé. Les échantillons qui possèdent un diploé plus fin subissent quant à eux une rupture à une contrainte plus élevée correspondant à une rupture dans l'une des deux tables corticales (courbe 3 de la figure I.20). La courbe 2 combine les deux types de fractures où l'écrasement du diploé intervient dans un premier temps, suivi d'une fracture dans l'une des tables. Wood [Wood 1971] a aussi mis en évidence la sensibilité de la réponse mécanique à la vitesse de déformation. Il a ainsi testé des échantillons humains de tables externe et interne en traction à des vitesses comprises entre $0,005 \text{ s}^{-1}$ et 150 s^{-1} . Les résultats montrent la forte influence de la vitesse de déformation à la fois sur le module élastique et sur les contraintes et déformations à la rupture. Les valeurs de module élastique (comprises entre 10342 et 22063 MPa) et celles de la contrainte à la rupture (comprises entre 48 et 127 MPa) montrent une croissance linéaire en fonction de la vitesse de déformation, alors que la déformation à la rupture (comprise entre 0,5 et 0,8 %) diminue quand la vitesse de déformation augmente. Cette dépendance à la vitesse de déformation met en lumière un comportement viscoélastique de l'os. L'auteur a également montré que l'os cortical crânien présente une isotropie transverse et il a pu vérifier que le module élastique n'est pas sensible à l'orientation de l'éprouvette dans la direction tangente à la surface du crâne. Les résultats obtenus par McElhaney *et al.* [McElhaney et al. 1970] lors d'un essai de traction sont cohérents avec ceux de Wood [Wood 1970] pour l'os crânien (Tableau I.8). Wood a également étudié les propriétés mécaniques en traction, de chacune des couches pour différentes zones du crâne humain, ce

I. Étude bibliographique

qui lui a permis d'en cartographier les propriétés mécaniques. Plus précisément, les éprouvettes ont été prélevées sur différentes localisations du crâne et suivant différentes directions. L'auteur a pu montrer qu'il n'y a pas de variation dans les propriétés mesurées quelles que soient la position et l'orientation des éprouvettes prélevées : les os crâniens semblent être isotropes.

Nature d'os	Module élastique (MPa)	Contrainte à la rupture (MPa)	Déformation à la rupture (%)
Os crânien (composite)	5400	79	0,8
Table externe	12300	96	0,5
Diploé	5300	43	0,9

Tableau I.8 : Propriétés mécaniques de l'os crânien [McElhaney et al. 1970].

Finalement, les différentes études faites sur l'os du crâne sont essentiellement des études macroscopiques, relativement peu nombreuses. En effet, sa structure particulière stratifiée limite les méthodes et les techniques de caractérisation réalisables à des échelles inférieures dès lors que la délimitation entre les couches corticale et spongieuse n'est pas toujours régulière. Néanmoins, Nakano *et al.* [Nakano et al. 2002] ont montré que la caractérisation structurale et mécanique de l'os crânien est possible grâce à la diffraction des rayons X.

I.6. Caractérisations mécanique et microstructurale de l'os régénéré

L'os est un matériau vivant qui est en formation permanente tout au long de sa vie. Soit il se renouvelle (remodelage), soit il se répare (régénération), afin d'assurer sa fonction mécanique principale, c'est-à-dire supporter les contraintes et résister aux fractures. Dans la partie I.2 sont listés les différentes stratégies et les matériaux d'implantation utilisés en médecine régénératrice osseuse. Le choix du biomatériau de l'implant est fonction de l'application chirurgicale afin d'assurer le succès clinique de l'intervention médicale. Le succès clinique de la réparation osseuse dépend non seulement de la quantité d'os néoformé, mais aussi de la forme, de la structure et des caractéristiques mécaniques de ce nouvel os. Néanmoins, les études portant sur les processus de régénération osseuse, concernant en particulier les propriétés mécaniques induites, sont rares [Manjubala et al. 2009 ; Ishimoto et al. 2013 ; Hoerth et al. 2014] par rapport aux recherches analysant la microarchitecture de la composante minérale régénérée [Liu et al. 2010 ; Rossi et al. 2012 ; Nakano et al. 2012]. En effet, à l'heure actuelle, le succès des différentes stratégies de régénération osseuse est souvent évalué par la détermination de la quantité de volume d'os formé, de la densité minérale ou la caractérisation de la microstructure de la phase minérale. Cependant, les propriétés mécaniques de l'os aux différentes échelles ne sont pas prises en compte alors qu'elles constituent un critère d'évaluation indispensable.

Les technologies d'analyse synchrotron (SAXS et WAXS) sont particulièrement intéressantes dans le cadre de la régénération osseuse, autorisant l'évaluation de la microstructure relative aux cristaux d'HA et aux fibres de collagène (notamment l'évolution des distributions spatiale et géométrique de ces deux phases aux différents stades du processus de régénération) en corrélation avec la détermination simultanée des champs mécaniques.

Après une fracture ou une perte osseuse, la régénération osseuse est assurée par l'activité des ostéoblastes, cellules responsables de la formation d'un tissu hétérogène et en évolution continue. La compréhension des propriétés structurales et mécaniques de l'os reconstruit au cours de sa régénération est primordiale pour identifier les facteurs qui influencent le processus de réparation osseuse. Des études récentes ont mis en lumière l'évolution du comportement mécanique avec le processus biologique de l'os régénéré, soulignant la forte corrélation entre microarchitecture et caractéristiques mécaniques.

En 2009, Manjubala *et al.* [Manjubala *et al.* 2009] ont étudié la relation entre la densité minérale de l'os régénéré (déterminée grâce à l'imagerie électronique rétrodiffusée) et le module élastique déterminé par nanoindentation d'un tibia de mouton à 2, 3, 6 et 9 semaines de régénération. Dans cette étude, le module d'indentation et la densité minérale ont tous les deux évolué régulièrement, mais de manière fortement hétérogène, dans l'espace ce qui montre que, pour des temps de régénération courts (2, 3 et 6 semaines), le tissu néoformé est caractérisé par une microstructure fortement hétérogène. La corrélation entre la réparation osseuse, illustrée dans l'étude de Manjubala *et al.* par la teneur en calcium, et les caractéristiques mécaniques de la matrice néoformée, données par le module d'indentation, montre des différences importantes au cours du temps de régénération. En effet, les auteurs ont montré que dès 2 semaines après la fracture, certaines régions avaient une teneur en minéraux (35 % en volume) proche de la teneur en minéraux de l'os long mature du mouton. Néanmoins, les modules d'indentation dans ces zones étaient deux fois moindres que ceux des os matures. En effet, bien que le module élastique soit connu pour être dépendant de la teneur minérale, les résultats de cette étude indiquent que les propriétés mécaniques de la matrice régénérée peuvent être, elles aussi, dépendantes de la phase organique et de la cinétique de minéralisation.

Quelques années plus tard, Ishimoto *et al.* et Hoerth *et al.* [Ishimoto *et al.* 2013 ; Hoerth *et al.* 2014] ont mis en place une nouvelle approche basée sur la diffusion des rayons X (SAXS et WAXS) afin de caractériser finement l'évolution structurale de l'os régénéré à travers l'orientation préférentielle des cristaux d'HA à différents stades de la reconstruction osseuse. Dans les deux études, les propriétés mécaniques de la nouvelle matrice ont été analysées grâce à des essais de nanoindentation, caractérisant le module élastique en fonction du temps de régénération. Ishimoto *et al.* ont choisi d'analyser la contribution de l'organisation des cristaux minéralisés et de leur densité dans le comportement mécanique d'une diaphyse de cubitus de lapin lors d'un chargement d'indentation, au cours de la phase de cicatrisation (à 2, 4, 6, 12, et 24 semaines) induite par la libération contrôlée de protéine morphogénétique osseuse recombinante, d'un défaut critique (20 mm de diamètre). En se basant sur le rapport d'intensité entre les pics de diffraction des familles de plans perpendiculaires {002} et {310}, les auteurs ont pu estimer le degré d'orientation de l'axe c des cristaux connaissant la valeur théorique pour un matériau non texturé. Le degré d'orientation préférentielle du grand axe des cristaux augmente avec le rapport d'intensité {002}/{310}.

I. Étude bibliographique

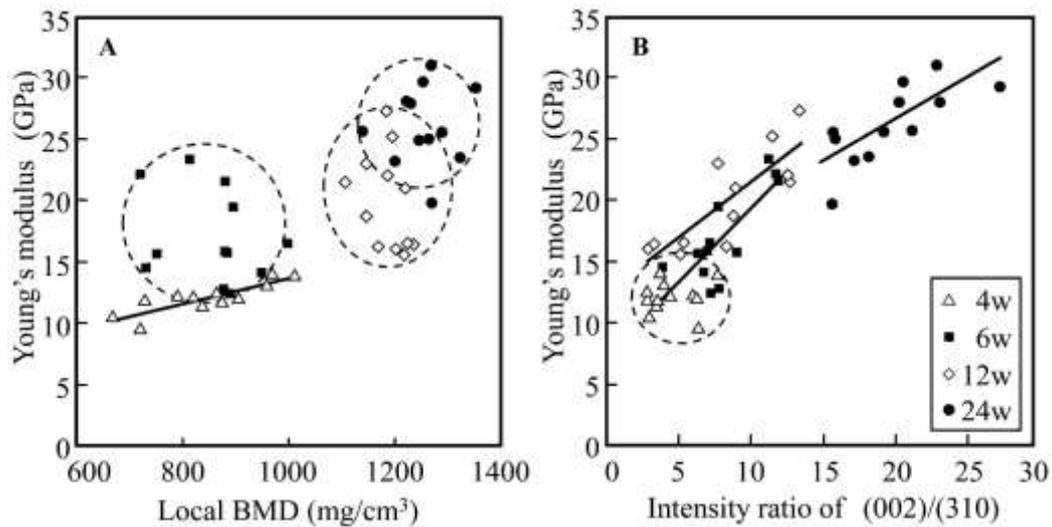


Figure I.21 : Corrélation entre le module élastique et (A) la densité minérale locale (BMD), (B) l'orientation de l'axe c des cristaux minéralisés à 4, 6, 12 et 24 semaines de régénération d'un défaut critique (20 mm) dans la diaphyse d'un cubitus de lapin par la libération contrôlée de protéine morphogénétique osseuse recombinante. Les droites représentent les courbes de tendance significatives entre les paramètres [Ishimoto et al. 2013].

Les auteurs ont montré, comme l'illustre la figure I.21, que le module élastique de l'os régénéré n'était significativement corrélé avec la densité minérale qu'à partir de 4 semaines de régénération. Cependant, il présente une corrélation linéaire avec le facteur d'orientation (quantifiant la texture cristallographique, cf. chapitre II) des cristaux obtenus par WAXS à 6, 12 et 24 semaines (figure I.21.b). Ishimoto *et al.*, ont constaté que même à la fin de leurs expériences (24 semaines de régénération), bien que la densité minérale et l'orientation préférentielle aient été rétablies, le module élastique de l'os régénéré est toujours faible par rapport à l'os natif. Les auteurs ont supposé que la régénération osseuse se faisait en deux phases : une récupération morphologique traduite dans leurs études par la densité minérale et l'orientation préférentielle des cristaux, suivie d'une régénération des propriétés mécaniques illustrées par le module d'indentation. Ces constatations sont en accord avec les résultats de Liu *et al.* [Liu et al. 2010]. Néanmoins, dans les deux études, l'analyse a été limitée à quelques points de mesures dans le défaut qui ne correspondent ni à une surface représentative de l'os régénéré ni à une évolution dans le temps de l'interface (la jonction os natif/régénéré). Une analyse des champs mécaniques à l'échelle des fibres et des cristaux par SAXS et WAXS n'a pas été non plus réalisée. Afin d'enrichir la résolution dans l'espace, Hoerth *et al.* [Hoerth et al. 2014] ont réalisé une étude similaire sur une large sélection de régions dans et autour du défaut. Par ailleurs, les évolutions du facteur d'orientation (WAXS) et de l'épaisseur des cristaux (SAXS) au cours de la régénération d'un os fémoral (2, 3, 4 et 6 semaines de régénération) ont été analysées. Dans cette étude, les paramètres architecturaux (degré d'orientation et épaisseur des cristaux) n'étaient pas corrélés à l'évolution des propriétés mécaniques dans le temps, puisque les essais de nanoindentation n'ont été réalisés qu'à 6 semaines de régénération. D'autre part, la nanoindentation donne accès aux propriétés mécaniques de l'os à l'échelle des ostéons et la corrélation de ces résultats avec la microarchitecture des éléments structuraux (cristaux minéraux et les fibres de collagènes),

n'est donc pas forcément évidente. Les auteurs ont montré que l'épaisseur des cristaux dans l'os régénéré est similaire à celle des cristaux dans l'os natif, même à des temps de régénération courts (i.e. à partir de 3 semaines de régénération), alors que le degré d'orientation n'atteint que la moitié de la valeur déterminée dans l'os intact à la fin des expériences (6 semaines). Les résultats montrent également que la dureté et le module d'indentation évoluent avec la distance au site opératoire. Ces effets peuvent être corrélés aux résultats de Liu *et al.* qui montrent que le tissu le plus loin du centre du défaut est un tissu plus organisé et que les cristaux y sont plus épais, expliquant le gradient de propriétés mécaniques. Toutefois, comme l'étude n'a été faite qu'à un seul temps de régénération (6 semaines) et que la variation biologique influence fortement le comportement mécanique, la conclusion de l'étude ne peut pas être extrapolée pour décrire la régénération dans le temps.

Les études portant sur la caractérisation de l'évolution du comportement mécanique de l'os plat au cours du temps de régénération sont inexistantes à notre connaissance. Les études sur la microstructure développée sont également très rares. Rossi *et al.* [Rossi et al. 2012] ont étudié l'ultrastructure de l'os néoformé autour de biomatériaux comblant un défaut crânien du rat après 13 et 17 semaines d'implantation par microscopie électronique à transmission à haute résolution (METHR) et par microscopie à réflectance totale atténuée par transformée de Fourier (TF). Les auteurs ont remarqué que l'os régénéré autour du biomatériau avait une structure lamellaire bien orientée et riche en collagène de type I. Cependant, l'orientation des fibres au sein d'une lamelle est différente de l'orientation présente dans la lamelle adjacente. Les auteurs ont pu aussi observer dans l'os régénéré des cristaux d'HA en forme de plaquettes, alignées dans la direction de l'axe c et de dimensions (en termes de largeur et d'épaisseur) semblables aux dimensions observées dans l'os préexistant (autour du défaut) de la calvaria du rat dès le début de l'étude (13 semaines après l'implantation). Nakano *et al.* [Nakano et al. 2012] ont analysé le degré d'orientation des cristaux dans l'os reconstruit à 12 semaines de régénération comblant un défaut circulaire dans la calvaria d'un lapin, grâce au WAXS. L'analyse a montré que le degré d'orientation de la zone régénérée est détectable dans l'os plat comme dans l'os long à travers l'analyse du rapport d'intensité des pics de diffraction des familles des plans {002} et {310}. Le rapport d'intensité élevé indique un meilleur alignement des cristaux d'HA suivant l'axe c. La réorganisation de la microarchitecture régénérée est plus rapide dans la table intérieure. Il est très difficile de conclure en se basant sur les résultats de Nakano *et al.*, puisque l'analyse n'a été faite qu'à un temps spécifique de régénération et la comparaison avec l'os naturel autour du défaut n'a pas été réalisée.

I.7. Conclusions

L'os, comme tous les matériaux biologiques, est un matériau structuré hiérarchiquement qui présente un caractère composite grâce à une nanostructure composée d'une phase minérale associée à une matrice organique contenant principalement des fibres de collagène. Cette nature composite confère à la matrice osseuse des caractéristiques mécaniques intéressantes lui permettant de répondre à ses fonctions physiologiques. Pour assurer un bon fonctionnement au cours de sa vie, l'os est entretenu par des cellules intrinsèques à l'os, spécifiques et très spécialisées, grâce à un phénomène appelé le remodelage osseux. Le remodelage osseux est le processus par lequel le renouvellement continu de la masse osseuse, le maintien de la qualité osseuse et la prévention des micro-dommages sont assurés. Dans le cadre de défauts osseux ou de fractures critiques, le phénomène de remodelage seul est insuffisant pour réparer le défaut et combler la perte de substance. La régénération osseuse est donc la solution la plus adaptée en médecine réparatrice pour accélérer la cicatrisation du défaut. La régénération osseuse est assurée par implantation de biomatériaux associés ou non à des cellules et/ou à des facteurs de croissance. Différents types d'implants, principalement rigides et biodégradables, ont été développés et adaptés en génie tissulaire osseux. La réussite de l'implantation et les propriétés de l'os reconstruit sont fortement liées aux aspects mécaniques environnementaux (site chirurgical) et aux propriétés intrinsèques des matériaux utilisés pour le greffon.

La qualité de l'os reconstruit et la détermination des facteurs influençant la régénération osseuse nécessitent une compréhension approfondie des propriétés structurales et mécaniques de l'os reconstruit tout au long du processus de régénération. Dans cette perspective, les recherches de ces dernières années se sont intéressées à l'évolution de la microarchitecture de la phase minérale en fonction du temps de régénération. Une évolution de l'architecture des cristaux d'HA néoformés, illustrée par des modifications de leurs dimensions (épaisseur, largeur) a été observée par plusieurs équipes. La réorganisation de la matrice osseuse au cours de la régénération a été caractérisée à travers l'analyse de l'orientation des cristaux d'HA au cours du temps. Ces modifications ont un impact important sur les caractéristiques mécaniques de l'os néoformé ainsi que sur l'évolution de son comportement mécanique dans l'espace et dans le temps. De ce point de vue, la structure osseuse néoformée n'a pas été étudiée de manière approfondie. L'application des techniques de mesure par diffusion des rayons X sur l'os plat est alors pertinente et permet l'accès non seulement aux informations microstructurales, mais aussi aux champs mécaniques à l'échelle des cristaux de l'os. Plus particulièrement dans le cadre de la régénération osseuse, une campagne d'analyse complète pourrait être réalisée par les techniques de diffusion (WAXS et SAXS) afin de mieux caractériser la réparation osseuse dans le temps (la succession des événements et l'évolution de la structure pendant la régénération) et dans l'espace (propriétés du tissu dans et autour de défaut). Par ailleurs, peu d'études combinent des techniques de caractérisations mécaniques et microstructurales avec celles visant à évaluer les caractéristiques biologiques de l'os néoformé. La corrélation entre l'évolution des propriétés biologiques, de la microstructure et des caractéristiques mécaniques de l'os néoformé au cours de la repousse osseuse devrait être plus développée, vu l'importance de ces éléments dans l'évaluation de la régénération. Ce travail de thèse s'inscrit pleinement dans cette méthodologie.

La cicatrisation osseuse est guidée par une activité cellulaire responsable de la formation et de la maturation du tissu osseux néoformé dont les caractéristiques mécaniques et la structure évoluent au cours du temps. Il est donc indispensable de corrélérer le comportement mécanique de l'os régénéré, résolu dans le temps et dans l'espace, avec les processus biologiques associés afin d'évaluer la réparation osseuse et le succès des stratégies de régénération. Dans cette perspective, ce travail de thèse se veut une proposition scientifique ambitieuse visant à caractériser mécaniquement le processus de régénération osseuse dans le cadre de procédures d'ingénierie tissulaire basées sur l'implantation d'un substitut osseux isolé ou d'un biomatériau. Nous proposons dans les chapitres suivants une approche expérimentale permettant l'évaluation de l'os néoformé dans son milieu au cours du processus de régénération afin de mettre en perspective l'évolution du comportement mécanique dans le temps et dans l'espace avec la structure et l'activité biologique à l'échelle microscopique et la cinétique de régénération.

II. Techniques expérimentales et procédés d'analyse de la reconstruction osseuse

II.1.	Introduction.....	51
II.2.	Protocole chirurgical	51
II.2.1.	Animaux.....	51
II.2.2.	Processus chirurgical	52
II.2.3.	Propriétés des implants utilisés.....	54
II.2.3.1.	La greffe osseuse (Bone Graft - BG)	54
II.2.3.2.	BCP (phosphate de calcium biphasé)	55
II.2.3.3.	BCP + TBM (phosphate de calcium biphasé + moelle osseuse)	56
II.3.	Analyses mécanique et microstructurale de l'os	56
II.3.1.	Étude de l'os régénéré par rayonnement synchrotron.....	56
II.3.1.1.	Élaboration des éprouvettes de traction.....	56
II.3.1.2.	L'essai de traction in situ en SAXS et WAXS	61
II.3.1.3.	Présentation des synchrotrons.....	62
II.3.1.4.	Diffusion des rayons X appliquée à l'étude des tissus osseux.....	63
II.3.2.	Nanoindentation	74
II.3.2.1.	Préparation des échantillons de nanoindentation	74
II.3.2.2.	Protocole de la nanoindentation.....	75
II.3.3.	Évaluation micro architecturale et activité biologique de l'os régénéré	77
II.3.3.1.	Micro-tomographie X (Micro-computed Tomography : micro-CT).....	77
II.3.3.2.	Examens histologiques	79
II.4.	Conclusions.....	85

II.1. Introduction

Les phénomènes de régénération de l'os et d'intégration d'implant sont assurés par différentes séquences de formation ou de résorption du tissu ou de l'implant au cours desquelles le tissu régénéré subit des changements structuraux tout au long du processus de régénération. L'amélioration continue des implants et le développement de stratégies innovantes nécessitent une caractérisation fiable de ces structures afin d'identifier et de valider les facteurs qui favorisent une régénération réussie. Pour avoir une compréhension approfondie de ces facteurs, ces analyses doivent s'inscrire dans une démarche multidisciplinaire englobant simultanément les phénomènes biologiques, microstructuraux et mécaniques, fortement couplés. Ce deuxième chapitre présente donc une campagne d'analyse expérimentale multiéchelle de la régénération osseuse afin de mieux comprendre les phénomènes biologiques qui assurent l'intégration des greffons, la genèse du nouveau tissu, le changement de la structure développée et l'évolution des caractéristiques mécaniques de la structure régénérée au cours du temps. L'objectif de ce chapitre est de mettre en place le processus chirurgical et le protocole expérimental dans le but de caractériser la régénération osseuse au cours du temps du point de vue biologique, microstructural et mécanique à travers l'analyse de la nature du tissu développé dans et autour d'un défaut pendant la guérison.

II.2. Protocole chirurgical

II.2.1. Animaux

Le passage par des modèles animaux de laboratoire est indispensable pour étudier aisément le comportement et les propriétés des différents types de tissu vivant, et pour utiliser des stratégies chirurgicales que l'on ne peut pas expérimenter facilement et directement chez l'Homme. Dans le cadre de la régénération osseuse, le défaut osseux dans la calvaria de rat est un bon modèle permettant l'analyse de la réparation de l'os au cours du temps et ainsi valider la pertinence des stratégies et des implants utilisés. En effet, d'après Hillier et Bell [Hillier et Bell 2007], les différentes espèces ne montrent pas de différences de structure à l'échelle macroscopique et les dissemblances entre l'os humain et l'os de rat sont principalement visibles au niveau de la microstructure de l'os cortical. L'os compact du rat est un tissu osseux avec des systèmes haversiens rares et dispersés alors que chez l'Homme, cet os cortical est essentiellement structuré sous forme de systèmes haversiens (ostéons) fortement organisés. Malgré ces différences, le modèle du rat est le plus utilisé pour étudier la régénération osseuse [Petite 2002] car il répond à une série de critères importants pour l'expérimentateur : la reproductibilité et la disponibilité, la facilité d'élevage, de manipulation et d'expérimentation et, finalement, les considérations économiques (prix d'achat et coût d'hébergement).

Anatomiquement, plusieurs régions du squelette du rat peuvent servir comme site d'implantation (fémur, tibia, mandibule, calvaria...). Pour cette étude, la calvaria a été choisie pour plusieurs raisons. D'une part, les défauts craniofaciaux représentent une très grande proportion des situations cliniques nécessitant une régénération osseuse : résection (ablation) de tumeurs, maladie génétique, ostéoradionécrose (nécrose du tissu osseux faisant suite à une radiothérapie)... Ces raisons motivent l'étude de la régénération osseuse sur le site osseux

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

de la calvaria. D'autre part, la calvaria permet de réaliser rapidement des défauts reproductibles qui ne nécessitent pas de fixation pour la stabilisation comme c'est le cas des défauts réalisés au niveau des os longs tels que les fémurs. Dans notre cas particulier, l'os plat constitue le modèle de choix car il permet de réaliser des analyses de la microstructure développée par diffusion des rayons X, en transmission.

Notre étude a été menée sur des rats mâles syngéniques (i.e. des animaux issus d'une lignée pure qui permet de minimiser les réactions immunologiques de rejet dans le cas de greffes) de 6 à 7 semaines (Lewis 1A), achetés chez un éleveur agréé (Charles River, France). Une à deux semaines d'acclimatation ont été respectées avant l'expérimentation. Toutes les procédures expérimentales réalisées chez l'animal ont été approuvées par le comité d'éthique des Pays de la Loire (CEEA-PdLn°6) (Études 2016111513349765/APAFIS 8560 et 2018020215215582/APAFIS 15410) et réalisées sous la supervision des Pr. Pierre Corre et Pierre Weiss, autorisés à expérimenter et à pratiquer des procédures chirurgicales sur le rongeur. Les animaux ont été hébergés dans l'établissement d'expérimentation animale à l'Unité Thérapeutique Expérimentale de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (UTE IRS) qui est agréé par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche (n° d'agrément : B44-279). Les expérimentations animales y ont été conduites dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive 2010/63/UE).

II.2.2. Processus chirurgical

La procédure de mise en place des implants et de prélèvement des échantillons est schématisée sur la figure II.1. Les animaux acclimatés, âgés de 8 semaines, ont été anesthésiés par inhalation d'un mélange air/isoflurane (4 % d'isoflurane) dans une chambre à induction fermée. Les animaux ont ensuite été placés sur un chariot chauffant et l'anesthésie a été maintenue avec un mélange air/isoflurane (2 % d'isoflurane) à travers un masque d'inhalation. Les poils sur la partie supérieure du crâne (site opératoire) ont été cisailés et la peau a été nettoyée avec de l'eau stérile et de la polyvidone iodée (Betadine®). Une injection sous-cutanée d'un anesthésiant local, la lidocaïne (Xylocaïne®) à 5 mg.kg⁻¹ a été effectuée sur la zone nettoyée. Après quelques minutes (nécessaires pour l'efficacité de la lidocaïne), la peau et le périoste ont été incisés et repoussés sur les côtés. Une craniotomie pariétale paramédiane bilatérale a été réalisée avec une tréphine (trépan) de 3 mm de diamètre extérieur. Les défauts ont été abondamment irrigués par une solution saline pour éviter la cautérisation des bords par la tréphine. Ensuite, les défauts ont été comblés avec différents matériaux d'implant : une greffe osseuse (Bone Graft - BG, os spongieux de la métaphyse fémorale, prélevé sur un rat de la même espèce) ; des particules de phosphate de calcium biphasé (Biphasic Calcium Phosphate - BCP (20/80 HA/ β -TCP, 0,5-1mm, Biomatlante, France) ; BCP avec de la moelle osseuse (Total Bone Marrow – TBM). Les défauts laissés vides ont été utilisés comme témoins négatifs. Les implants ont été préparés en même temps que la création chirurgicale des défauts osseux, et la même nature d'implant a été utilisée pour chacun des deux défauts de part et d'autre de la calvaria.

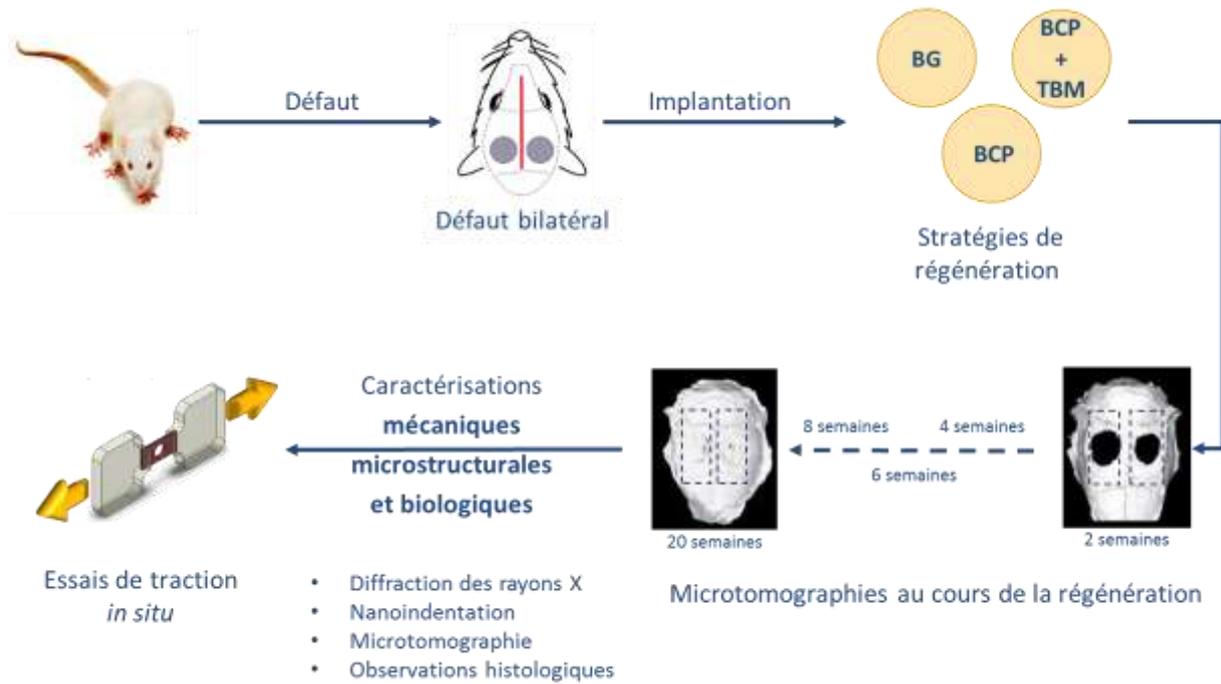


Figure II.1 : Schéma synoptique de la démarche de l'étude expérimentale pour les protocoles de préparation des échantillons et de caractérisations biologiques, mécaniques et microstructurelles.

Une fois les défauts comblés, la peau a été suturée par de simples points de suture (5/0, suture non résorbable, Ethilon®) et les animaux ont ensuite été remis dans leurs cages avec boisson et nourriture à volonté. L'analgésie postopératoire a été obtenue par injection sous-cutanée de buprénorphine (Buprecare®), à $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ au moment de l'intervention, puis deux fois par jour pendant 3 jours, et de meloxicam (Metacam®), à 1 mg.kg^{-1} lors de l'opération, puis mélangé dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Après une période de 2 à 20 semaines, les animaux ont été euthanasiés dans une chambre fermée au CO_2 , puis la calvaria a été prélevée. Finalement, ce protocole nous a permis d'obtenir des échantillons prélevés (tableau II.1) à différentes étapes de régénération (respectivement après 2, 4, 6, 8 et 20 semaines) pour chacune des 3 stratégies étudiées ainsi que pour le contrôle négatif (i.e. le défaut laissé vide).

Au total 65 rats ont été utilisés pour cette étude (60 pour l'étude de la régénération par implantation, dont 14 rats donneurs de la greffe et de la moelle osseuse, et 5 pour l'étude de l'effet d'âge). Le nombre d'animaux pour chaque condition (type d'implant et temps de régénération) est donné par le tableau II.1. Il est à noter que les rats correspondant à de longs temps de régénération ainsi que les rats qui n'ont pas subi de chirurgie ont été analysés dans une deuxième série (notée en gras dans le tableau II.1). Néanmoins, les expérimentateurs pour la chirurgie sont restés les mêmes, ce qui minimise la variabilité inter-expérience. D'autre part, nous avons pu comparer la repousse osseuse après 8 semaines de régénération entre des animaux de la première et de la seconde série. Ces animaux nous servent de contrôle de reproductibilité. Aucune différence qualitative marquante n'est observée entre les deux séries d'analyses. En effet, les observations biologiques, la microstructure développée et le

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

comportement mécanique de la calvaria du rat à 8 semaines de régénération de la première série sont similaires à ceux de la seconde série.

Temps de sacrifice Défaut	2 semaines	4 semaines	6 semaines	8 semaines	20 semaines
	BCP	3	3	4	1+1
BCP + TBM	3	3	3	1+1	2
BG	3	3	3	1+1	2
Trou Vide (TV)	1	1	1	1	2
Sans Trou (ST)	1	1	1	1	1

Tableau II.1 : Nombre d'animaux utilisés durant la première et la seconde série (en gras) en fonction de la stratégie étudiée et suivant le temps de régénération étudié.

Pour 8 et 20 semaines de régénération, le nombre des rats a été réduit à 2, principalement pour des raisons de coûts d'hébergement (les animaux doivent être maintenus longtemps avant sacrifice).

Entre le prélèvement des échantillons sur les animaux et les expériences de caractérisation, plusieurs mois de stockage ont été nécessaires. Pour conserver les échantillons sans endommager les phases organique et minérale ainsi que pour sauvegarder les propriétés mécaniques de l'os, les crânes prélevés ont été fixés à l'alcool à 70 % et ils ont été conservés à une température de 4°C. En effet, Linde *et al.* [Linde et al. 1993], ont montré que la conservation de l'os dans l'éthanol n'entraîne pas de modifications significatives des propriétés mécaniques apparentes mesurées par chargement quasi statique.

II.2.3. Propriétés des implants utilisés

Les implants utilisés pour la régénération osseuse des défauts crâniens sont des matrices naturelles (greffe osseuse) ou synthétiques (BCP) qui jouent le rôle de guides et de supports pour la migration et l'activité des cellules osseuses grâce à des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction (cf. chapitre I).

II.2.3.1. La greffe osseuse (Bone Graft - BG)

Les greffons osseux ont été obtenus à partir de l'os trabéculaire, aux extrémités proximale et distale des fémurs et des tibias de rats de la même espèce une fois la moelle osseuse éliminée par lavage de la cavité médullaire. Le prélèvement du greffon et son implantation ont été réalisés en même temps ; la greffe a été mise en place fraîche et elle n'a pas subi de traitement. Ces greffons ont donc un fort pouvoir à la fois ostéoconducteur, conféré par les protéines de la matrice osseuse, et ostéoinducteur, grâce à la présence de facteurs de croissance et aux cellules ostéocompétentes présentes dans le greffon au moment de

l'implantation. Le tissu osseux spongieux récupéré au niveau des fémurs et des tibias possède une structure propice à la migration des cellules et accélère la résorption du greffon. Du point de vue biologique, ce type d'implant possède deux caractéristiques essentielles pour la régénération : la biocompatibilité (ne présente pas de risques de contamination, de toxicité et d'inflammation) et la bioactivité (favorise l'interaction et l'échange entre ses cellules et les cellules de l'hôte autour du défaut, entraînant une résorption totale et une néoformation rapide).

II.2.3.2. BCP (phosphate de calcium biphasé)

La phase minérale du tissu osseux est majoritairement composée par le phosphate de calcium apatitique (hydroxyapatite). Afin de reproduire l'ostéoinduction des autogreffes, conférée par la composition chimique de leurs minéraux, certains chercheurs ont proposé d'utiliser les céramiques à base de phosphate de calcium comme matériaux d'implantation en orthopédie [Petite 2002]. Le phosphate de calcium biphasé (BCP : Biphasic Calcium Phosphate) est la céramique qui s'approche le plus des phases minérales naturellement présentes de l'os. En effet le BCP (20 % de HA et 80 % de β -TCP en masse) utilisé dans cette étude est un mélange d'HA (Hydroxyapatite) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et de TCP (phosphate tricalcique) sous sa forme β et de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Avec cette formulation chimique, le BCP possède des propriétés biologiques intéressantes dans le domaine de la régénération osseuse. Parmi les propriétés biologiques du BCP, c'est la biocompatibilité (traduite par la biorésorption et l'ostéoconduction) et la bioactivité qui motivent ici encore son utilisation. Tout d'abord, la biocompatibilité est une caractéristique essentielle et indispensable de tous les biomatériaux d'implantation. Elle régit leur capacité d'intégration dans la matrice vivante [Daculsi et al, 2008] sans la dégrader ni causer de réactions inflammatoire ou toxique (rejet d'un corps étranger). La biocompatibilité dans le cas du BCP peut être illustrée par sa biorésorption, appelée aussi biodégradation. En effet, dès les premiers jours après implantation, les précurseurs ostéoclastiques migrent sur la surface des particules de BCP et commencent la dissolution des cristaux de céramique. La vitesse de dégradation (de résorption) du BCP est liée au rapport de masses HA/ β -TCP (20/80 dans notre cas). Un pourcentage de β -TCP élevé (supérieur à 25 %) dans les céramiques assure une dissolution rapide et une bonne intégration de l'implant dans le tissu osseux [Petite 2002 ; Nery et al. 2012]. La vitesse de résorption des BCP dépend aussi de la taille des grains et de la porosité de la structure implantée. Les implants de BCP utilisés ici sont à base de granules de diamètres compris entre 0,5 et 1 mm. Elles assurent un facteur de porosité important qui facilite les ramifications vasculaires et qui permet aux cellules osseuses de prendre place autour et dans les pores de l'implant, couplé à une résorption rapide. L'interaction des cellules de l'os avec les particules de BCP prouve sa bioactivité et la possibilité de créer des liaisons fortes entre la matrice dissoute de la céramique et le milieu biologique environnant. Le résultat majeur de cette interaction est la formation d'une nouvelle matrice sur les surfaces ostéoinductrices de l'implant.

Les différentes étapes de l'ostéointégration du BCP qui résument toutes ces propriétés sont décrites par Frayssinet *et al.* [Frayssinet et al. 1998] en quatre étapes fondamentales :

- étape 1 : résorption des particules de céramique et remplacement par un tissu conjonctif ;
- étape 2 : différenciation des ostéoblastes dans le tissu conjonctif ;
- étape 3 : formation d'un tissu osseux immature avec une orientation aléatoire des fibres de collagène à la surface de l'implant ;

étape 4 : remodelage de l'os immature et de la céramique pour être remplacés par de l'os mature organisé.

II.2.3.3. BCP + TBM (phosphate de calcium biphasé + moelle osseuse)

Un mélange de BCP et de moelle osseuse a enfin été utilisé afin d'étudier la régénération osseuse par une technique mixte qui associe des cellules (moelle osseuse) et un matériau synthétique (phosphate de calcium biphasé), se rapprochant donc de l'ingénierie tissulaire. L'hypothèse sous-jacente à l'utilisation de la moelle osseuse est d'avoir un apport de facteurs de croissance et de cellules, associé à l'implant, qui va favoriser ses propriétés d'ostéoinduction. Des études quantitatives ont déjà été réalisées par Bléry *et al.* [Bléry et al. 2014] sur l'association moelle osseuse/BCP. Les auteurs ont montré que l'ajout de moelle osseuse augmente la formation osseuse comparativement au BCP seul.

La moelle osseuse a été obtenue en rinçant la cavité médullaire d'os longs des rats donneurs (fémurs et tibias) avec une solution saline à l'aide d'une aiguille fine. Les grains de BCP sont ensuite dispersés dans ces suspensions cellulaires pour constituer l'implant.

II.3. Analyses mécanique et microstructurale de l'os

Le but de ce travail était d'obtenir une compréhension fine et complète de la relation entre la microstructure et le comportement mécanique de l'os au cours de la régénération osseuse. Ce travail vise à étudier l'architecture de l'os nouvellement formé, notamment les propriétés microstructurales (dimensions et morphologie) et la distribution des cristaux minéralisés au cours de la régénération, afin de mieux comprendre leur rôle dans la résistance osseuse et leurs contributions aux propriétés mécaniques dans et autour du défaut réparé. La corrélation entre le comportement mécanique de l'os dans le temps et dans l'espace, l'activité biologique et la cinétique de régénération qui s'y rapportent a été évaluée par des sollicitations mécaniques (essais de traction *in situ* et mesures par nanoindentation) et des analyses biologiques (tomographie et observations histologiques) sur des échantillons prélevés à différentes étapes de régénération (respectivement après 2, 4, 6, 8 et 20 semaines). Pour chaque temps de régénération, un rat n'ayant subi aucune intervention chirurgicale a été sacrifié afin d'obtenir un état de référence et évaluer les changements liés à l'âge pendant la régénération. L'outil expérimental privilégié de ce travail a été la diffusion des rayons X sur synchrotron. Des essais de traction ont été couplés à la diffusion des rayons X aux petits et grands angles SAXS/WAXS (Small- et Wide-Angle X-ray Scattering) afin de caractériser *in situ*, du point de vue microstructural et mécanique, le tissu régénéré à l'échelle de ses composants élémentaires (l'échelle des cristaux et des fibres de collagène).

II.3.1. Étude de l'os régénéré par rayonnement synchrotron

II.3.1.1. Élaboration des éprouvettes de traction

Le premier défi expérimental a tenu dans la mise en place d'un essai de traction autorisant non seulement une caractérisation mécanique fiable, mais aussi des mesures *in situ*. Les premiers travaux ont donc porté sur la mise en place d'un protocole de préparation des échantillons et notamment leur conditionnement en éprouvette. Celle-ci a été conçue afin d'offrir une géométrie s'approchant de celle d'une éprouvette normée, de manière à assurer l'application d'un champ de contraintes homogène dans la zone d'intérêt (dans et au voisinage

immédiat du défaut et de son implant) lors d'un chargement en traction uniaxiale sur l'échantillon de calvaria prélevé. Comme les deux défauts créés sur la calvaria ont été comblés par le même type d'implant, on a pu prélever deux échantillons issus d'un même rat (figure II.2.a). D'une manière générale, le côté droit de la calvaria a été analysé mécaniquement sur synchrotron alors que le côté gauche a servi pour l'étude biologique (examen histologique).

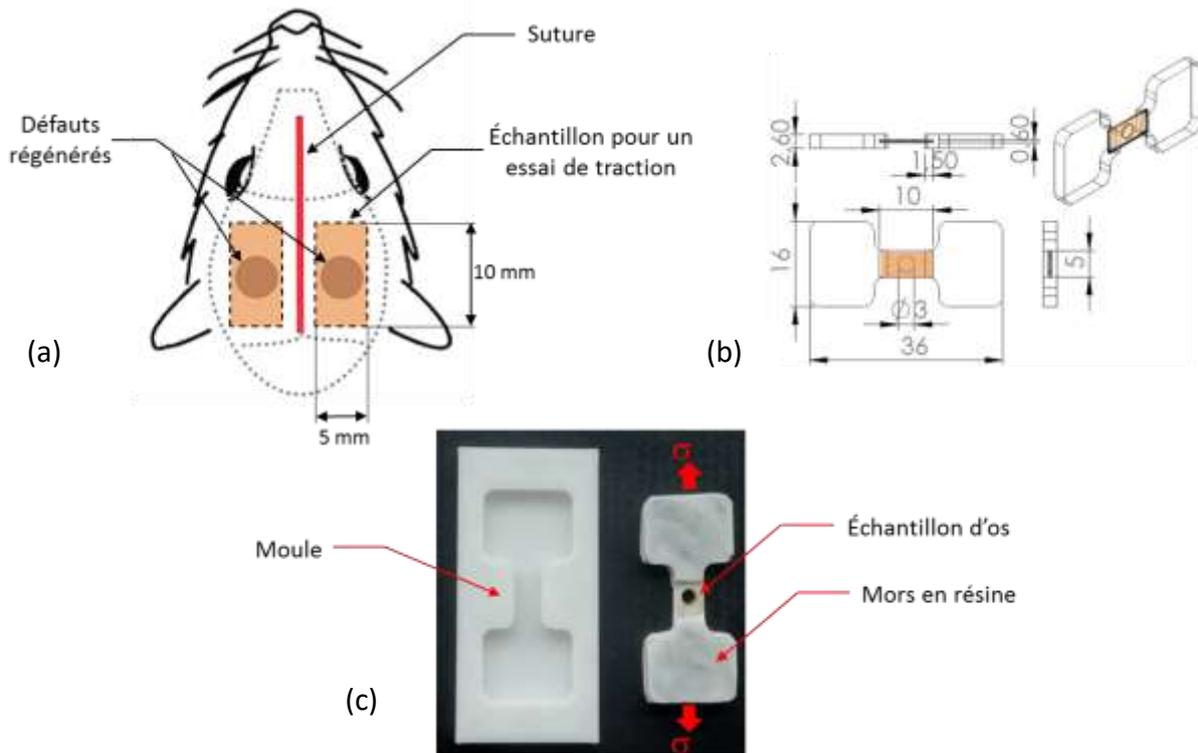


Figure II.2 : (a) Prélèvement des échantillons ; (b) représentation numérique en 3D et vues schématiques des éprouvettes de traction ; (c) réalisation : exemple de moule et d'éprouvette finalisée.

La géométrie de l'éprouvette de traction est présentée sur la figure II.2. Le protocole de préparation des éprouvettes est le suivant : les deux échantillons à prélever sur chaque crâne sont découpés à l'aide d'une scie portable (DREMEL) après élimination du périoste de la voûte crânienne. Après nettoyage, les deux extrémités de la plus longue dimension des blocs d'os parallélépipédiques ($10 \times 5 \times 0,6 \text{ mm}^3$) sont moulées dans une résine (AXSON F180) chargée en fibres de carbone sur une longueur de 2 mm pour assurer une prise suffisante par rapport aux chargements à appliquer. Le moule (figure II.2.c) a été fabriqué par impression 3D en matière plastique flexible afin de faciliter le démoulage. Cette étape a permis l'élaboration des têtes de fixation des éprouvettes de traction. En outre, avant chaque moulage, une pâte facilitant le démoulage a été appliquée sur le moule afin d'éviter toute adhérence de la résine au moule et limiter la sollicitation mécanique de l'échantillon lors de l'étape de démoulage.

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

Le choix de la résine AXSON F180 est basé sur sa prise rapide d'une part, limitant l'exposition du tissu osseux à l'air sec, et sur son faible pic exothermique pendant la polymérisation d'autre part, évitant la détérioration des propriétés mécaniques de l'échantillon. De plus, des renforts en fibres de carbone ont été ajoutés afin d'améliorer la rigidité de la résine ainsi que l'adhérence à l'interface os/résine. Cette rigidité accrue assure notamment une déformation négligeable des têtes de fixation des éprouvettes en résine au profit de la section droite correspondant à l'échantillon de calvaria, lors des essais.

Afin de vérifier la fiabilité de la géométrie adoptée ainsi que la pertinence du protocole de préparation, des essais préliminaires de traction monotone sur l'os crânien naturel ont été réalisés sur une micro-machine de traction Deben équipée d'une cellule de force de 200 N (figure II.3.b). La figure II.3.a présente la courbe contrainte-déformation macroscopique d'un échantillon de calvaria sans défaut osseux lors d'un chargement en traction à une vitesse de déplacement appliquée de $0,2 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Le domaine élastique de la courbe présente deux pentes distinctes qui peuvent être expliquées par la géométrie inhérente à la voûte crânienne, à savoir une courbure comprise entre 5 et 100 mm en fonction de sa localisation et l'âge de l'individu. Ainsi, la courbure initiale indique que les efforts mécaniques enregistrés au début de l'essai correspondent aux efforts nécessaires pour aplanir l'éprouvette. Par la suite, la relation linéaire observée entre la contrainte et la déformation traduit le comportement élastique de l'os. La figure II.3.a montre également la présence d'un palier irrégulier (entouré en vert) causé par l'initiation et la propagation de microfissures dans la couche spongieuse juste avant la rupture de l'échantillon (entouré en rouge). En effet, celle-ci présente un comportement moins résistant que les deux couches corticales. Par la suite, lors des essais de traction *in situ*, les analyses se feront en veillant à avoir des charges permettant non seulement de se libérer de tout effet de courbure de la voûte crânienne, mais aussi d'éviter de rencontrer cet endommagement.

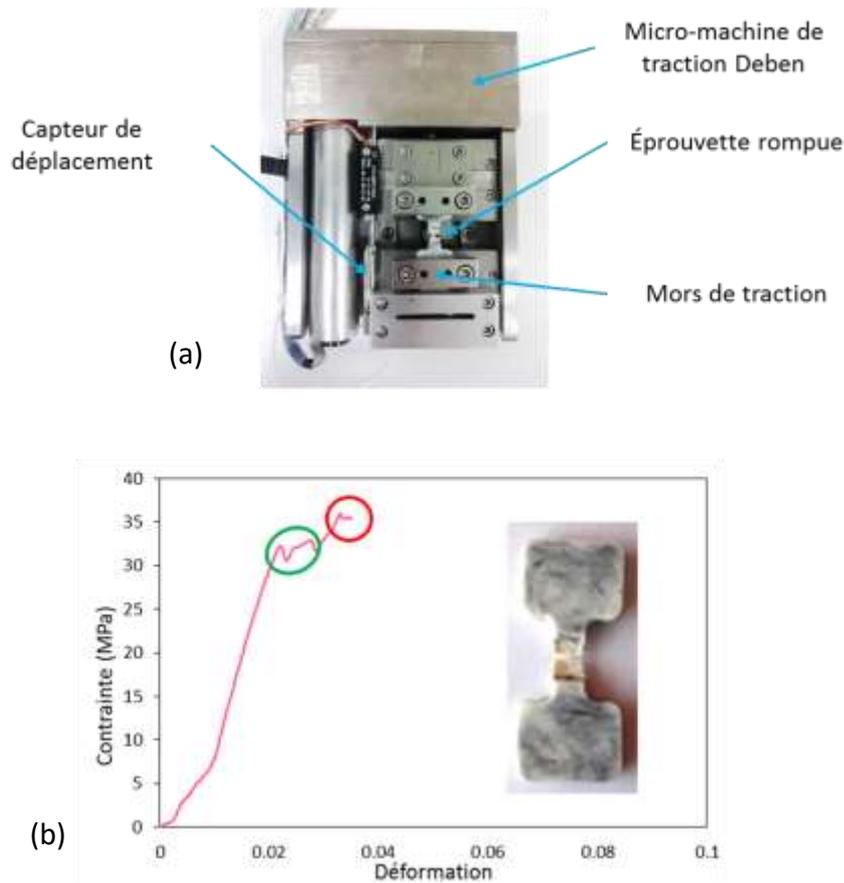


Figure II.3 : (a) Micro-machine de traction Deben ; (b) courbe contrainte-déformation macroscopique expérimentale obtenue avec l'os crânien.

L'interprétation concernant la géométrie et l'effet de la courbure de l'échantillon a été justifiée par une étude numérique en élasticité par Éléments Finis (EF) qui corrobore cette analyse (figure II.4). L'essai de traction a été simulé sur Abaqus[®], permettant de tenir compte des caractéristiques géométriques inhérentes à l'os crânien, à savoir deux couches d'os cortical enfermant une couche d'os spongieux et présentant une courbure initiale. L'objectif principal de cette étude numérique a été d'analyser l'effet du rayon de courbure sur l'allure de la courbe force/déplacement. Pour cela, quatre rayons de courbure différents ont été étudiés : 50 mm, 15 mm, 10 mm et 7,5 mm. Les éprouvettes virtuelles font 0,6 mm d'épaisseur avec une longueur de 10 mm et une largeur de 5 mm. Elles sont composées de trois couches afin de reproduire la structure de nos échantillons. Les propriétés associées aux différents matériaux sont issues de l'étude de McElhaney *et al.* [McElhaney et al. 1970] : $E = 5,4 \text{ GPa}$ et $\nu = 0,4$ pour l'os trabéculaire (au centre) ; $E = 12 \text{ GPa}$ et $\nu = 0,4$ pour l'os cortical (les deux tables extérieure et intérieure). Pour réduire les temps de calcul et alléger le modèle, seule une section 2D a été représentée, sous l'hypothèse des déformations planes. Les déplacements et rotations de la face inférieure ont été bloqués et un déplacement de 1 mm a été imposé sur la face supérieure à l'aide d'un point de référence (qui correspond donc à un

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

mors de traction virtuel). Les calculs ont été menés en prenant en compte la non-linéarité géométrique due à la courbure des échantillons. L'approximation spatiale a été réalisée avec environ 10 000 éléments finis pour chaque modèle. À chaque fois, 24 éléments ont été mis dans l'épaisseur des échantillons. Le maillage a été fait avec des éléments quadrilatères de déformation plane à 4 nœuds avec intégration réduite, notée CPE4R sous Abaqus[®]. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure II.4 qui montre l'évolution de l'effort imposé en fonction du déplacement du point de référence associé à la face supérieure. Plus la courbure de l'os est importante et plus la courbe force/déplacement est caractérisée par deux parties : la première partie, transitoire, correspond à une réduction de la courbure due à l'effort de traction imposée, et la seconde partie, linéaire, correspond à l'essai de traction à proprement parler. Cette courbe à double pente est particulièrement marquée dans le cas où le rayon de courbure R est égal à 7,5 mm. Sur la figure II.4, est également reproduite l'évolution simulée de la géométrie de l'échantillon (a, b, c et d) prise à différents niveaux de chargement. Ceci montre clairement que les efforts mécaniques, enregistrés au début de l'essai, sont les efforts nécessaires pour aplanir l'éprouvette (première pente).

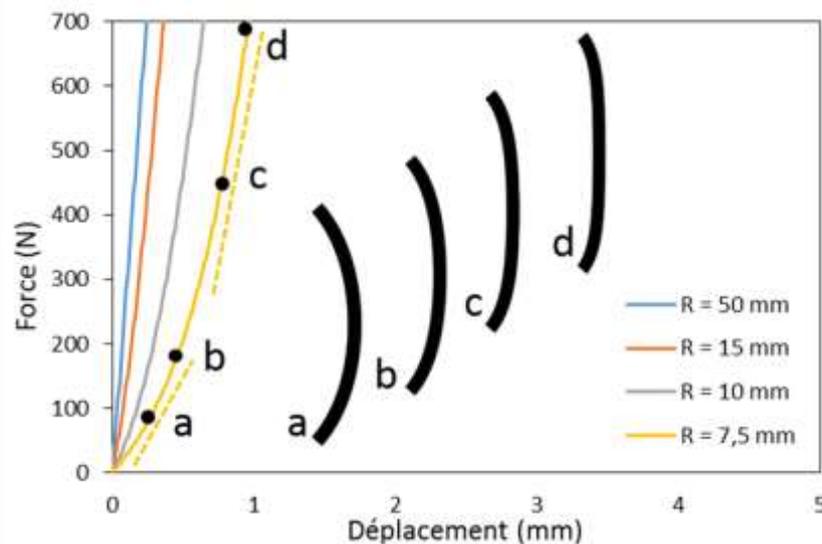


Figure II.4 : Évolution prédite de la courbe force/déplacement en fonction du rayon de courbure de l'échantillon : simulation sur Abaqus[®] d'un essai de traction pour un déplacement macroscopique appliqué de 1 mm dans le cas d'une structure sandwich (cortical-spongieux-cortical) courbée, représentative des échantillons issus de la calvaria du rat.

D'autre part, le champ de contraintes généré numériquement selon l'axe de traction pour un déplacement macroscopique appliqué de 1 mm (non représenté ici) illustre l'homogénéité du champ de contraintes obtenu au centre de l'éprouvette de l'os (position du défaut et de l'implant), critère essentiel dans ces travaux. Cette étude numérique valide ainsi non seulement la démarche associée à l'obtention d'une éprouvette normée, mais aussi la géométrie retenue pour cette étude. Par la suite, l'état mécanique de référence pour l'analyse des champs mécaniques lors de nos essais sur synchrotron sera donc pris au départ de la

seconde partie linéaire afin de s'assurer d'une caractérisation fiable du matériau, en s'affranchissant du mieux possible de la géométrie non plane de l'os considéré.

II.3.1.2. L'essai de traction *in situ* en SAXS et WAXS

La charge de traction, en régime élastique, a été appliquée pas à pas (état initial de contrainte mécanique + 4 charges incrémentales) jusqu'à une force maximum de 50 N. Pour chaque étape de chargement et pour chaque échantillon, des mesures SAXS et WAXS ont été réalisées en transmission (figure II.5) grâce à deux détecteurs 2D. Une cartographie de l'état mécanique dans et autour du défaut sur une surface de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ (un quart de la zone d'intérêt, symétriquement représentatif de l'ensemble du défaut circulaire (voir détails sur la figure II.5)) a été obtenue avec un pas de déplacement de $60 \mu\text{m}$ du microfaisceau de RX.

L'étude menée dans cette thèse est basée sur la caractérisation mécanique des échantillons osseux après régénération partielle et complète (à 2, 4, 6, 8 et 20 semaines de régénération) par essai de traction *in situ* où une corrélation entre la microstructure (densité minérale, vascularité, porosité) et le comportement mécanique (rigidité, déformation) de l'os en reconstruction est effectuée. Le comportement mécanique a été caractérisé *in situ* sur synchrotron sur les lignes P03 de PETRA III DESY (Allemagne – septembre 2017 – stratégie BG), I22 de DIAMOND (Royaume-Uni – janvier 2018 – stratégie BCP + TBM) et ID02 de l'ESRF (France – février 2018 – stratégie BCP). Une dernière campagne à PETRA III en mai 2019 a permis d'analyser l'intégralité des échantillons à 20 semaines pour toutes les stratégies. Le schéma commun du montage expérimental est illustré dans la figure II.5. Étant donné la durée forcément limitée de la thèse et le nombre restreint de jours accordés pour chaque campagne sur ces grands instruments, ces analyses ont donc été nécessairement réalisées sur plusieurs lignes de lumière en fonction des différentes stratégies de régénération étudiées.

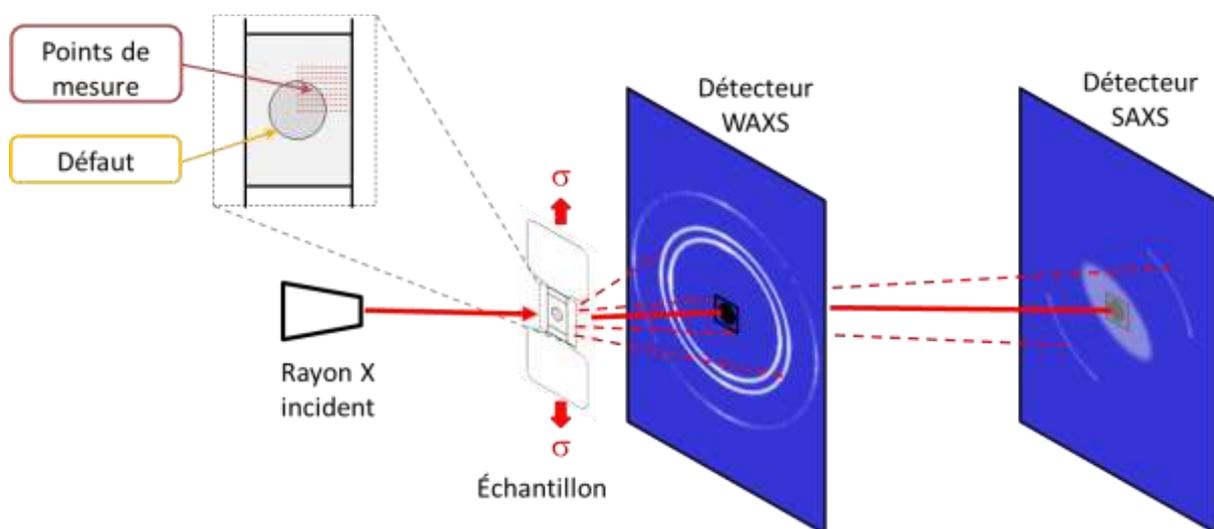


Figure II.5 : Schéma des mesures en transmission SAXS/WAXS dans et autour du défaut pour les différentes campagnes d'analyses sur synchrotron.

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

Néanmoins, le montage expérimental sur les trois lignes de lumière et les techniques de mesure mises en œuvre restent identiques afin d'avoir des résultats comparables entre les différentes stratégies (exemple de montage présenté sur la figure II.6). De plus, des mesures sur os naturel ont été systématiquement réalisées afin d'avoir un point de référence entre les différentes lignes de lumière, assurant de fait la pertinence de la comparaison entre les expériences sur les différentes lignes.

II.3.1.3. Présentation des synchrotrons

Le rayonnement synchrotron est un rayonnement X à haute brillance, produit par l'accélération d'électrons à une vitesse proche de celle de la lumière. La trajectoire circulaire de ces électrons est guidée par un système magnétique (aimants de courbure ou onduleurs) au sein de l'anneau de stockage. Ces électrons émettent un rayonnement électromagnétique tangentiel à leur trajectoire couvrant une gamme d'énergie allant de l'infrarouge (10^{-3} keV) jusqu'au domaine des rayons X durs (100 keV). Dans cette étude, ce sont les rayons X de source synchrotron qui vont nous permettre d'analyser le cristal osseux et nous fournir de nouvelles perspectives dans l'étude de la structure ainsi que de la déformation osseuse à l'échelle nanométrique. La quantification simultanée des propriétés mécaniques des cristaux d'HA et des fibres de collagène a été rendue possible grâce aux différentes campagnes d'analyses WAXS et SAXS sur les lignes P03 de DESY PETRA III (Allemagne), I22 de DIAMOND (Royaume-Uni) et ID02 de l'ESRF (France). Ces expériences ont permis de fournir des informations à l'échelle nanométrique de haute qualité et donc d'assurer la fiabilité des données expérimentales et surtout de diminuer le temps d'exposition des échantillons aux rayonnements ionisants pouvant affecter les tissus analysés.

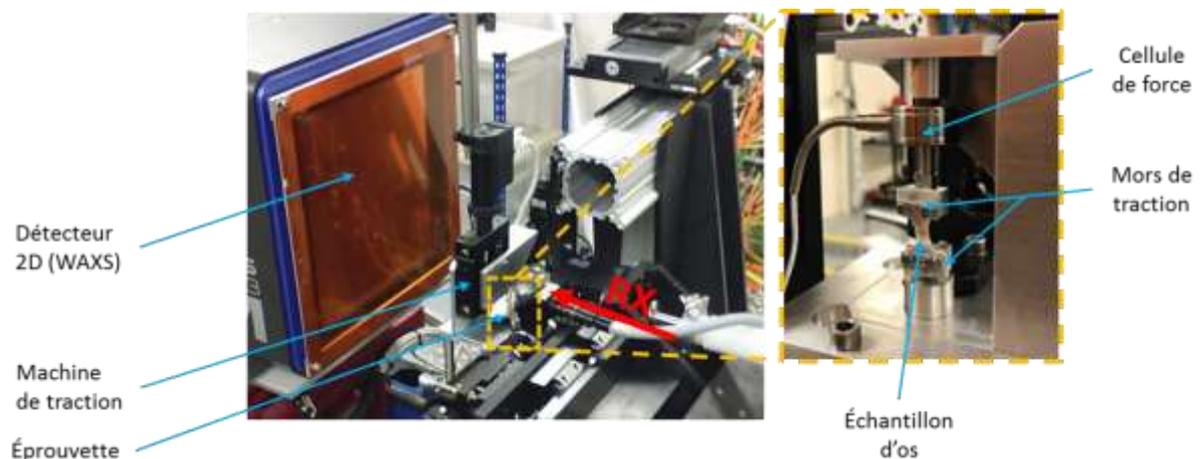


Figure II.6 : Montage expérimental d'un essai de traction *in situ* sur la ligne I22 de DIAMOND.

En plus du montage expérimental et des techniques de mesure voisines (figure II.5) sur les trois lignes de lumière, les caractéristiques des faisceaux sont proches (tableau II.2) et ont permis d'obtenir un volume sondé comparable et des conditions de mesure relativement similaires.

Ligne de lumière	Longueur d'onde	Distance détecteur WAXS	Distance détecteur SAXS	Dimensions du faisceau	Temps d'exposition
I22 DIAMOND	0,9821 Å	135 mm	--	34 × 34 μm ²	1 s
P03 DESY ₁ PETRA III	0,9495 Å	97 mm	4905 mm	16 × 22 μm ²	1 s
P03 DESY ₂ PETRA III	1,0480 Å	147 mm	6050 mm	32 × 32 μm ²	1 s
ID02 ESRF	0,9950 Å	55 mm	2701 mm	38 × 26 μm ²	0,9 s

Tableau II.2 : Caractéristiques des différentes lignes de synchrotron utilisées.

Il est à noter qu'une dernière campagne expérimentale complémentaire pour des rats à 20 semaines de régénération (3 types d'implants et 2 rats par type d'implant) ainsi que pour les rats non opérés a été réalisée sur la ligne P03 de DESY PETRA III avec des caractéristiques légèrement différentes (désignée par P03 DESY₂ PETRA III dans le tableau II.2) de la première campagne d'essais sur cette même ligne. Cette évolution correspond à la mise en place d'un nouveau détecteur SAXS sur cette ligne entre les deux campagnes d'analyses.

II.3.1.4. Diffusion des rayons X appliquée à l'étude des tissus osseux

Les matériaux biologiques tels que l'os sont considérés comme des matériaux composites vivants avec une structure hiérarchique complexe, du nanomètre à l'échelle macroscopique. L'ultra-structure osseuse (ou nano-architecture) est représentée par les constituants élémentaires de l'os tels que les minéraux (cristaux d'HA), l'eau et le collagène. À l'échelle microscopique, l'os est décrit par des travées au niveau de l'os spongieux et par des ostéons qui forment l'os cortical. En raison de sa structure fortement hiérarchique, une combinaison de différentes méthodes d'imagerie et de caractérisation est alors nécessaire afin d'analyser cette architecture complexe ainsi que les états mécaniques associés aux différentes échelles pertinentes (figure II.7). Les observations macroscopiques (millimétriques) et microscopiques (jusqu'à quelques micromètres) peuvent être réalisées par microscopie électronique à balayage alors que les éléments qui mesurent quelques nanomètres sont souvent examinés au microscope électronique en transmission ou par microscopie à force atomique. Parmi ces techniques, la diffusion et la diffraction des rayons X sont souvent utilisées pour étudier des structures atomiques et nanométriques des matériaux biologiques [Dong et Boyd 2011]. Les techniques de diffusion des rayons X sont particulièrement adaptées pour analyser l'ultrastructure osseuse [Rossi et al. 2012]. En effet, elles permettent d'extraire des informations quantitatives de la structure à l'échelle nanométrique ainsi que de caractériser la forme et l'orientation des composants organiques (fibre de collagène) et inorganiques (cristaux d'HA) dans ce matériau.

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

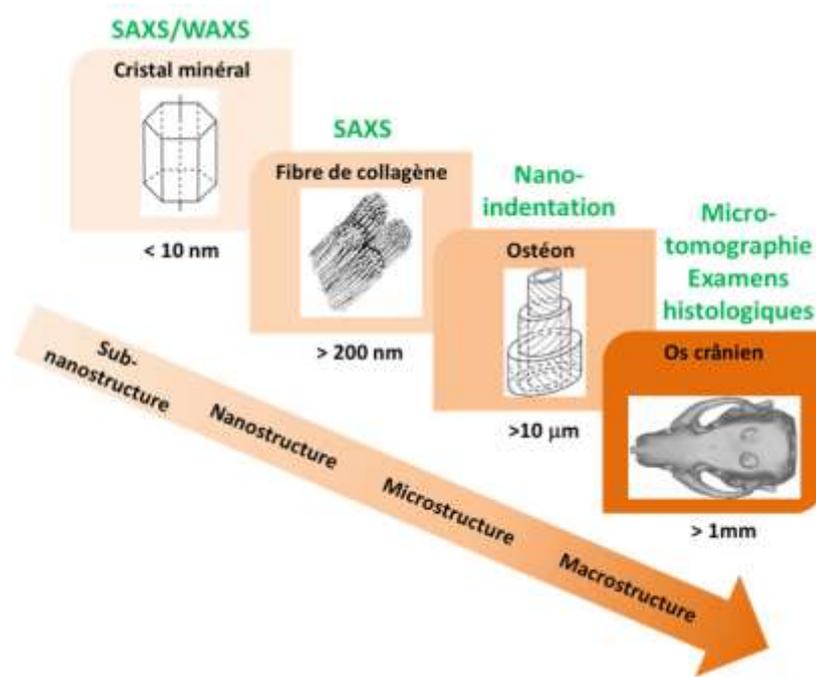


Figure II.7 : Les niveaux hiérarchiques de l'os et les techniques de mesure adaptées à chaque échelle d'analyse.

Dans le cas d'un montage en transmission, un faisceau incident de rayons X guidé vers l'os traverse sa structure fibreuse chargée en minéraux et diffuse. L'interaction des ondes diffusées produit alors des tâches de diffusion (diagramme de diffusion des rayons X) qui sont alors enregistrées sur un détecteur situé à l'arrière de l'échantillon osseux (figure II.6). L'analyse des profils de raies de diffraction mesurées permet d'en déduire des paramètres relatifs à la structure microscopique et nanométrique de l'échantillon. La figure II.7 présente une sélection des niveaux hiérarchiques de l'os et les techniques d'analyse expérimentales correspondantes, adaptées pour la caractérisation mécanique et morphologique de ces constituants. Les techniques complémentaires utilisées dans cette étude permettent d'avoir accès aux différentes échelles de l'os : sub-nanométrique (WAXS/SAXS) ; nanométrique (SAXS) ; micrométrique (nanoindentation) et macroscopique (microtomographie, observations histologiques et essais mécaniques). Le WAXS et le SAXS ont été utilisés pour déterminer l'organisation des particules minérales dans la matrice osseuse [Nakano et al. 2002 ; Ma et al. 2016], leur taille [Zizak et al. 2003 ; Turunen et al. 2016] et leur orientation [Meek et Boote 2009 ; Pabisch et al. 2013]. Des analyses *in situ* ont été également réalisées avec ces techniques pour mieux appréhender les effets d'un chargement mécanique macroscopique spécifique sur les phases organique et minérale [Sasaki et Odajima 1996]. Ceci a permis de mettre en évidence la répartition des champs de déformations et de contraintes [Gupta et al. 2006 ; Barber et al. 2013] dans les cristaux minéralisés (WAXS). WAXS et SAXS sont donc deux techniques complémentaires dont la différence fondamentale est l'échelle de grandeur à laquelle elles s'adressent [Boskey 2006a]. En effet, le WAXS détecte le réseau cristallin de l'HA et le SAXS sonde des structures plus grandes. Basée sur la périodicité de l'arrangement des cristaux d'HA logés entre les fibres de collagène [Wagermaier et al. 2016], le SAXS permet de déterminer les paramètres de forme et de taille des éléments structuraux

de l'os (échelle de quelques dizaines de nanomètres : cristaux d'apatites et fibres de collagène).

a. Analyse par diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS)

Loi de Bragg : détermination des distances interréticulaires

La diffusion cohérente des rayons X aux grands angles permet de sonder la nature de la partie cristalline des matériaux. En effet, puisque l'arrangement atomique dans les cristaux d'apatite est périodique, le faisceau incident d'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde adaptée est diffracté par une famille de plans cristallographiques $\{hkl\}$. Lorsqu'un matériau est exposé à un rayonnement X, seule une partie de l'échantillon reçoit le faisceau de rayons X : c'est le volume irradié. À l'intérieur de ce volume, seules les cristallites dont l'orientation est favorable vont diffracter. Ce sont les cristallites en position de diffraction qui constituent ce que l'on appelle le volume diffractant. Ce volume est non connexe et varie avec la direction de mesure. Les techniques de diffraction permettent seulement l'analyse des domaines périodiques du matériau. Or, la périodicité du cristal est altérée par les discontinuités du matériau qui délimitent des volumes élémentaires sans défauts appelés domaines cohérents de diffraction (ou cristallites). La contribution de ces cristallites présentes dans l'os (matériau semi-cristallin) mène à la formation de taches de diffraction caractéristiques de la structure cristalline sondée, et dont la répartition en intensité dans l'espace réciproque, informe sur la distribution dans l'espace réel des orientations cristallines. Une répartition aléatoire des orientations cristallines mènera par exemple à la formation d'un anneau continu d'intensité constante sur le diagramme. Chaque anneau correspond à une famille de plans cristallographiques $\{hkl\}$. La diffraction aura lieu si l'angle du faisceau incident, de longueur d'onde λ , satisfait la relation de Bragg définie par l'équation (II.1) :

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta_{hkl} \quad (\text{II.1})$$

Ici d_{hkl} est la distance interréticulaire associée à la famille de plans $\{hkl\}$, c'est-à-dire la distance entre deux plans cristallographiques d'une même famille $\{hkl\}$; θ_{hkl} est l'angle de Bragg correspondant à l'angle formé par le faisceau incident et une famille de plans cristallographiques $\{hkl\}$; n étant l'ordre de diffraction (nombre entier) et λ , la longueur d'onde des rayons X.

Quantification des déformations dans les cristaux d'HA

L'évolution de l'état de contrainte se traduit par une variation de la distance interréticulaire des plans cristallographiques (figure II.8) se traduisant à son tour par une modification de l'angle de diffraction. On utilise donc le réseau cristallin comme jauge de la déformation élastique.

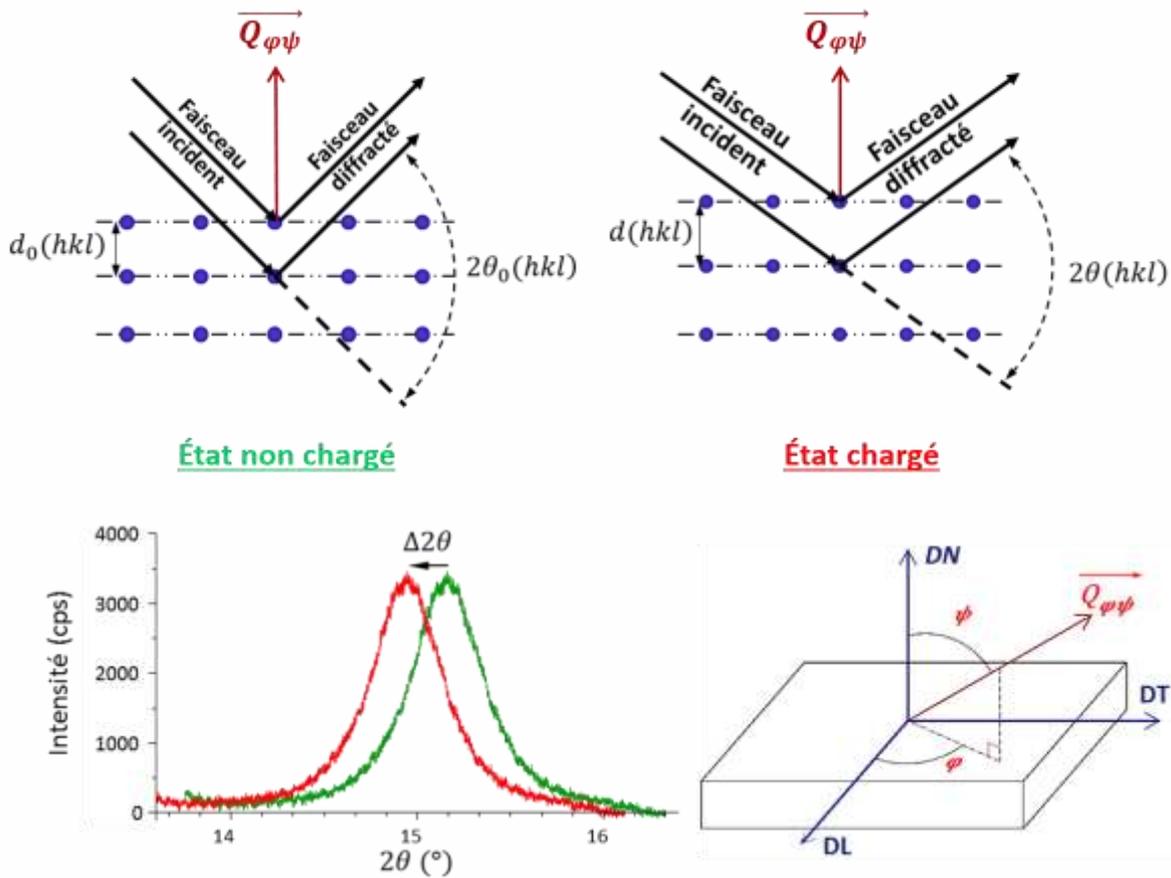


Figure II.8 : Principe de mesure des déformations par diffraction des rayons X.

La déformation moyenne $\langle \varepsilon(hkl, \varphi, \psi) \rangle_{V_d}$ dans le volume diffractant V_d sondé pour une direction de mesure donnée, repérée par les angles (φ, ψ) (définis par rapport à la direction normale DN, transversale DT et longitudinale DL d'un repère lié à l'échantillon, présentés dans la figure II.8), est déterminée à partir de la variation de distance entre l'état non chargé (ou état de référence) $d_0(hkl, \varphi, \psi)$ et l'état chargé $d(hkl, \varphi, \psi)$. En considérant la définition rationnelle de la déformation [He 2018], cette dernière [Tadano et Giri 2012], peut être reliée aux angles de diffraction (θ_0 pour l'état de référence et θ pour l'état contraint) à travers la loi de Bragg par :

$$\langle \varepsilon(hkl, \varphi, \psi) \rangle_{V_d} = \ln \left(\frac{d(hkl)}{d_0(hkl)} \right) = \ln \left(\frac{\sin \theta_0(hkl, \varphi, \psi)}{\sin \theta(hkl, \varphi, \psi)} \right) \quad (II.2)$$

La variation de distance entre l'état de référence $d_0(hkl, \varphi, \psi)$ et l'état chargé $d(hkl, \varphi, \psi)$ est donc traduite par un décalage dans la position angulaire du pic $\{hkl\}$ entre les deux états de contraintes (figure II.8).

Pour quantifier la déformation à l'échelle des cristaux d'HA dans cette étude, le pic $\{002\}$ ($2\theta \approx 15^\circ$) a été choisi du fait qu'il est intense et bien défini. Les données expérimentales ont été traitées avec les logiciels DAWN (version 2.8, DIAMOND, UK) et DPDAK (version 4.0, DESY PETRA III) pour le calcul de la déformation, du paramètre d'orientation H et du paramètre T

(épaisseur des cristaux). Pour le calcul de déformation des cristaux, les anneaux de diffraction obtenus en WAXS (figure II.9.a) ont tout d'abord été convertis en diffractogrammes 1D (intensité vs. angle de diffraction : figure II.10) par intégration azimutale (sur un arc de 20°, résultant d'un compromis entre la définition de la direction de mesure et la résolution de la position du pic de diffraction). La position du pic de diffraction obtenue donne des informations sur les distances interréticulaires (loi de Bragg), donc sur la déformation des cristaux d'HA. À titre d'exemple, la figure II.9.b montre une cartographie des positions angulaires du pic {002} obtenues par WAXS dans la direction de sollicitation mécanique sur un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par greffe osseuse, sur une surface de 2 × 2 mm² (un quart de la zone d'intérêt). Les cartographies de positions de pic pour chaque état de contrainte nous ont permis de calculer la déformation des cristaux d'HA correspondante grâce à la relation (2).

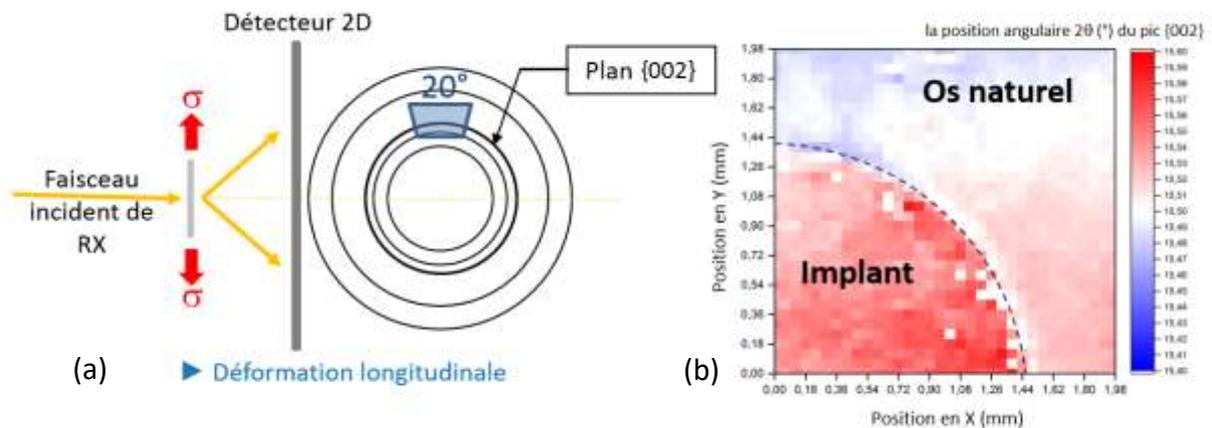


Figure II.9 : (a) Zone d'intégration ; (b) cartographie des positions du pic {002} d'HA obtenus par WAXS sur un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par greffe osseuse, dans et autour du défaut (délimité par des pointillés).

Il est à noter que le diffractogramme brut (courbe pointée de la figure II.10) issu de l'intégration azimutale a été traité mathématiquement, à l'aide du logiciel Wolfram Mathematica, afin de récupérer la position des pics. Une première approche consiste à soustraire le bruit de fond, modélisé par une fonction polynomiale d'ordre 2 définissant le fond continu autour des pieds du pic. Ensuite, le pic de diffraction a été ajusté à l'aide d'une fonction analytique. La fonction pseudo-Voigt a été utilisée car elle permet une bonne description des profils de raies de diffraction des RX. Elle est une combinaison d'une fonction de Gauss (G) et d'une fonction de Lorentz (L) :

$$PV(H, B, p, \eta, x) = (1 - \eta)L(H, B, p, x) + \eta G(H, B, p, x) \quad (II.3)$$

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

Avec p , la position du pic ; B , la largeur intégrale ; H , la hauteur nette du pic ; η , la proportion de la partie gaussienne (comprise entre 0 et 1). Les fonctions G et L sont données sous la forme :

$$G(H, B, p, x) = H \exp\left(-\pi \left(\frac{x-p}{B}\right)^2\right) \quad (II.4)$$

$$L(H, B, p, x) = \frac{H}{1 + \left(\pi \frac{x-p}{B}\right)^2} \quad (II.5)$$

La figure II.10 illustre, à titre d'exemple, l'ajustement du pic {002} pour l'un des échantillons de l'étude (figure II.10.a : détermination du bruit de fond, figure II.10.b : ajustement par la fonction pseudo-Voigt) permettant la détermination de la position du pic.

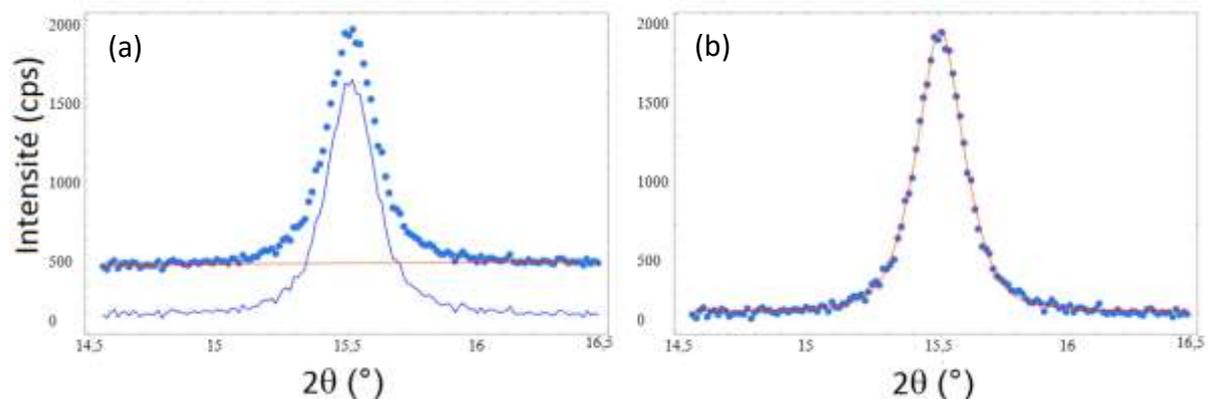


Figure II.10 : Diffractogramme 1D (Intensité vs. Angle de diffraction) du pic {002} obtenu par WAXS sur un échantillon d'os naturel dans un point de mesure, (a) soustraction du bruit de fond ; (b) ajustement des données sans bruit de fond par la fonction pseudo-Voigt.

Facteur d'Hermans H : détermination de l'orientation préférentielle des cristaux

L'os est un matériau hautement structuré dans lequel les cristaux ne sont pas répartis et orientés aléatoirement dans sa matrice, expliquant la forte anisotropie de son comportement mécanique vue aux différentes échelles de sa hiérarchie [Yamada et al. 2013]. L'orientation préférentielle des cristaux d'apatite dans la matrice osseuse a fait l'objet de plusieurs études [Nakano et al. 2002 ; Liu et al. 2010 ; Fujisaki et al. 2012 ; Nakano et al. 2012 ; Pabisch et al. 2013 ; Hoerth et al. 2014 ; Turunen et al. 2016]. L'apatite présente une structure cristallographique hexagonale dont la direction $\langle 002 \rangle$ (l'axe c ou le grand axe) est orientée préférentiellement le long de l'axe des fibrilles de collagène. Par conséquent, l'orientation des cristaux/fibrilles peut être obtenue à partir de l'analyse du pic de diffraction {002} en WAXS. La répartition des orientations de l'axe c des cristaux minéralisés est alors donnée par la distribution d'intensité le long de l'anneau de diffraction correspondant à la réflexion {002} (la distribution de l'intensité selon l'angle azimutal γ de l'anneau (figure II.11.a)).

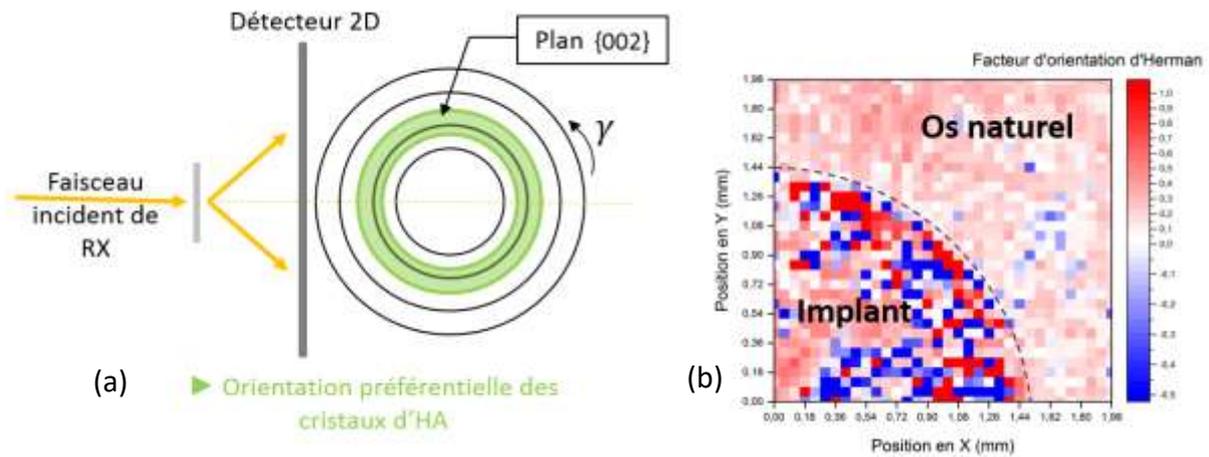


Figure II.11 : (a) Principe de la diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS) de l'os ; (b) cartographie du facteur d'orientation d'Hermans obtenu par WAXS sur un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par greffe osseuse, dans et autour du défaut (délimité par des pointillés).

L'une des conséquences d'une orientation préférentielle des cristaux d'HA sur les anneaux de diffraction est un renforcement d'intensité dans certaines directions (figure II.11.a). Afin de décrire et quantifier l'orientation des cristaux dans la matrice osseuse par WAXS [Pabisch et al. 2013 ; Wagermaier et al. 2016 ; Donnay et al. 2017], un facteur d'orientation, appelé facteur d'Hermans, a alors été introduit [Hermans et Weidinger 1948 ; Ponçot et al. 2015]. Ce facteur, noté par la suite H, permet de quantifier l'orientation relative d'une direction cristallographique donnée x (<002> par exemple) par rapport à une direction de référence fixe prise dans le repère de l'échantillon (par exemple, l'axe de chargement). L'expression mathématique de H est donnée par la relation suivante :

$$H = \frac{3\langle \cos^2(a) \rangle - 1}{2} \quad (II.6)$$

Avec a, l'angle défini par les directions x et t.

$$\langle \cos^2(a) \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} I \cos^2 \gamma \times \sin \gamma \times d \gamma}{\int_0^{\pi/2} I \times \sin \gamma \times d \gamma} \quad (II.7)$$

I est l'intensité de diffraction d'un pic {hkl} pour un angle azimutal donné γ .

La valeur du facteur d'Hermans varie alors entre -1/2 et 1 :

H = -1/2 : l'orientation des cristaux est perpendiculaire à l'orientation de référence.

H = 0 : l'orientation des cristaux présente une distribution isotrope dans l'espace (intensité uniforme sur l'anneau).

H = 1 : l'orientation des cristaux est parallèle à l'orientation de référence.

L'orientation préférentielle des cristaux par rapport à l'axe de traction, au cours de la régénération sera donc donnée, par le facteur d'orientation d'Hermans. À titre d'exemple, la figure II.11.b montre la distribution de l'orientation des cristaux d'HA, dans et autour du

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

défaut (sur une surface de $2 \times 2 \text{ mm}^2$), d'un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par greffe osseuse.

b. Analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

L'os présente un caractère composite défini par deux phases (minérales et organiques) à l'échelle nanométrique, ce qui donne naissance à un signal SAXS. L'intensité du signal SAXS est basée sur les différences marquées de densité électronique sur la nanostructure de l'os [Rinnerthaler et al. 1999 ; Sasaki et al. 1999]. La périodicité d'une phase spécifique de l'os mène à des pics en SAXS [Meek et Boote 2009]. En effet, la variation de la densité des électrons est principalement due à celle qui est présente entre la phase minérale et la matrice organique (fibre de collagène) puisque les cristaux d'apatite sont logés entre les rangées des fibres d'une manière périodique et bien organisée (figure II.12). Le diagramme typique SAXS de l'os consiste donc en un signal anisotrope diffus et une série de pics résultant de la périodicité axiale de la disposition des cristaux d'HA dans les espaces intrafibrillaires de collagène [Wagermaier et al. 2016]. La distribution axiale de ces pics est caractérisée par une période D (paramètre de structure déterminé par Rho *et al.* en 1998 [Rho et al. 1998 ; Boskey 2006a]).

Généralement, les mesures SAXS sont utilisées pour obtenir des informations sur la distribution spatiale des fibres de collagène [Meek et Boote 2009 ; Karunaratne et al. 2012b] donnée par l'orientation préférentielle et la dispersion par rapport à cette orientation, sur l'épaisseur des cristaux d'HA (donnée par un paramètre noté T) [Fratzl et al. 1991a ; Fratzi and Hospital 1996 ; Rinnerthaler et al. 1999 ; Turunen et al. 2016 ; He et al. 2017] ainsi que sur la déformation dans la phase organique [Gupta et al. 2005 ; Gupta et al. 2006 ; Karunaratne et al. 2012a]. Dans cette étude, les expériences SAXS sur l'os régénéré nous permettront de suivre l'évolution du paramètre T au cours de temps. Vu que l'orientation des fibres est fortement corrélée à l'orientation des cristaux d'HA, le paramètre d'orientation H , déterminé par WAXS, nous permettra de déduire la direction préférentielle des fibres. La déformation du collagène n'a pas été quantifiée dans cette étude, car seul le premier ordre de diffusion a pu être détecté. Le signal étant alors très proche du faisceau direct, des erreurs importantes apparaissent dans la détermination de la position du pic et donc dans la quantification de la déformation. De plus, le niveau de chargement macroscopique appliqué relativement faible induit des déplacements de pic en SAXS difficiles à quantifier de manière fiable.

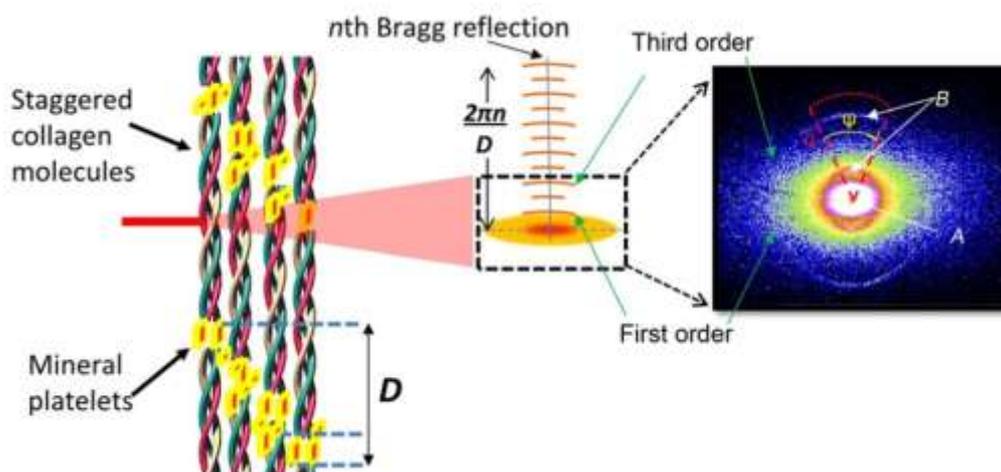


Figure II.12 : Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles des fibres de collagène [Karunaratne et al. 2012a].

L'épaisseur des particules minérales : paramètre T

En tant que matériau biphasé, l'information sur l'épaisseur moyenne des particules minérales dans l'os peut être obtenue de la décroissance du signal de diffusion autour du faisceau transmis par rapport à l'intensité totale diffusée, au travers du paramètre T, grâce à la loi de Porod [Fratzl et al. 1991 ; Fratzl 1994]. Le vecteur de diffusion \vec{q} est défini comme la différence entre le vecteur incident et le vecteur diffusé.

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (II.8)$$

L'intensité SAXS $I(q)$ d'un système isotrope ne dépend que de q. Dans ce cas, l'os est considéré comme un système à deux phases : organique et minérale. Cette dernière est représentée par des cristaux minéralisés individuels sous forme d'aiguilles ou de plaques fines. L'intensité SAXS moyenne peut être alors donnée par la relation suivante :

$$I(q) = I_0 T^3 F(qT)(1 + G(q)) \quad (II.9)$$

I_0 est une constante dépendante de la densité minérale, F, un facteur de forme (ici la forme des cristaux : plaques fines), G, une fonction d'interférence entre les centres des cristaux et T, une mesure de la taille moyenne des cristaux définie par :

$$T = \left(\frac{4\Phi(1-\Phi)}{S} \right) \quad (II.10)$$

Φ est la fraction volumique des cristaux minéralisés et S, la surface des particules minéralisées par unité de volume de tissu.

Si on assume que la phase minérale a la forme d'un parallélépipède uniforme de dimensions a, b et c, alors l'expression de T se simplifie et devient :

$$T = 2(1 - \Phi) \left(\frac{abc}{ab+bc+ac} \right) \quad (II.11)$$

La phase minérale est composée à environ 85 % par le phosphate de calcium cristallisé sous la forme de minces cristaux (plaquettes ou aiguilles) d'hydroxyapatite [Rho et al. 1998 ; Boskey 2006b]. Les cristaux d'HA de l'os sont généralement sous forme de plaquettes de petites tailles (20 à 50 nm de longueur, 12 à 20 nm de largeur et de 2 à 5 nm d'épaisseur). Il est donc possible de simplifier l'équation du paramètre T en supposant que $a \ll b, c$. On a alors :

$$T = 2a(1 - \Phi) \quad (II.12)$$

Pour l'os, on suppose que Φ est égale à 0,5 [Rinnerthaler et al. 1999]. En effet, la matrice extracellulaire est composée de 60 à 70 % d'une phase minérale inorganique constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite. Le paramètre T désigne alors directement l'épaisseur moyenne a des cristaux.

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

La détermination du paramètre T par les mesures SAXS est réalisée à travers la loi de Porod. En effet, pour un tel système à deux phases (organique et minérale) [Bünger et al. 2010], l'intensité de diffusion $I(q)$ suit la loi de Porod pour les valeurs de q importantes.

$$I(q) = B + \frac{P}{q^4} \quad (II.13)$$

B est le fond continu résultant de la diffusion incohérente et inélastique et P, la constante de Porod.

$$P = \lim_{q \rightarrow \infty} q^4 I(q) \quad (II.14)$$

La constante de Porod peut, quant à elle, être déterminée graphiquement, grâce à la partie linéaire de la courbe Iq^4 en fonction de q^4 définie par les bornes $q_{\text{porod min}}^4$ et $q_{\text{porod max}}^4$ (figure II.13.c). En effet entre ces deux bornes, on a $Iq^4 = Lq^4 + P$; avec L, une constante, appelée constante de Laue.

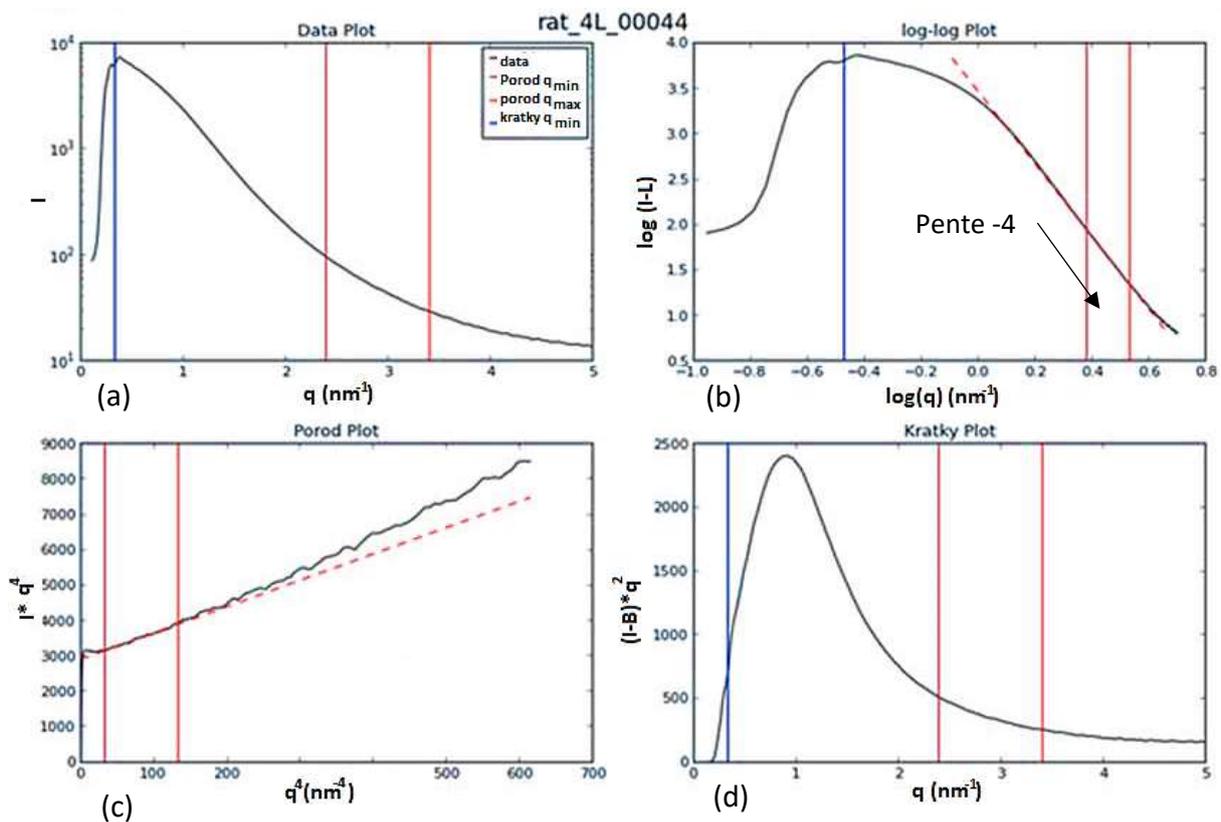


Figure II.13 : Courbes nécessaires au calcul des paramètres de Porod et Kratky qui interviennent dans le calcul du paramètre T (capture d'écran de l'interface de DPDAK pour le calcul de T).

L'information sur l'épaisseur moyenne des particules minérales dans l'os peut être dérivée de la décroissance du signal de diffusion (pour de grandes valeurs de q) et de l'intensité totale diffusée, à travers le paramètre T :

$$T = \frac{4}{\pi P} \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq \quad (II.15)$$

Ici, l'intégrale $\int_0^{\infty} q^2 I(q) dq$ constitue la constante de Kratky.

La représentation de Kratky (figure II.13.d), dérivée du diffractogramme SAXS (intensité I vs. q , figure II.13.a), permet donc de calculer cette intégrale (constante de Kratky) en fonction des valeurs de q .

Après l'obtention des constantes de Porod et de Kratky, T peut donc être calculé. La vérification de la loi de Porod en q^4 dans le domaine défini par $q_{\text{porod min}}^4$ et $q_{\text{porod max}}^4$ est réalisée grâce à la représentation $\log(I - L)$ en fonction de $\log(q)$ (figure II.13.b). En effet, pour q grand, $(I - L) = Pq^{-4}$ et donc $\log(I - L) = \log(q) - 4 \log(P)$. Une pente de -4 dans le domaine de Porod (figure II.13.b) valide la loi de Porod en q^4 .

De la même manière que pour les analyses WAXS et pour les mêmes points de mesure, les analyses SAXS nous permettent donc d'avoir des cartographies présentant une estimation de l'épaisseur des cristaux d'HA sur la surface d'étude ($2 \times 2 \text{ mm}^2$). La figure II.14 présente, à titre d'exemple, une cartographie du paramètre T (épaisseur des cristaux d'HA) d'un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par une greffe osseuse.

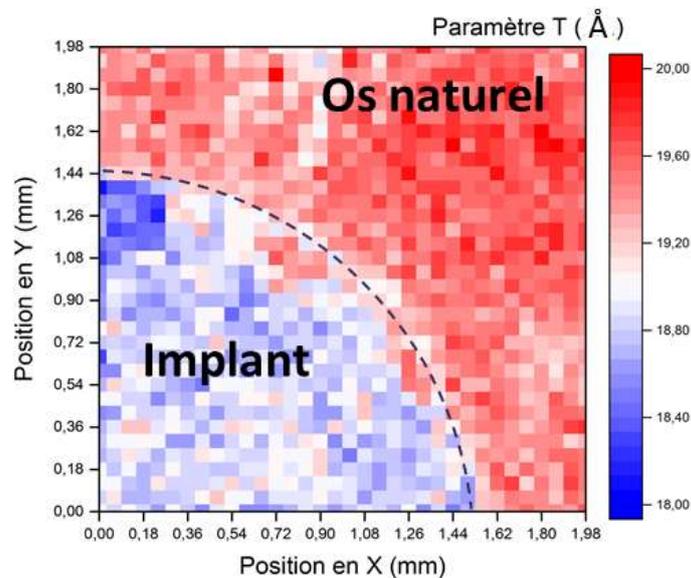


Figure II.14 : Cartographie du paramètre T (épaisseur des cristaux d'HA) obtenue par SAXS d'un échantillon à 2 semaines de régénération pour un défaut comblé par greffe osseuse, dans et autour du défaut (délimité par des pointillés).

II.3.2. Nanoindentation

II.3.2.1. Préparation des échantillons de nanoindentation

Pour comprendre les propriétés mécaniques du tissu osseux, il est important de connaître les propriétés mécaniques de chacune des phases qui le composent ainsi que leurs interactions à toutes les échelles de sa structure. Ceci passe par l'étude du comportement mécanique des éléments structuraux tels que les cristaux d'apatite (WAXS) ou les fibres de collagène (SAXS), et de leurs associations aux différentes échelles caractéristiques du tissu osseux, principalement les lamelles et les ostéons. Dans ce cadre, nous avons utilisé la nanoindentation qui est une technique de caractérisation mécanique locale complémentaire à celles déjà mises en œuvre sur synchrotron et en laboratoire (essais mécaniques macroscopiques) afin de compléter l'information extraite. La quantification des propriétés élastiques de l'os à une échelle structurale intermédiaire (i.e. les ostéons [Rho et al. 1997 ; Zysset et al. 1999 ; Bensamoun et al. 2008 ; Rho et al. 2008]) entre les essais de traction macroscopiques et les analyses sur synchrotron a été réalisée grâce à des mesures par nanoindentation suivant la direction longitudinale des éprouvettes (correspondant à l'axe de traction des essais *in situ* et macroscopique, figure II.15). Ces essais ont été réalisés en collaboration avec le Pr. Éric Le Bourhis de l'équipe Surfaces, Interfaces et MATériaux sous Contrainte (SIMAC) de l'institut P' de Poitiers.

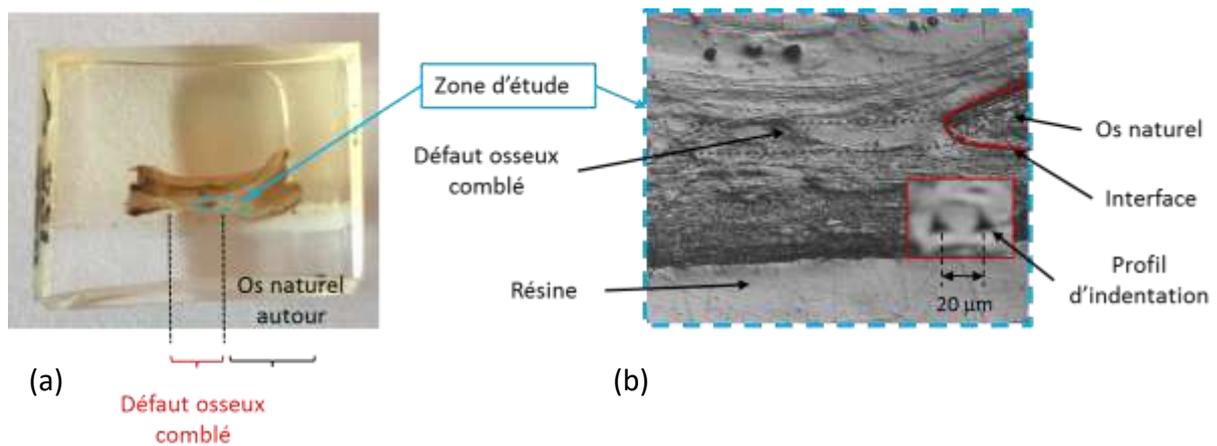


Figure II.15 : (a) Échantillons de nanoindentation ; (b) image de la zone d'étude avec les points de mesure.

Les mesures de nanoindentation ont été réalisées seulement sur les échantillons à 8 et 20 semaines de régénération pour se focaliser principalement sur les temps de régénération les plus élevés. Ce choix des temps longs de régénération a été discuté après l'analyse des résultats mécaniques en traction et les observations histologiques de l'os régénéré pour les différents stades de réparation. En effet, le tissu néoformé à des temps plus courts (2, 4, et 6 semaines) est majoritairement sous forme de tissu inflammatoire ou ostéoïde (fibreux) qui ne possède pas encore une résistance mécanique.

Les héli-calvarias (figure II.15.a) récoltées ont été moulées dans une résine polyméthacrylate de méthyle (PMMA) rigide et transparente. Après polymérisation complète, les échantillons ont été découpés au centre des défauts pour analyser la tranche de ceux-ci. La préparation de surface des échantillons d'os a été effectuée par un polissage mécanique (utilisation de grades progressifs de papiers de carbure de silicium pour la rectification de la surface, complétée par une étape de polissage par pâte diamantée).

II.3.2.2. Protocole de la nanoindentation

La nanoindentation instrumentée est une technique permettant l'évaluation des propriétés mécaniques des matériaux classiques et biologiques à différentes échelles (micro/nano). Le principe consiste à contrôler la pénétration d'une pointe (ici de type Berkovich) dans la matière lors de l'application de faibles charges grâce à des instruments dédiés [Le Bourhis et Patriarche 2003]. L'appareillage nécessaire aux essais de nanoindentation est présenté sur la figure II.15.a. Il se décompose en trois parties principales :

- Un indenteur de géométrie spécifique (pyramidal, sphérique, conique...) monté dans une colonne rigide à travers laquelle la force est transmise.
- Une machine pour appliquer la force.
- Un capteur pour mesurer les déplacements de l'indenteur.

Dans cette étude, l'essai consiste à charger jusqu'à une valeur maximale F_m de 10 mN à une vitesse de $0,33 \text{ mN}\cdot\text{s}^{-1}$, à maintenir la charge pendant 30 secondes et à décharger à zéro à une vitesse de $0,33 \text{ mN}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les mesures de nanoindentation ont été effectuées sur la surface de coupe longitudinale de l'éprouvette, au niveau du défaut. Les sollicitations mécaniques sont donc réalisées suivant la direction des ostéons (correspondant à l'axe de traction des essais *in situ* et macroscopique). Cinquante indentations ont été réalisées suivant une ligne entre la partie de l'os régénéré (l'implant) et la partie de l'os naturel (avec un pas de $20 \mu\text{m}$) afin de caractériser mécaniquement le processus de régénération osseuse et mettre en lumière la fonction de l'interface à l'échelle des lamelles et des ostéons : particules de l'implant (BCP ou greffe osseuse)/os néoformé autour ; défaut comblé/os naturel autour.

Les données expérimentales se présentent sous la forme de courbes de charge/décharge en fonction de la profondeur d'indentation (déplacement), comme il est présenté sur la figure II.16.c. La séparation des courbes charge/décharge sur la figure II.16.c est induite par les déformations irréversibles générées dans l'éprouvette au cours de l'essai d'indentation [Le Bourhis 2014].

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

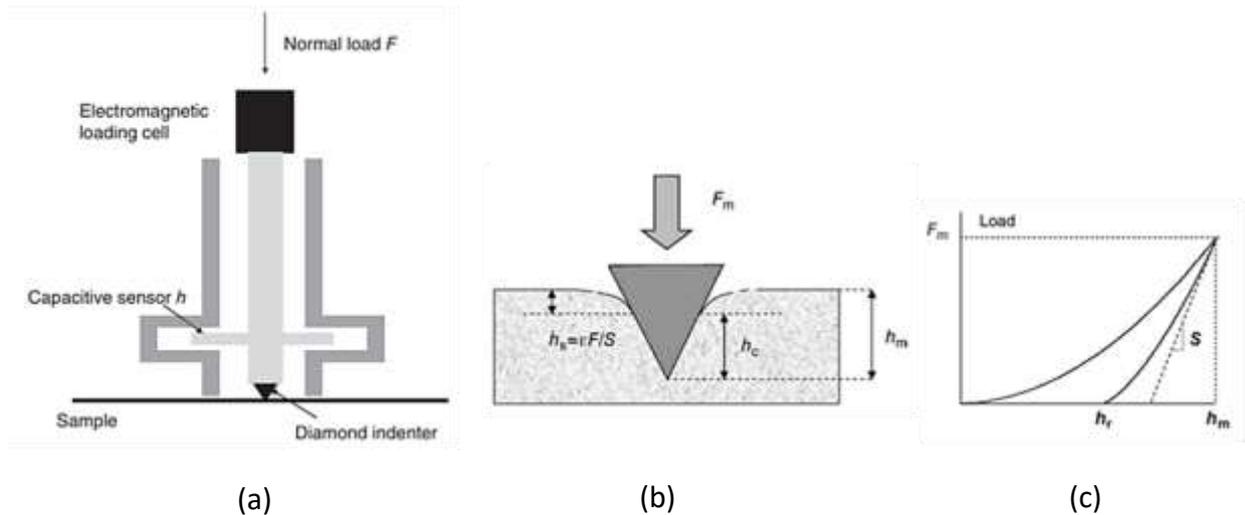


Figure II.16 : Principe de l'indentation instrumentée. (a) schéma de la machine d'indentation à charge contrôlée ; (b) schéma d'un profil d'indentation ; (c) courbe charge/décharge d'un échantillon déformé plastiquement au cours du chargement [Le Bourhis 2014].

La machine d'indentation utilisée est à charge contrôlée. En effet, la pointe étant fixée à une bobine (par champ magnétique), le contrôle de l'intensité du courant traversant la bobine permet de contrôler la force appliquée. La pointe diamantée est de type Berkovich à trois faces permettant une meilleure définition de la zone de contact A_c . Cette surface est définie par :

$$A_c = 24.5 h_c^2 \quad (II.16)$$

Comme l'indique la figure II.15.b, la pointe pénètre l'échantillon jusqu'à h_m et la profondeur de contact entre l'échantillon et la pointe est désigné par h_c . On suppose ici que l'échantillon se déforme élastiquement autour de la zone de contact A_c (lors du déchargement, la surface environnante revient à sa position initiale).

La dureté H est calculée comme la pression moyenne (extraite des courbes charge/décharge (figure II.15.c) selon la méthode d'Oliver et Pharr [Oliver et Pharr 1992]) sur le contact et est donnée par la relation suivante :

$$H = F_m/A_c \quad (II.17)$$

Le module E_r de l'échantillon est déduit à partir du module E^* du composite formé par l'échantillon et la pointe en diamant. E^* est calculé à partir de la rigidité à la pénétration maximale, S :

$$S = \frac{dF}{dh} = 2\beta E^* \sqrt{\frac{A_c}{\pi}} \quad (II.18)$$

β est un facteur de correction qui est égal à 1,034 pour les pointes Berkovich utilisées dans cette étude. E^* du composite est donné par la relation :

$$1/E^* = 1 - \nu_i^2/E_i + 1 - \nu_s^2/E_s \quad (II.19)$$

Ici E et ν sont le module d'Young et le coefficient du Poisson du diamant (indice i) et du matériau analysé (indice s). Le module d'indentation E_r est donc donné par :

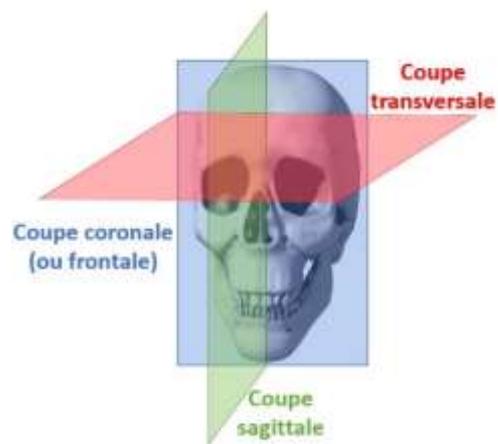
$$1/E_r = 1 - \nu_s^2/E_s \quad (II.20)$$

II.3.3. Évaluation micro architecturale et activité biologique de l'os régénéré

II.3.3.1. Micro-tomographie X (Micro-computed Tomography : micro-CT)

La microtomographie X est une technique d'imagerie 3D par rayonnement X adaptée à l'étude du tissu osseux *ex vivo* sur biopsies osseuses et *in vivo* sur animaux anesthésiés [Petite 2002 ; Bléry et al. 2014]. En effet, cette technique consiste à enregistrer l'image projetée d'un objet par des rayons X sous différents angles (pris par incréments sur une rotation totale de 180° ou 360° : figure II.17). Un logiciel idoine synthétise une pile de sections virtuelles en coupes transversales à travers l'objet (figure II.17). Ces images sont ensuite converties mathématiquement en image 3D.

Le système tomographique utilisé dans cette étude (Skyscan 1272, Aartselaar, Belgique) se compose d'un tube de rayon X micro-foyer scellé, refroidi à l'air et d'une caméra CCD. Cette technologie permet des analyses à la fois qualitatives et quantitatives, mais uniquement sur des échantillons prélevés, fixés ou non. Dans notre étude, les calvarias ont été prélevés au moment du sacrifice puis fixés dans de l'alcool à 70 %. L'acquisition a été réalisée après fixation, avant leur inclusion dans la résine pour les analyses histologiques et mécaniques ultérieures. Les projections radiographiques ont été acquises à 70 kV et 142 μ A avec un temps d'exposition de 860 ms et un filtre en aluminium de 0,5 mm. Une moyenne de dix images a été calculée pour chaque incrément de rotation de 0,5° afin d'augmenter le rapport signal/bruit. Les images 3D ont été reconstruites avec une taille moyenne de voxel de 6 μ m, en utilisant le logiciel de reconstruction du fabricant (NRecon, Skyscan). Le logiciel DataViewer (Skyscan) a été ensuite utilisé pour réaligner les échantillons mal orientés et réaliser des coupes coronales, transversales et sagittales virtuelles.



II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

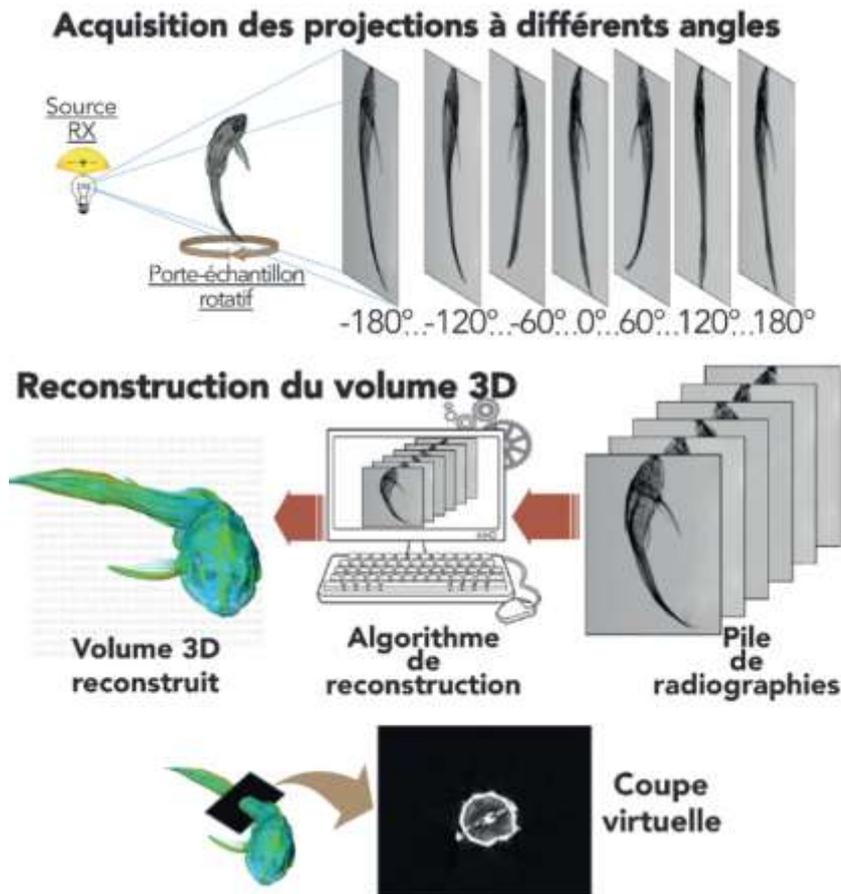


Figure II.17 : Principe de la tomographie : illustration issue du centre européen de recherche et d'enseignement des géosciences de l'environnement (cerge.fr).

Pour l'analyse quantitative, le logiciel résident (CTAn, Skyscan) a été utilisé pour définir la région d'intérêt (Region Of Interest (ROI)) dans laquelle sera faite la quantification et calculer le volume osseux trabéculaire (BV/TV : volume osseux = Bone Volume/volume total de tissu = Tissu Volume) qui représente le pourcentage du volume osseux (BV) sur le volume total du tissu (TV) (figure II.18). L'os régénéré dans le défaut de 3 mm a été séparé de l'os autour par sélection automatique du ROI sur ces images (des disques de 2,8 mm de diamètre centré sur le défaut). Les images du modèle 3D ont ensuite été reconstruites et fusionnées à partir de la pile de sections avec le logiciel résident (CTVol, Skyscan).

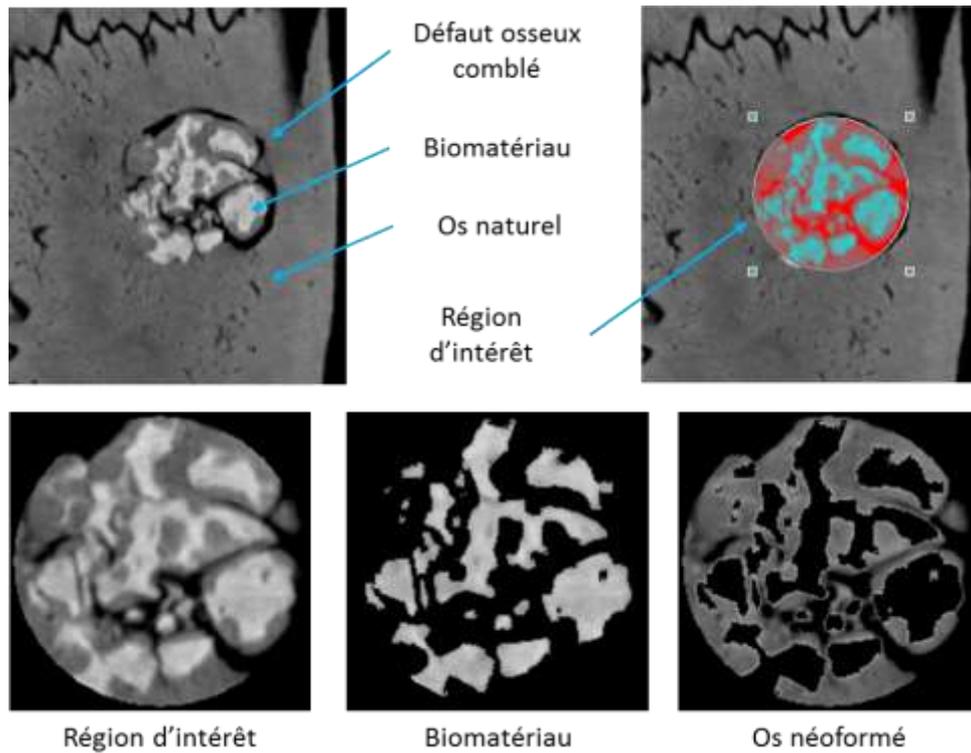


Figure II.18 : Seuillage d'image de microscan pour la quantification de la formation osseuse.

Une fois la région d'intérêt choisie, une analyse d'image par seuillage des niveaux de gris est ensuite réalisée en utilisant le logiciel CT-AN. À titre d'exemple, la figure II.18 montre une segmentation par niveaux de gris pour l'image de ROI d'un échantillon comblé par le mélange de BCP et de moelle osseuse à 8 semaines de régénération. Le seuillage ici nous a permis de distinguer les zones relatives au BCP utilisé pour la régénération de l'os néoformé au sein de la zone d'intérêt. Cette opération sera effectuée automatiquement sur toutes les images qui constituent l'image 3D afin de calculer au final un volume d'os néoformé et/ou de biomatériaux.

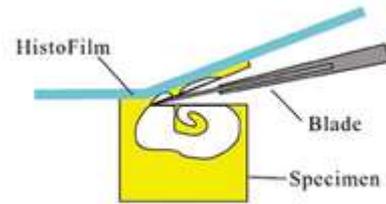
II.3.3.2. Examens histologiques

L'histologie permet de visualiser, en fonction des colorants utilisés, les structures, cellules et matrice présentes sur coupes de tissu fixé et inclus dans une résine. Cette technique permet d'étudier la structure des tissus à tous les niveaux, de l'organe entier aux composants moléculaires des cellules [Daculsi et al. 2008 ; Corre et al. 2013].

Immédiatement après le prélèvement, les calvarias ont été fixés dans l'éthanol à 70 % afin de conserver les structures collagéniques, minérales et cellulaires et d'éviter le durcissement du tissu. L'analyse histologique a été réalisée sur des coupes réalisées sur les hémicalvarias gauches des rats opérés. Les prélèvements fixés ont ensuite été inclus en résine de méthyl méthacrylate (Technovit®9100 ; Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). La polymérisation de la résine étant exothermique, l'étape d'imprégnation et d'inclusion du tissu osseux dans la résine a été réalisée à froid (4°C) afin de préserver l'activité enzymatique de la TRAP (Phosphatase acide résistante au tartrate, marqueur de l'ostéoclaste). Le méthyl méthacrylate est une résine très dure qui permet la réalisation de coupes fines du tissu osseux (afin d'accentuer les contrastes et mieux reconnaître les différentes structures) à l'aide de microtomes dédiés au tissu minéralisé et équipés de couteaux en carbure de tungstène (Polycut SM2500, Leica, Wetzlar, Germany). En raison de l'utilisation de grains de BCP dans notre étude, les lames

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

coupées au Polycut sont récupérées sur des « scotch tape » adhésives ou Histofilm (FUKAE-KASEI, Japan) afin de maintenir les grains sur les coupes lors des multiples bains de coloration (voir ci-contre). La présence de l'Histofilm modifie la couleur de certains colorants histologiques, c'est la raison pour laquelle les coupes de l'ensemble des échantillons ont été récupérées sur Histofilm.



Par ailleurs, l'utilisation d'Histofilm favorise l'apparition de craquelures sur les coupes et est donc difficilement compatible avec une quantification histomorphométrique ultérieure. La quantification histomorphométrique sur tissus osseux permet de réaliser des mesures quantitatives de paramètres morphologiques tels que BV/TV, Tb.Th (épaisseur des trabécules), OS.Th (épaisseur du tissu ostéoïde) etc..., et cellulaires tels que Ob/BS (nombre d'ostéoblastes par surface d'os), OC/BS (nombre d'ostéoclastes par surface d'os) etc... Pour cette étude, nous ferons une analyse uniquement qualitative des résultats.

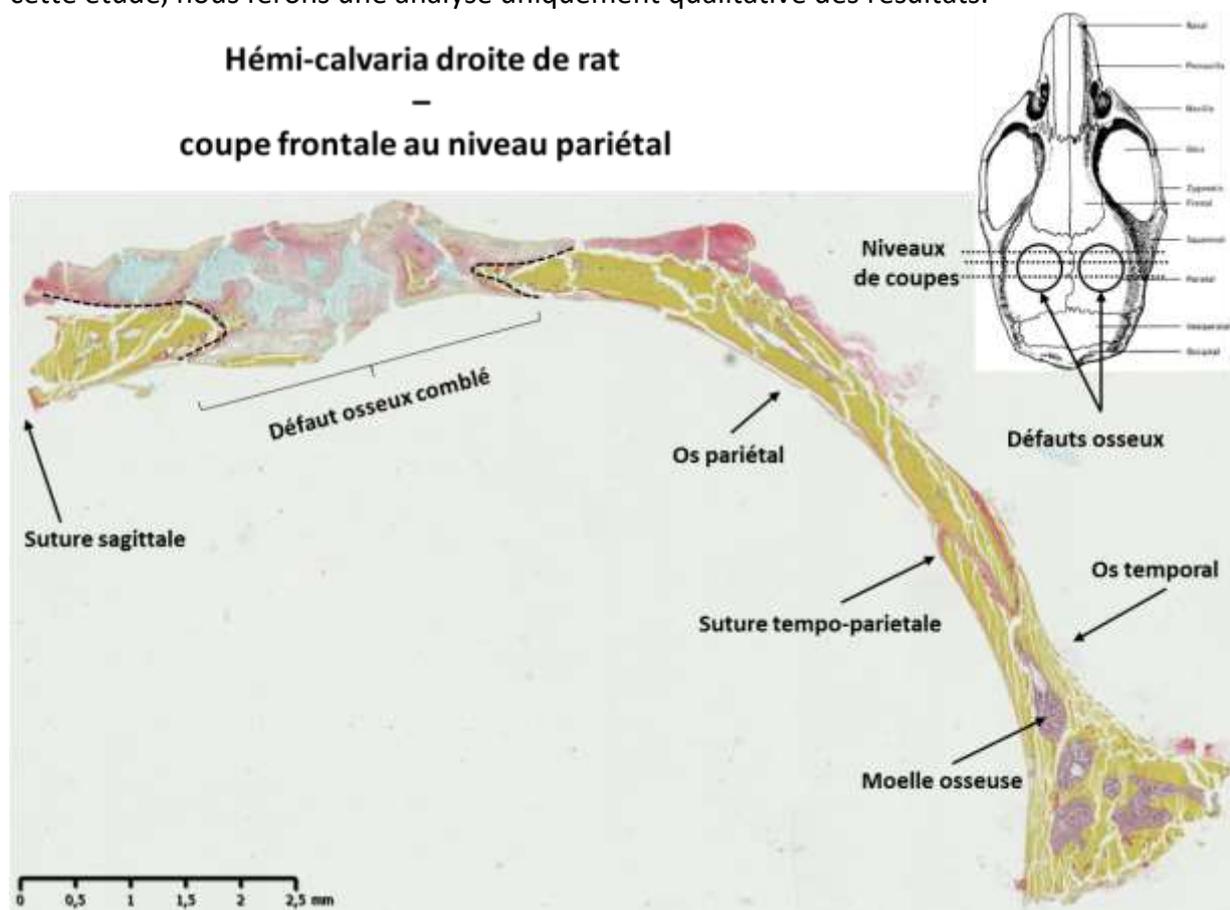


Figure II.19 : Coupe histologique frontale d'une hémicalvaria d'un rat ayant un défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse après coloration au pentachrome de MOVAT (voir ci-dessous).

Une fois les coupes obtenues, plusieurs types de colorations ont été réalisés : 1) Pentachrome de MOVAT, 2) Haematoxyline-Eosine (H&E), 3) Coloration enzymatique de l'activité des

phosphatases acides (TRAP) et 4) Von Kossa. De plus, pour les échantillons correspondant aux défauts comblés par un greffon osseux, une coloration à la Fuchsine a été réalisée pour distinguer l'os néoformé de l'os natif.

Les coupes sont réalisées à 2 ou 3 niveaux différents dans l'échantillon (figure II.19). Trois coupes de 7 µm ont été réalisées à chaque niveau pour chacune des colorations réalisées (soit, a minima, 12 coupes par niveau). Il est important de réaliser des coupes à différents niveaux dans le tissu inclus pour assurer une bonne représentativité des observations réalisées. Ceci est important surtout dans le cas de temps de régénération courts car la repousse osseuse est, à ce stade, inhomogène dans le défaut.

L'examen général du tissu est réalisé grâce à la coloration H&E, la visualisation de l'os néoformé par la coloration à la Fuchsine, celle du tissu minéralisé par la coloration Van Kossa et la coloration du tissu osseux et de l'ostéoïde grâce au pentachrome de MOVAT. Enfin, la coloration enzymatique de l'activité TRAP est réalisée pour visualiser la présence d'ostéoclastes.

Les lames colorées sont digitalisées avec un scanner de lame (NanoZoomer 2.0 HT, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) pour réaliser les planches histologiques présentées dans les chapitres II, III et IV et pour archivage.

Coloration H&E

La coloration hématoxyline éosine (H&E) est une coloration bichromatique composée d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore notamment les noyaux des cellules en bleu/violet en se fixant sur les acides nucléiques (figure II.20). L'éosine est un colorant acide qui colore le cytoplasme des cellules en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs.

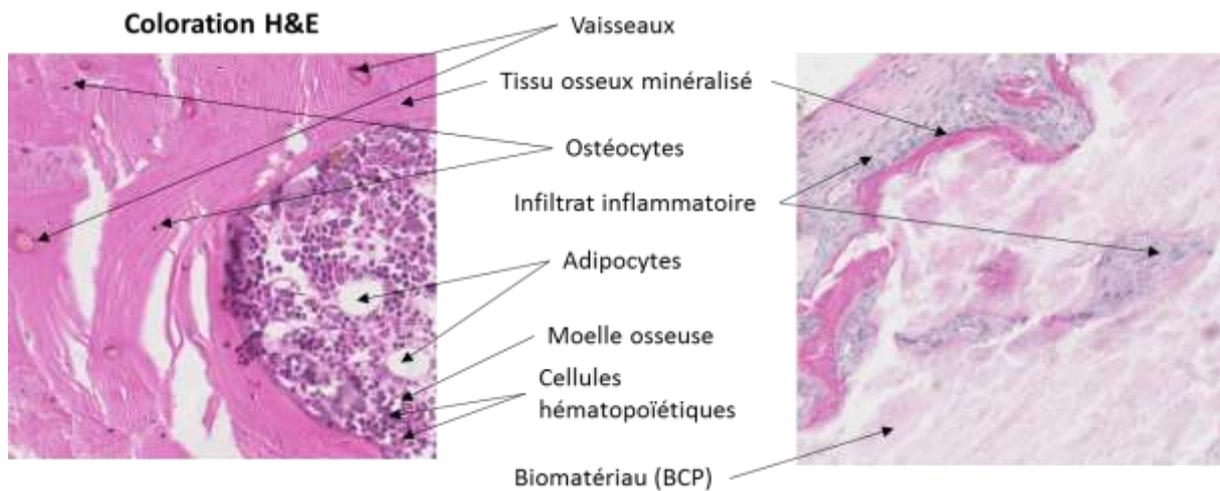


Figure II.20 : Coloration H&E d'une coupe histologique d'un défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

Coloration MOVAT

Cette coloration met en évidence le tissu calcifié en jaune, le cartilage calcifié en bleu/vert, les bordures ostéoïdes en rouge, les noyaux des cellules apparaissent en bleu à noir et la moelle osseuse (cellules hématopoïétiques) en violet. La figure II.21 illustre la nécessité de ce colorant pour l'identification des différents tissus d'un défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse.

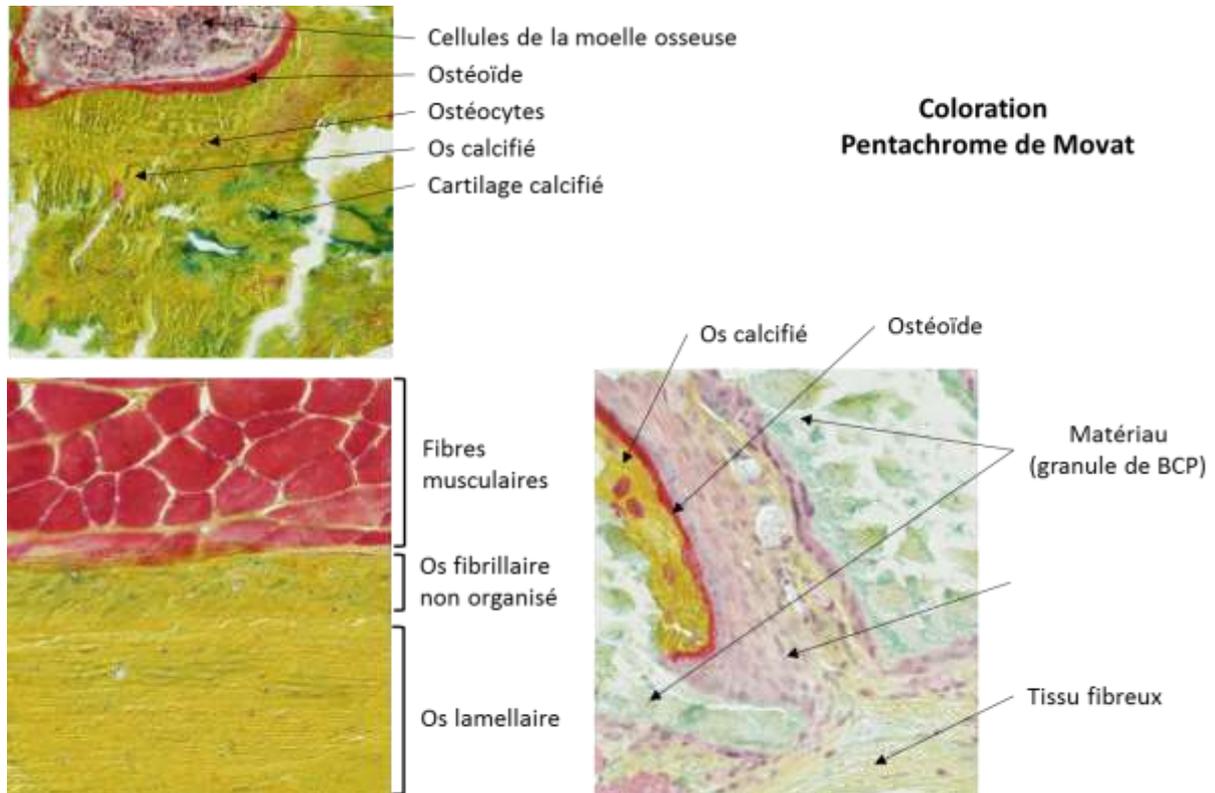


Figure II.21 : Coloration Pentachrome de MOVAT d'une coupe histologique de calvaria de rat réalisée au niveau d'un défaut comblé par des grains de BCP

Coloration TRAP

Ce colorant permet de visualiser de façon spécifique les ostéoclastes. Les zones rouges de la figure II.22 correspondent aux cellules ostéoclastiques lorsqu'elles sont adossées aux tissus minéralisés ou aux matériaux de comblement. Ce colorant permet donc de visualiser les zones d'activité cellulaire (zone de résorption).

Coloration TRAP

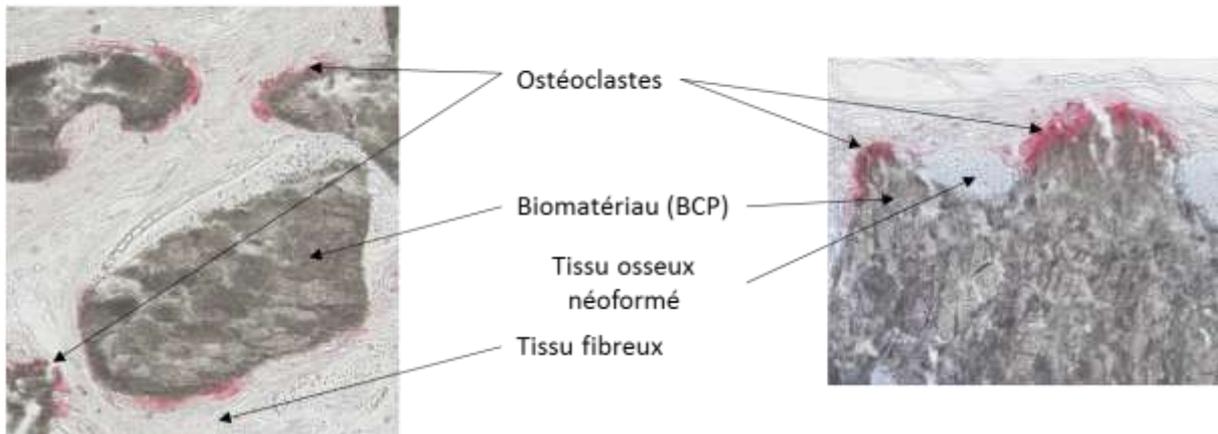


Figure II.22 : Coloration TRAP d'une coupe histologique de calvaria de rat réalisée au niveau d'un défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse

Coloration à la Fuchsine

La Fuchsine est utilisée pour distinguer le greffon osseux au niveau du défaut osseux (qui sera coloré en rose foncé) et l'os néoformé qui prendra une couleur rose plus pâle.

Coloration fuchsine

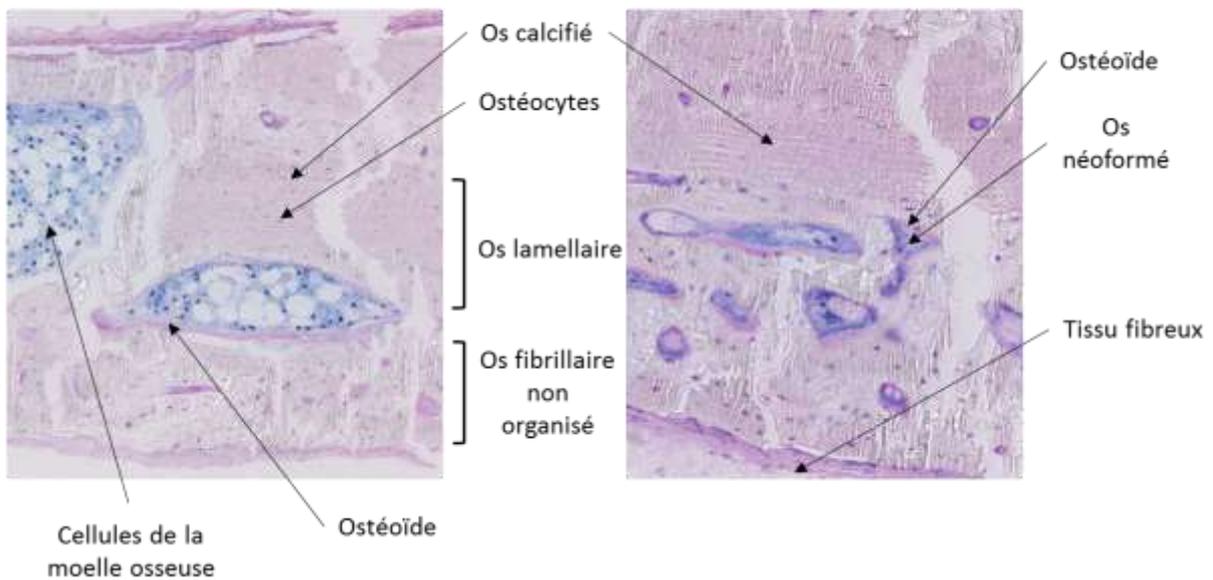


Figure II.23 : Coloration fuchsine d'une coupe histologique de calvaria de rat comblée par un greffon osseux

Coloration Van Kossa

Le principe de cette coloration est basé sur la transformation des sels de calcium en sels d'argent en présence de nitrate d'argent. Tous les tissus minéralisés, quel que soit leur degré

II. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation

de minéralisation (os jeune ou vieux), apparaissent en noir sur les coupes colorées (figure II.24). Une contre coloration est réalisée pour visualiser les autres tissus (éosine).

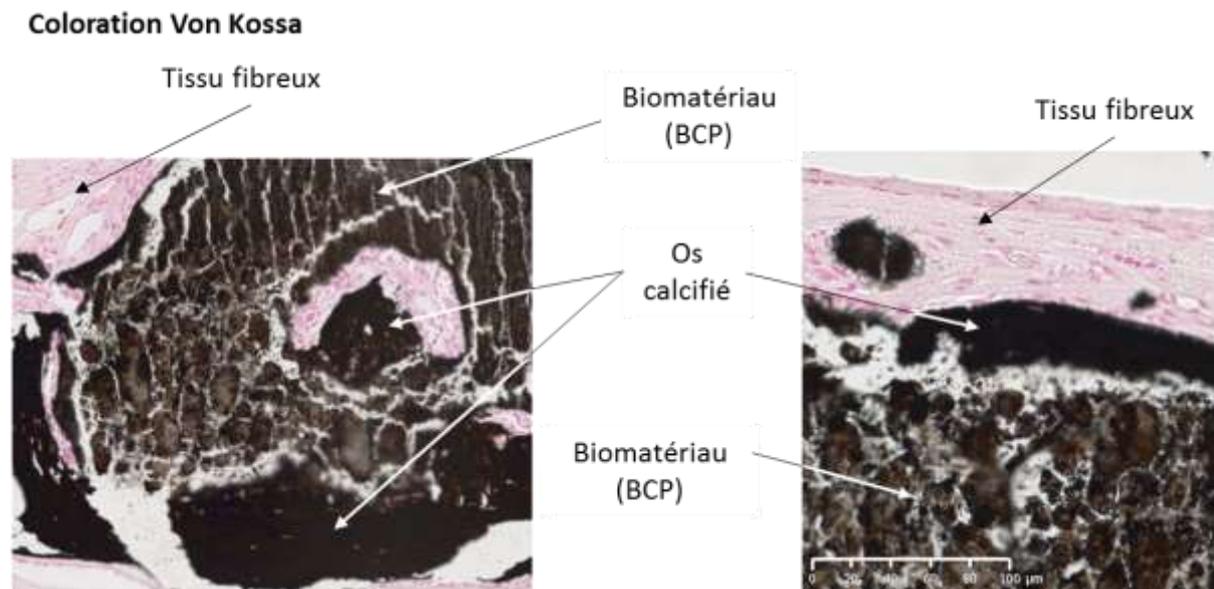


Figure II.24 : Coloration Von Kossa d'une coupe histologique de calvaria de rat comblée par un mélange de BCP et de moelle osseuse.

II.4. Conclusions

La composition et la structure de l'os changent constamment, en particulier au cours du processus de régénération osseuse afin d'améliorer les performances de la matrice régénérée et de supporter les charges mécaniques appliquées. Alors que de nombreuses études se concentrent sur la restauration du volume osseux, peu tentent d'analyser la microarchitecture et le comportement mécanique de l'os régénéré alors même que les propriétés mécaniques fournissent un critère indispensable dans l'évaluation de la réussite de la régénération osseuse. Dans cette thèse, les changements de la structure osseuse au cours de la régénération ont été évalués par plusieurs techniques complémentaires afin d'extraire des informations à différentes échelles.

L'analyse des propriétés mécaniques de l'os au cours du processus de régénération a été réalisée à travers l'évaluation des propriétés mécaniques de chacune des phases qui le compose (cristaux d'HA et fibres de collagène) ainsi que leur association en ostéons ou en lamelles, dans l'échelle suivante. L'étude du comportement mécanique des éléments de base a été effectuée grâce à une analyse des champs de déformations sous sollicitations mécaniques *in situ* (en traction) couplées à la diffusion des rayons X aux grands (WAXS) et petits angles (SAXS), permettant de mettre en évidence la répartition des champs de déformations élastiques (ou de contraintes) dans les cristaux ainsi que les caractéristiques microstructurales de cette phase. Cela est complété par des mesures de nanoindentation instrumentées afin de quantifier les propriétés élastiques de l'os à une échelle structurale intermédiaire représentée par les ostéons. L'évolution du comportement mécanique dans le temps et dans l'espace a été corrélée aux processus biologiques à l'échelle microscopique et la cinétique de régénération. En effet, une analyse complète de la microstructure à travers des examens histologiques, des analyses par microtomographie et une étude de la morphologie et de l'orientation des cristaux présents au sein de l'os nouvellement formé a été réalisée sur tous les échantillons, prélevés à différents stades de régénération (2, 4, 6, 8, et 20 semaines) et dans les défauts comblés par les trois types d'implants étudiés (BG, BCP et BCP +TBM).

Les différentes techniques expérimentales proposées font partie d'une méthodologie de travail qui ambitionne de mieux appréhender l'influence des techniques d'ingénierie osseuse et la nature de l'implant sur le comportement mécanique global de l'os, notamment l'incorporation des biomatériaux et leur impact sur les propriétés mécaniques de l'os régénéré au cours du temps. L'objectif est donc de mieux évaluer la reconstruction osseuse via des campagnes de caractérisation expérimentales multiéchelles complémentaires et multidisciplinaires. Ceci permettra alors, à terme, d'élaborer de nouvelles stratégies de reconstruction et de les optimiser en tenant compte non seulement de l'aspect biologique, mais aussi de l'aspect mécanique souvent négligé.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré après implantation d'une allogreffe osseuse

III.1.	Introduction.....	89
III.2.	Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique	89
III.2.1.	Description des défauts vides (contrôle négatif)	90
III.2.2.	Description des défauts avec greffons osseux	91
III.3.	Evaluation microarchitecturale	97
III.4.	Épaisseur moyenne des particules minérales	101
III.5.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré	105
III.6.	Réponse mécanique des cristaux	108
III.6.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	108
III.6.2.	Nanoindentation	114
III.7.	Conclusions.....	117

III.1. Introduction

Le succès de l'utilisation des biomatériaux dans l'ingénierie osseuse traduit le progrès de la recherche sur les matériaux utilisés pour les implants et le développement des techniques chirurgicales adaptées dans la régénération osseuse par implantation. En effet, l'amélioration continue des implants et le développement de stratégies innovantes font l'objet de nombreuses recherches en médecine régénératrice et en science des biomatériaux. Comme il était mentionné dans le chapitre I, la régénération osseuse par implantation est assurée par les trois mécanismes nécessaires à la néoformation (l'ostéo-induction, l'ostéo-conduction et l'ostéogenèse). Ces mécanismes découlent des interactions possibles entre l'implant et l'environnement osseux et cellulaire afin d'assurer son intégration et stimuler la régénération osseuse. Le succès clinique de la régénération osseuse et l'évaluation des implants sont donc fortement dépendants de leur capacité à s'intégrer à l'os sain et à favoriser la néoformation. Du point de vue biologique, les greffes osseuses (autogreffes, allogreffes ou xéno-greffes) constituent le meilleur choix pour combler et régénérer des défauts critiques puisqu'elles possèdent des caractéristiques intéressantes pour l'ostéo-intégration de l'implant et la régénération. Cependant, leur comportement mécanique après implantation, l'évolution de la microstructure et des propriétés mécaniques du tissu régénéré au cours de temps ne sont pas encore bien appréhendés, comme cela a été mis en lumière dans le premier chapitre. Ce troisième chapitre présente une étude à la fois biologique, microstructurale et mécanique du tissu régénéré après implantation d'une allogreffe osseuse (greffe osseuse = Bone Graft (BG)) dans un défaut non critique dans la calvaria de rat. L'objectif de ce chapitre est de corréler les résultats de l'étude mécanique, aux paramètres biologiques et aux changements structuraux observés au cours du processus de régénération osseuse dans ce défaut, et ce, afin d'obtenir des informations sur les mécanismes de cette régénération.

III.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique

L'évaluation des différents paramètres biologiques et des activités cellulaires impliqués dans la régénération est réalisée notamment à travers des observations microscopiques sur des coupes frontales réalisées au niveau du défaut. Le processus de régénération dans les défauts vides ou implantés (greffe osseuse) est alors mis en évidence grâce aux différentes colorations histologiques réalisées sur ces coupes. Celles-ci permettent d'identifier les structures et cellules présentes dans l'os au cours de la régénération et les séquences d'évènements qui y sont associées (phases inflammatoires, résorption, formation, remodelage...).

- Description de l'os naturel de calvaria.

L'os de la calvaria est un os lamellaire très organisé. Les différentes couches d'os minéralisé sont bien visibles sur les colorations Movat et H&E (figure III.1). Des zones de moelle osseuse sont également présentes, mais aucune zone de formation ou de résorption (coloration TRAP) n'est visible indiquant que cet os est globalement peu remodelé chez nos animaux. L'aspect global du tissu au niveau histologique est identique dans les prélèvements réalisés chez des rats âgés de 10, 12, 14, 16 et 28 semaines.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

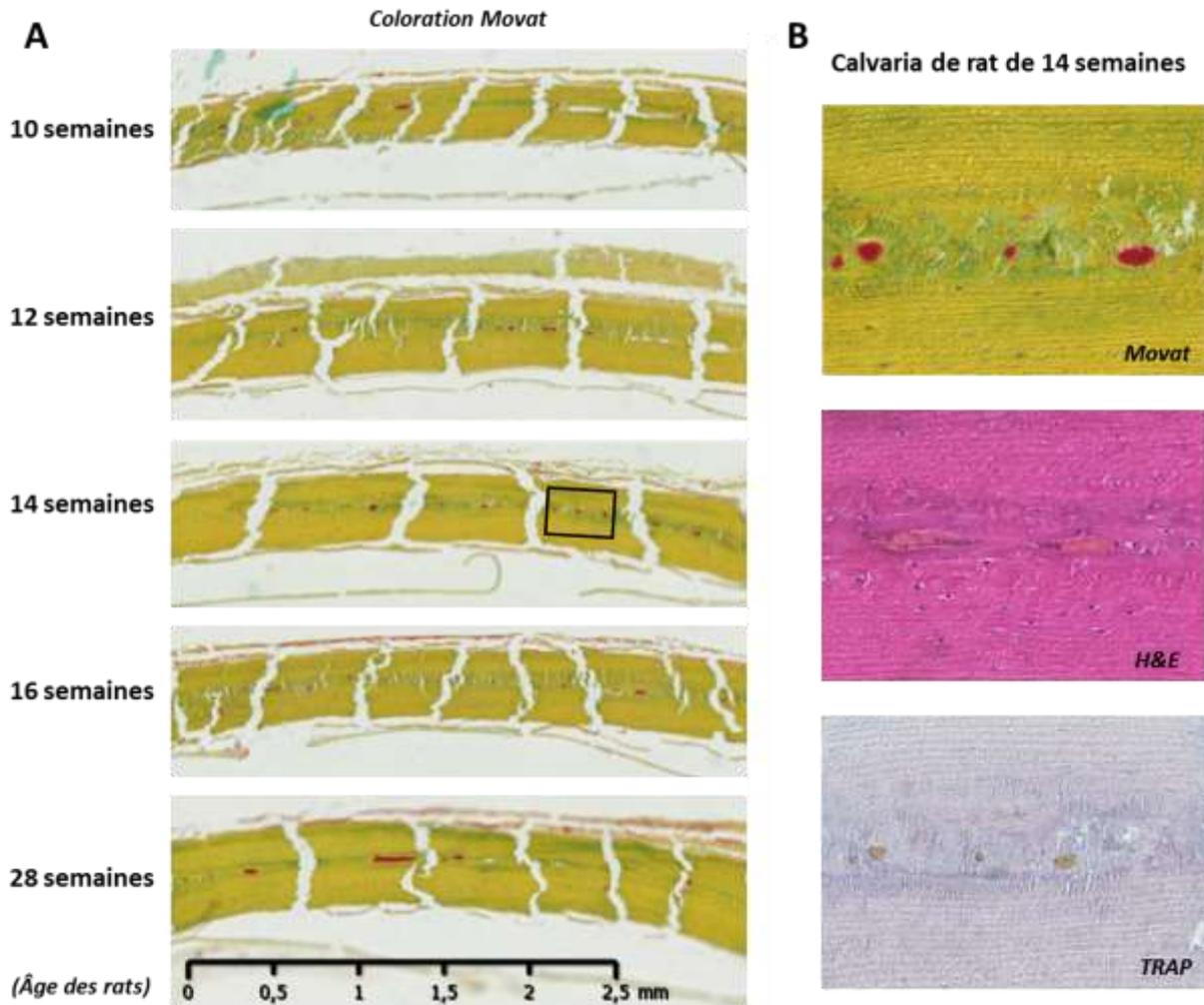


Figure III.1 : Coupes histologiques frontales à 10, 12, 14, 16, et 28 semaines des rats non opérés. (A) Une coloration au pentachrome de Movat a été réalisée. (B) Le rectangle noir sur l'image à gauche indique la zone présentée à droite à grossissement plus élevé pour les colorations Movat, H&E et TRAP.

III.2.1. Description des défauts vides (contrôle négatif)

Des coupes frontales ont été réalisées au niveau du défaut vide. L'évolution de l'os régénéré au cours du temps peut y être observée ainsi que l'os natif sur ses bords. Ces coupes montrent que, dès les premiers temps (dès 2 semaines post-chirurgie), le défaut est envahi par du tissu fibreux et par un infiltrat inflammatoire surtout pendant les 4 premières semaines (figure III.2). Cet infiltrat inflammatoire post-opératoire est une réaction normale du tissu, qui s'estompe normalement au cours du temps. En effet, l'inflammation au niveau du défaut s'estompe après 6 semaines dans notre expérience. Dès 4 semaines post-chirurgie, une activité de formation osseuse est observée sur les berges du défaut dans l'os natif (bordure ostéoïde colorée en rouge ; figure III.2). Cette activité de formation osseuse permet de réduire la superficie du défaut au fil du temps, mais ne suffit pas au comblement complet du défaut qui est toujours partiellement rempli de tissu fibreux, 20 semaines après chirurgie. En absence de matériau ostéoconducteur, de cellules à activité ostéogénique et/ou de facteurs

ostéoinducteurs dans le défaut, le comblement se fait uniquement par apposition de tissu osseux au niveau des berges du défaut grâce à la participation des progéniteurs ostéoblastiques présents localement surtout dans le périoste.

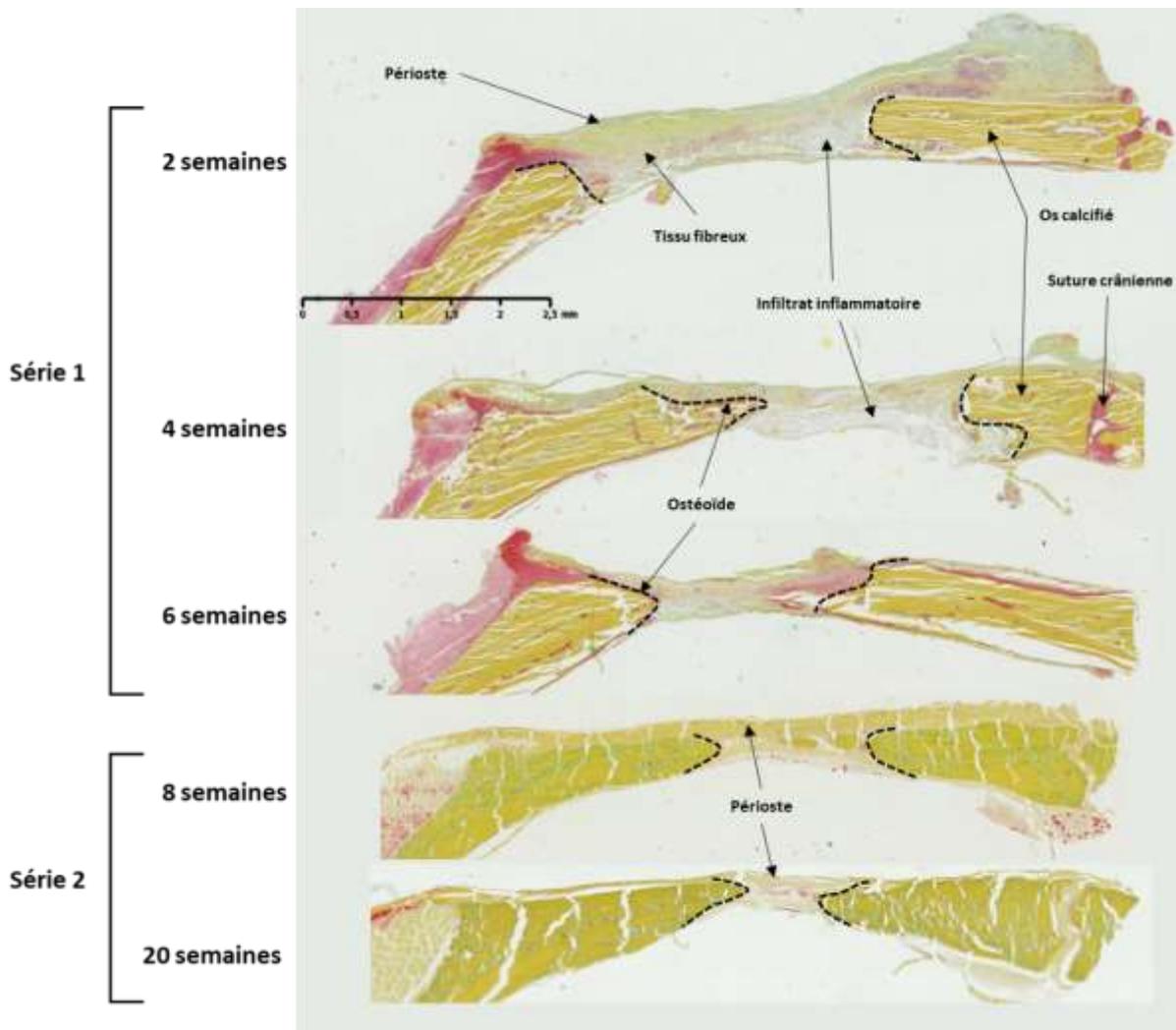


Figure III.2 : Coupes histologiques frontales à 2, 4, 6, 8, et 20 semaines de régénération au niveau des défauts de 3 mm vides (contrôles négatifs). Une coloration au pentachrome de Movat a été réalisée. Les bords du défaut sont indiqués par des lignes pointillées noires. Les séries 1 et 2 font référence à deux groupes indépendants d'animaux opérés.

III.2.2. Description des défauts avec greffons osseux

Nous avons également analysé la repousse osseuse à 2, 4, 6, 8 et 20 semaines après comblement des défauts par des greffons osseux allogéniques (figures III.3 et III.4). Deux semaines après chirurgie, les fragments osseux placés dans le défaut sont entourés de tissu inflammatoire (coloration Movat : tissu rosâtre). Contrairement aux défauts vides, la formation osseuse débute immédiatement. En effet, des bordures ostéoïdes sont visibles dès ce stade, non seulement au niveau des berges osseuses, mais également à la périphérie des fragments osseux du greffon (voir détail coloration Movat : zone rouge autour des fragments d'os du greffon pour la série 1). Aucun ostéoclaste n'est visible à ce stade. Le compartiment

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

périosté est également parfaitement identifiable sur les coupes, surtout aux derniers temps de régénération étudiés.

À partir de quatre semaines après chirurgie, la formation d'ostéoïde s'intensifie sur l'ensemble du greffon grâce aux ostéoblastes et aux progéniteurs ostéoblastiques présents dans le greffon transplanté (noyaux des cellules en bleu/violet sur le détail de la coloration H&E à 4 semaines de la figure III.4.B). Des zones d'os néoformé (os fibrillaire non organisé = woven bone) sont visibles et équitablement réparties dans le tissu régénéré (figure III.3). La réaction inflammatoire initiale s'estompe. Dès 4 semaines post-chirurgie, des cavités médullaires plus ou moins importantes se forment à partir des cellules apportées par le greffon et également grâce à la néo-angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux et capillaires sanguins) qui a lieu dans l'os néoformé et qui permet aux progéniteurs circulant de venir sur le site de régénération. Ces cavités contenant de la moelle osseuse sont visibles (coloration de Movat, figure III.3) sur les coupes réalisées à 4, 6 et 8 semaines post-chirurgie. Des cellules hématopoïétiques ainsi que des adipocytes y sont visibles (ronds blancs) comme dans les cavités médullaires de l'os natif.

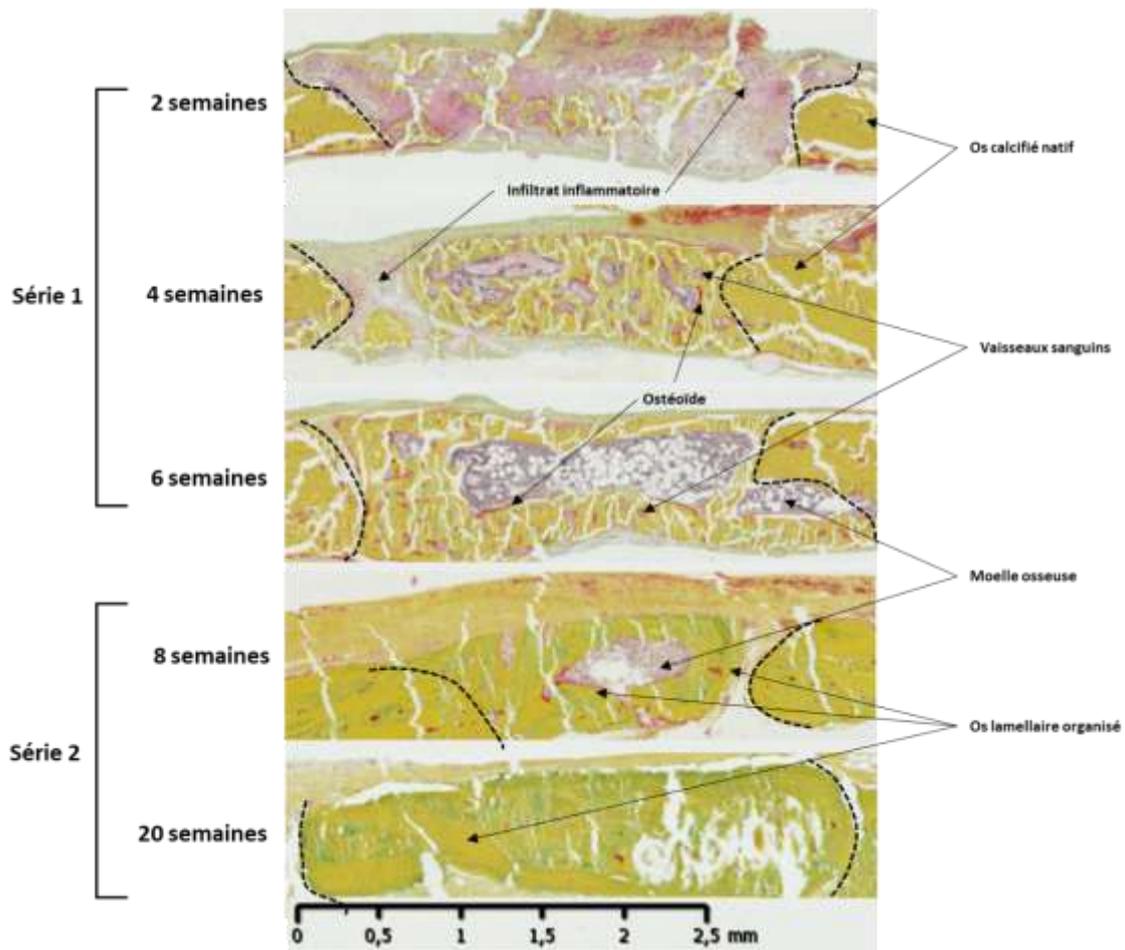


Figure III.3 : Coupes histologiques frontales à 2, 4, 6, 8, et 20 semaines de régénération au niveau des défauts comblés par des greffons allogéniques. Une coloration au pentachrome de Movat a été réalisée. Les bords du défaut sont indiqués par des lignes pointillées noires. Les séries 1 et 2 font référence à deux groupes indépendants d'animaux opérés.

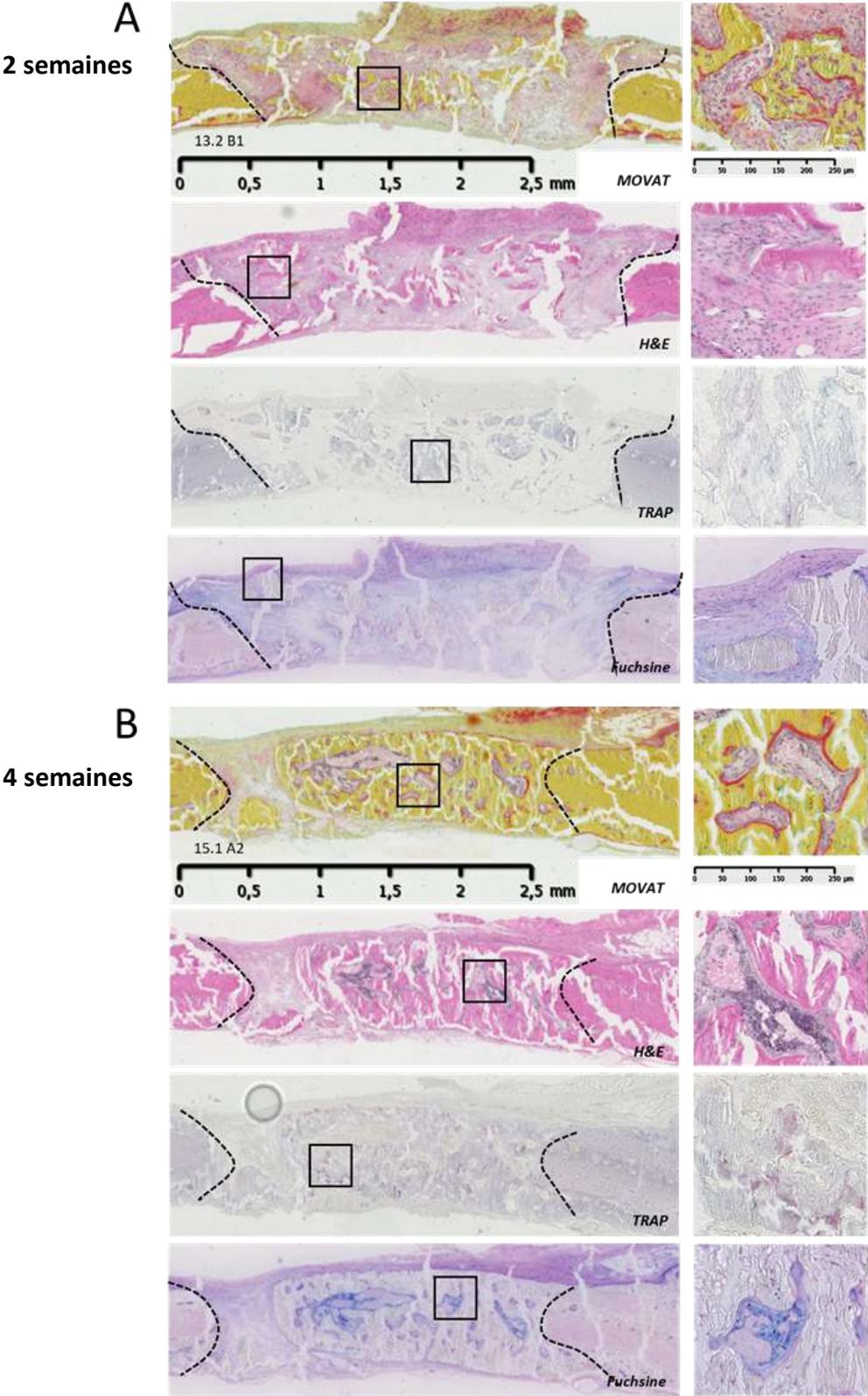
III.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique

Des ostéoclastes (colorés en rouge sur le détail de la coloration TRAP de la figure III.4) sont visibles entre 4 et 6 semaines indiquant qu'une phase de remodelage du tissu a débuté localement.

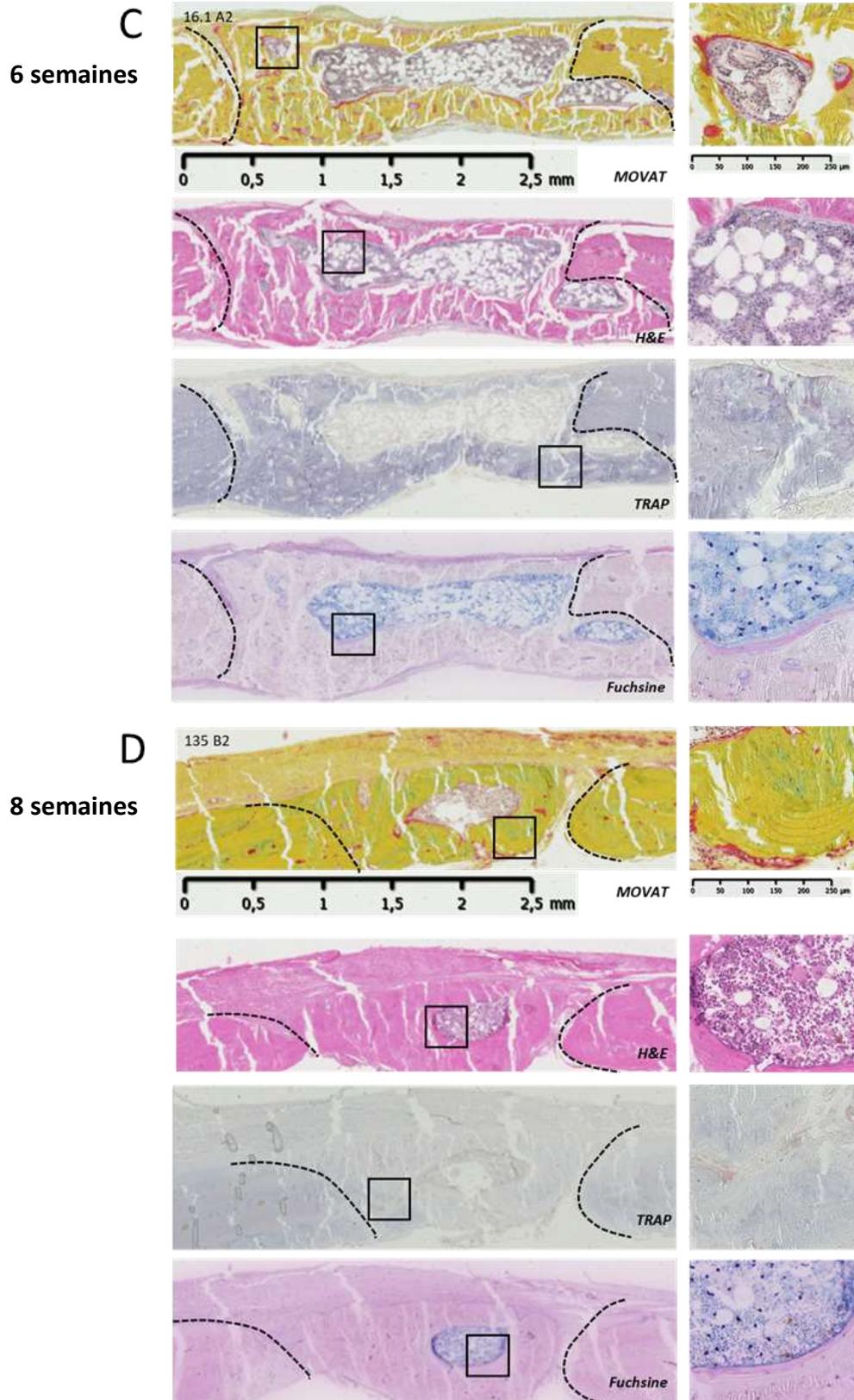
À 8 semaines post-chirurgie, des zones d'os lamellaire sont visibles dans l'os régénéré, mais elles côtoient encore des zones d'os fibrillaire non organisé (colorations Movat et Fuchsine, figure III.4). La présence d'os lamellaire indique que soit une phase d'apposition osseuse ou soit le remplacement de l'os fibrillaire par remodelage a eu lieu. En effet, deux zones distinctes d'os lamellaire peuvent être observées sur les coupes : en périphérie du tissu de comblement à proximité du périoste et des berges du défaut ou autour des fragments d'os greffés dans une proportion moindre. Ainsi, la proportion de tissu minéralisé dans le défaut augmente globalement avec le temps et semble corrélée avec les résultats de l'analyse du tissu minéralisé par microtomographie X (voir paragraphe I.2).

Après 20 semaines de régénération, le tissu osseux de repousse n'est plus différenciable de l'os natif au niveau des berges du défaut du point de vue histologique sur nos coupes. Nous n'observons plus d'activité de formation ni de résorption. Le défaut a été parfaitement comblé par du tissu minéralisé ressemblant à l'os natif (os lamellaire) au niveau de larges zones, mais de l'os fibrillaire subsiste encore à ce stade.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré



III.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique



III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

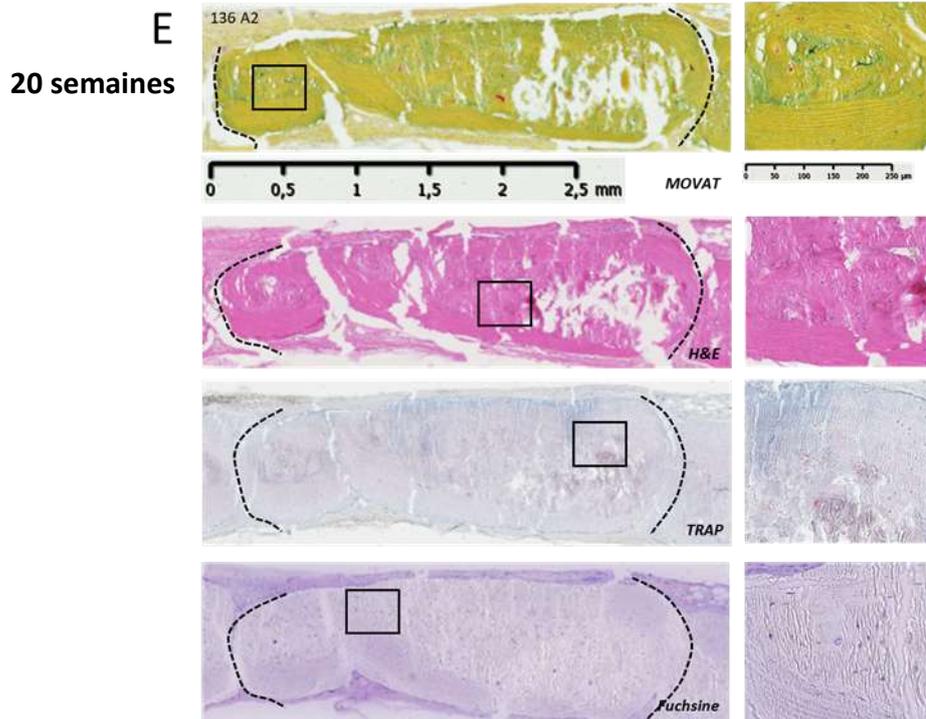


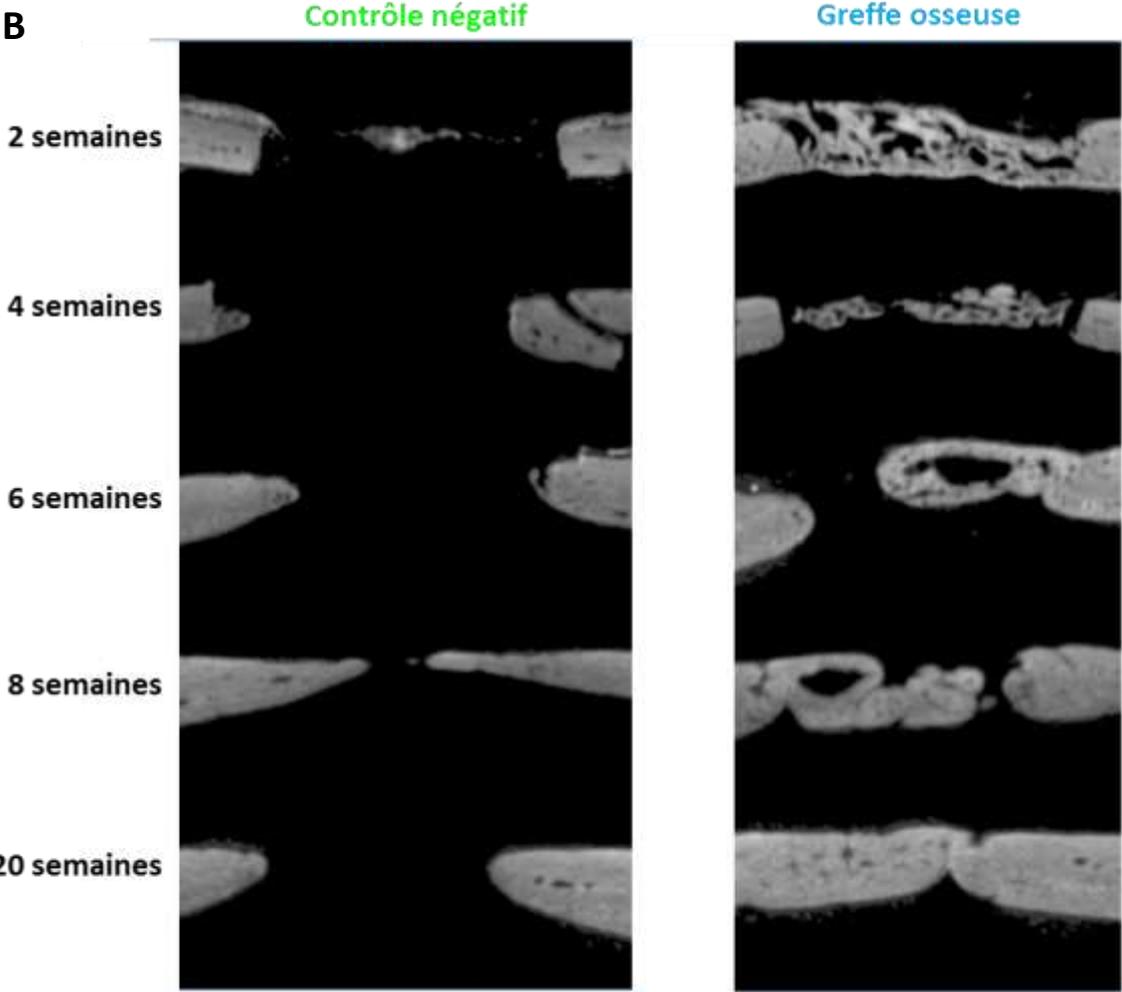
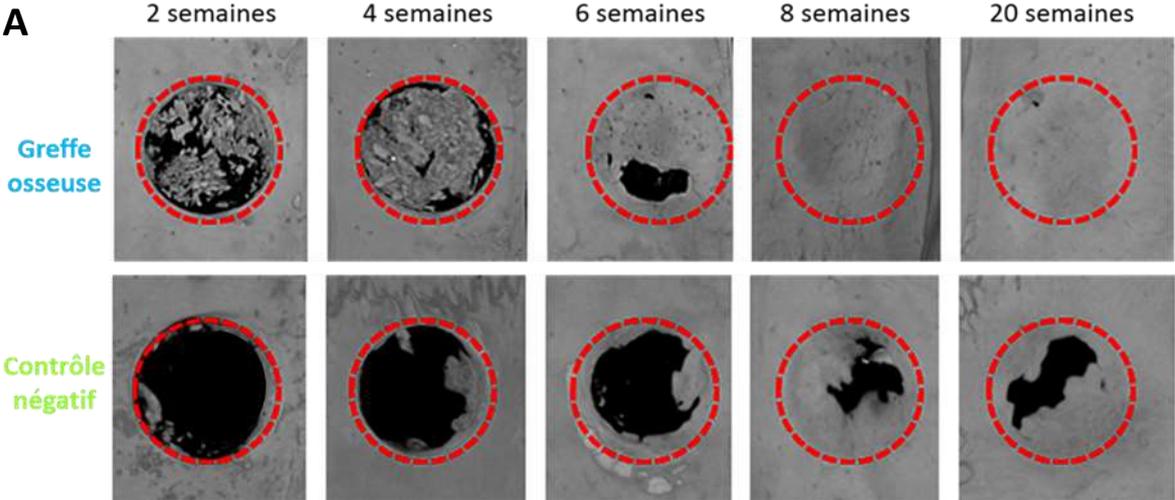
Figure III.4 : Coupes histologiques représentatives montrant une coupe frontale de tout le défaut avec os natif sur les bords (colorations de haut en bas : Movat, H&E, TRAP et Fuchsiine) à (A) 2, (B) 4, (C) 6, (D) 8, et (E) 20 semaines de régénération des défauts comblés par un greffon osseux allogénique de rat. Les rectangles noirs sur les images à gauche indiquent les zones présentées à droite à grossissement plus élevé. Les coupes colorées au pentachrome de Movat sont celles reprises de la figure III.3.

En résumé, l'intégration de la greffe osseuse et la régénération suivent une succession d'évènements au niveau tissulaire et cellulaire : la revascularisation immédiate du défaut et la formation d'un infiltrat inflammatoire dès les premières semaines de régénération facilitent la migration des cellules vers le site opératoire. Un tissu ostéoïde (matrice collagénique sécrétée par les cellules ostéoblastiques) apparaît sur les berges du défaut et autour des fragments osseux implantés dès 2 semaines de régénération. Entre 4 et 6 semaines, l'os de l'implant est résorbé par les ostéoclastes, l'ostéoïde est minéralisé par les ostéoblastes et un phénomène de remodelage est initié. La résorption du greffon osseux et la néoformation, débutées à cette période (6 semaines) se font graduellement grâce à la présence des cellules compétentes pendant plusieurs semaines (jusqu'à 20 semaines). Le résultat du remodelage se traduit par un tissu lamellaire (organisé). Au cours de sa cicatrisation, l'os fait appel à plusieurs phénomènes qui se produisent successivement localement, mais aussi de manière hétérogène et dépendante de la répartition du greffon dans le défaut. En effet, le site opératoire est le siège d'un phénomène continu et dynamique qui favorise la résorption du greffon, la formation et la minéralisation de l'ostéoïde et le remodelage (remplacement du « woven bone » peu organisé par un os lamellaire organisé).

III.3. Evaluation microarchitecturale

Les architectures en 3D obtenues par microtomographie X des défauts crâniens comblés par un greffon osseux et des défauts laissés sans implant (contrôle négatif), ainsi que les coupes frontales et sagittales au niveau du défaut sont présentées sur la figure III.5, pour les 5 temps de régénération étudiés. En absence d'implant, aucune (à 2, 4, et 6 semaines) ou peu (à 8 et 20 semaines) de repousse osseuse est observée dans le groupe des rats qui n'ont pas été implantés (contrôle négatif). Cela est identifiable à travers le manque de tissu minéralisé (représenté en noir sur les scans) au niveau du défaut pour les différents temps de régénération sur la vue de dessus des représentations 3D présentées sur la figure III.5. Cette repousse limitée est due à l'absence de tissu ostéo-conducteur et de cellules osseuses ostéogéniques dans le défaut (voir paragraphe précédent). Les coupes présentées sur la figure III.5.A et III.5.B montrent clairement que dans le cas du défaut vide, la croissance osseuse ne se fait qu'à partir des berges du défaut et de manière aléatoire. Les vitesses de repousse et la localisation des zones initiales de repousse sont variables sur le périmètre du défaut circulaire. Avec le temps, un tissu régénéré faible en épaisseur (coupe à 8 semaines) se forme naturellement sur les bords afin de combler la perte de substance osseuse. Cette capacité régénératrice naturelle n'est toutefois pas suffisante pour cicatrifier le défaut de 3 mm sur les calvaria des rats après 20 semaines. En effet, la majorité du tissu de repousse n'est pas encore minéralisé. Comme le montre la figure III.6, même à la fin de l'étude (i.e. à 20 semaines de régénération), le comblement des défauts par du tissu minéralisé reste partiel (la masse osseuse présente dans le défaut est de 19 %) dans le groupe de contrôle comparativement aux défauts ayant reçu la greffe osseuse dans lesquels un comblement important (masse osseuse de 54 %) est atteint dès 8 semaines après implantation.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré



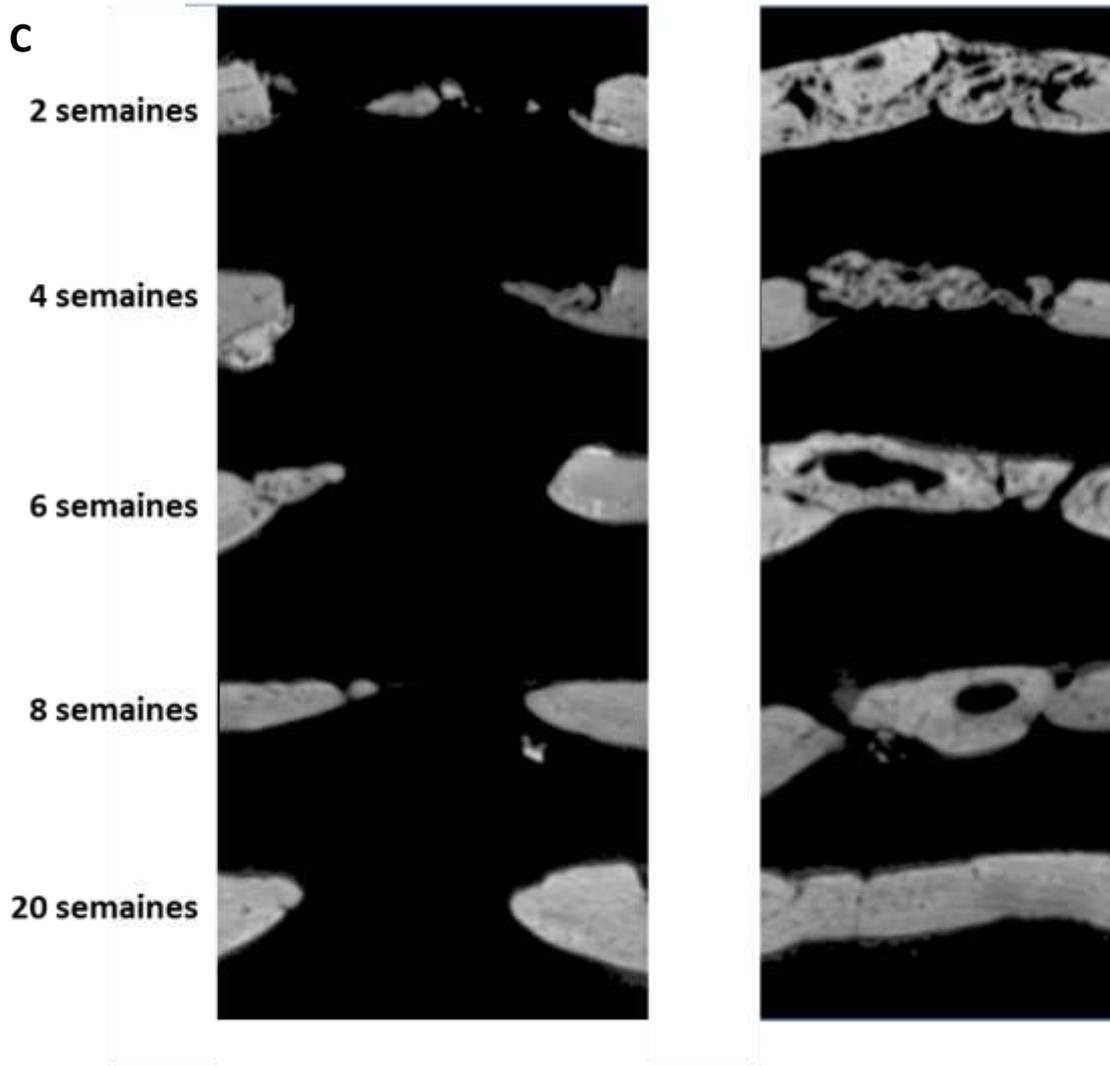


Figure III.5 : Évaluation par microtomographie X des défauts crâniens ayant reçu un greffon osseux ou laissés vides (contrôle négatif) à 2, 4, 6, 8 et 20 semaines de régénération. (A) Vue du dessus, (B) coupe frontale au niveau du défaut, (C) coupe sagittale au niveau du défaut. Les lignes en pointillés rouges représentent le défaut initial. Les coupes sont réalisées au centre du défaut. (code couleur : noir tissu non minéralisé ; gris tissu minéralisé).

Les coupes frontales et sagittales, au niveau des défauts implantés avec un greffon osseux, montrent que le défaut a été majoritairement comblé non seulement en surface, mais également sur toute sa hauteur par du tissu minéralisé à la fin de l'étude (20 semaines). À 6 et 8 semaines, la vue de dessus montre un comblement parfait du défaut ayant reçu la greffe osseuse. Cependant, les coupes correspondantes montrent que l'os n'est pas régénéré sur toute l'épaisseur de l'os natif. Il présente des cavités sur le volume, représentées par des zones noires sur les vues en coupe obtenues, correspondant à l'absence de tissu minéralisé dans ces zones. Cela peut être lié à une formation de cavités contenant de la moelle osseuse pour certains échantillons, comme cela est visible sur l'analyse histologique du tissu de comblement (voir paragraphe précédent) ou bien par une formation discontinue sur l'épaisseur du défaut. La néoformation osseuse est importante dans les défauts ayant reçu une greffe osseuse. En effet, la présence du tissu osseux du greffon qui a des propriétés ostéoinductrices, favorise la

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

néoformation non seulement à partir des berges du défaut, mais aussi en son centre. Ces observations structurelles sont en accord avec les résultats qualitatifs obtenus en histologie qui ont montré une activité cellulaire importante dans le défaut dès les premières semaines de régénération.

L'analyse par microtomographie X, à 2 semaines de régénération, indique que le défaut est rempli d'un tissu minéralisé discontinu qui ressemble aux particules d'os du greffon. Ceci est mis en lumière par les particules apparaissant en gris clair dans le défaut sur les vues en coupe obtenues. Une augmentation de l'étendue des zones minéralisées est observée au cours du temps (4 et 6 semaines de régénération) jusqu'à l'obtention d'une structure homogène et d'épaisseur égale à l'épaisseur de l'os autour (8 et 20 semaines). Ceci est en accord avec les observations histologiques et prouve que la greffe osseuse n'est pas complètement résorbée à 2 et 4 semaines après implantation. Il est à noter que les parties régénérées présentent des épaisseurs variables en raison d'une formation aléatoire qui peut être due à une répartition non homogène des fragments osseux du greffon dans le défaut ou à un échappement de ces derniers du site d'implantation.

Le taux de croissance du tissu minéralisé dans les défauts crâniens a été analysé à travers la quantification du volume minéral donnée par le pourcentage de MV/TV (i.e. Mineral Volume/Tissu Volume, cf. chapitre II). La figure III.6 montre que le volume minéral quantifié après implantation du greffon osseux (13 %) est nettement supérieur à celle correspondant aux échantillons du contrôle négatif (3 %) dès 2 semaines de régénération. Après cette formation exceptionnelle à 2 semaines, observée chez les rats implantés, l'augmentation de la masse osseuse pour le groupe implanté est beaucoup plus élevée au cours de temps : 17 % de masse osseuse supplémentaire entre 2 et 20 semaines pour les contrôles négatifs comparés à 41 % d'augmentation pour les rats implantés avec une greffe osseuse.

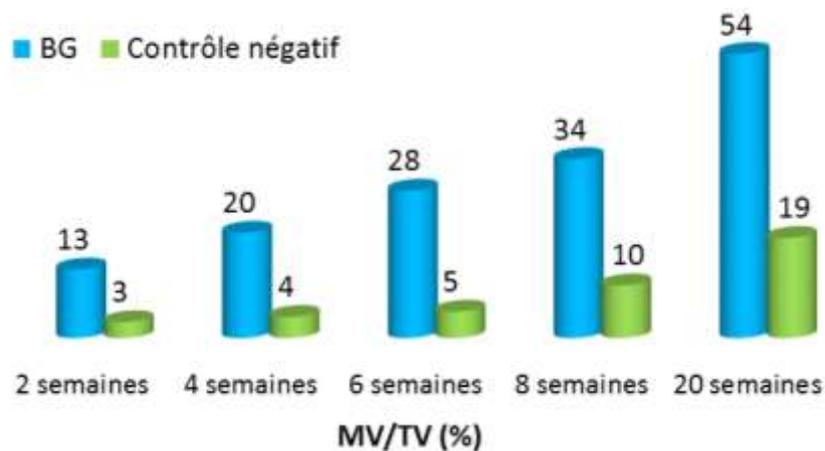


Figure III.6 : Variation du volume minéral/volume total (MV/TV) en fonction des différents temps de régénération (2, 4, 6, 8 et 20 semaines) dans des défauts crâniens comblés par une greffe osseuse ou laissés vides (contrôle négatif). Ces résultats sont exprimés en % et chaque barre représente une mesure dans un défaut.

Finally, peu de tissu minéralisé est observé dans les défauts laissés vides. Cela résulte en un faible volume minéral par volume d'os, même après 20 semaines de régénération (19 %). La repousse osseuse initiée spontanément sur les berges du défaut n'est pas suffisante pour combler le défaut crânien. L'implantation avec des fragments osseux (allogreffe) dans le défaut augmente visiblement la quantité de tissu minéralisé et conduit à un comblement complet dès 8 semaines de régénération. Il est à noter que le tissu minéralisé présent dans le défaut à 2 et 4 semaines de régénération correspond au greffon osseux implanté qui n'est pas encore totalement résorbé à ce moment de régénération. Dans certains cas, la repousse semble homogène sur la surface du défaut, en revanche elle est discontinue dans le volume à cause d'une régénération encore incomplète ou de la présence de moelle osseuse. Ces effets peuvent intervenir pour influencer le comportement mécanique de la structure ultérieurement.

III.4. Épaisseur moyenne des particules minérales

L'évolution des épaisseurs moyennes des particules minérales via le paramètre T, à la fois dans la partie de l'os naturel et dans la partie de l'os régénéré (correspondant à la zone d'implantation) a également été quantifiée grâce aux mesures effectuées par SAXS et dont le principe est exposé dans le chapitre précédent.

La figure III.7 présente les valeurs du paramètre T dans des calvarias de rats non opérés, c'est-à-dire sans défaut, en fonction de l'âge des animaux au sacrifice. L'âge des rats au moment de l'intervention chirurgicale pour créer le défaut est de 8 semaines. La valeur moyenne affichée et l'écart-type correspondant sont calculés à partir de 1156 points de mesure répartis sur la surface analysée par SAXS correspondant à $\frac{1}{4}$ de la surface des défauts réalisés chez les rats de l'étude. Il est à noter que l'âge de ces animaux au moment du prélèvement correspond à celui des rats sacrifiés aux temps choisis pour effectuer l'étude de la régénération osseuse résolue dans le temps. Le paramètre T calculé pour chaque temps de sacrifice est donc considéré comme une référence (pas de perturbation chirurgicale) à un âge donné pour étudier l'effet de la régénération sur l'épaisseur des cristaux. Ces prélèvements nous permettront également de quantifier l'évolution de l'épaisseur des cristaux avec l'âge chez des rats qui n'ont pas subi d'intervention chirurgicale.

La relation de dépendance à l'âge du paramètre T est caractérisée par une augmentation pour un âge des rats entre 10 et 16 semaines (correspondant donc à un temps de sacrifice allant de 2 à 8 semaines), traduite ici par une première pente sur la courbe de la figure III.7 suivie d'une évolution moins rapide entre 16 et 28 semaines (correspondant donc à un temps de sacrifice allant de 8 à 20 semaines). Ces observations sont en accord avec l'étude de Fratzl *et al.* [Fratzl et al. 1991a] réalisée sur des calvarias de souris jusqu'à l'âge de 30 semaines. L'évolution de l'épaisseur moyenne des cristaux dans la calvaria des souris au cours du temps a été analysée par SAXS à travers le paramètre T déterminé de la même manière que dans cette étude. Les auteurs montrent que l'augmentation rapide de l'épaisseur au début du processus de minéralisation est suivie d'une saturation qui commence à partir de la semaine 15.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

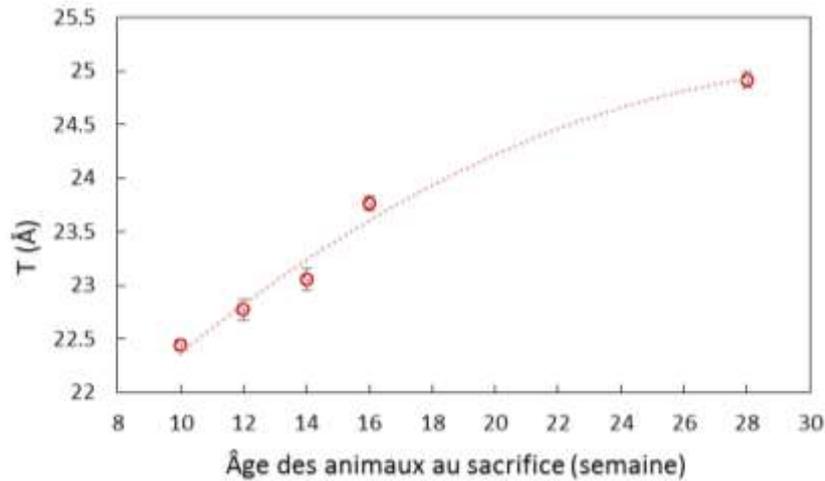


Figure III.7 : Épaisseur moyenne des cristaux d'HA (paramètre T) déterminée par SAXS des rats non opérés, en fonction de l'âge. La courbe en pointillés rouges est la courbe de tendance obtenue par une fonction polynomiale d'ordre 2. Les résultats sont exprimés en Angstrom (Å) et sont présentés en moyenne ± 1 écart-type sur un échantillon de 1156 valeurs.

Les cartographies SAXS de la microstructure ont également été réalisées dans et autour des défauts comblés par le greffon osseux (BG) sur une surface de 2×2 mm². Ces cartographies ont permis de tracer l'évolution moyenne du paramètre T au cours du temps en fonction de la distance par rapport au centre du défaut circulaire (de 3 mm) comblé par le greffon. Les valeurs moyennes du paramètre T, présentées sur la figure III.8.a, sont calculées à partir des cartographies 2D, sur des anneaux concentriques adjacents d'épaisseur 100 μ m (comme schématisés sur la figure III.8.b), afin de mieux visualiser l'évolution du paramètre au cours du temps, et à la transition (interface) entre l'implant et l'os naturel.

Quel que soit le temps de régénération, les courbes présentées sur la figure III.8.a montrent clairement trois zones correspondant au défaut comblé, à l'interface puis à l'os naturel. L'analyse de ces 3 zones pour les 5 temps de régénération montre que l'épaisseur des cristaux dans la partie régénérée n'a pas encore atteint l'épaisseur observée dans les parties naturelles loin du site opératoire. Ces effets sont très marqués pour les temps de régénération courts malgré le saut dans les valeurs moyennes de l'épaisseur des cristaux enregistré à 8 semaines après l'implantation. Une récupération morphologique des cristaux (traduite ici par leur épaisseur) au cours du processus de régénération n'est visible que pour les échantillons prélevés à 20 semaines post-chirurgie. Cette récupération morphologique est plus marquée en s'éloignant du centre de défaut pour atteindre une épaisseur similaire à celle de l'os naturel autour de l'implant. À ce temps de régénération, la majorité de l'os régénéré (70 %) possède des cristaux ayant une épaisseur similaire à celle de l'os naturel. On peut aussi remarquer que la zone correspondant à l'interface entre l'os régénéré et l'os naturel, montre une transition graduelle de l'épaisseur sur quelques centaines de microns à tous les temps de régénération. Ce phénomène évolue en fonction du temps de régénération. En effet, l'amplitude de cette transition est la plus élevée pour les défauts évalués à 8 et 20 semaines post-chirurgie (21 Å \rightarrow 23,5 Å). Pour les évaluations à 8 semaines, l'augmentation de l'épaisseur des cristaux est observée uniquement dans la zone interfaciale (zone 2) alors que pour les évaluations à 20 semaines, elle est observée au niveau du défaut (zone 1). En effet, la courbe du paramètre T

à 20 semaines montre clairement que le décalage géographique de cette transition est dû à une homogénéisation de l'épaisseur des cristaux entre l'implant et l'os naturel autour du défaut.

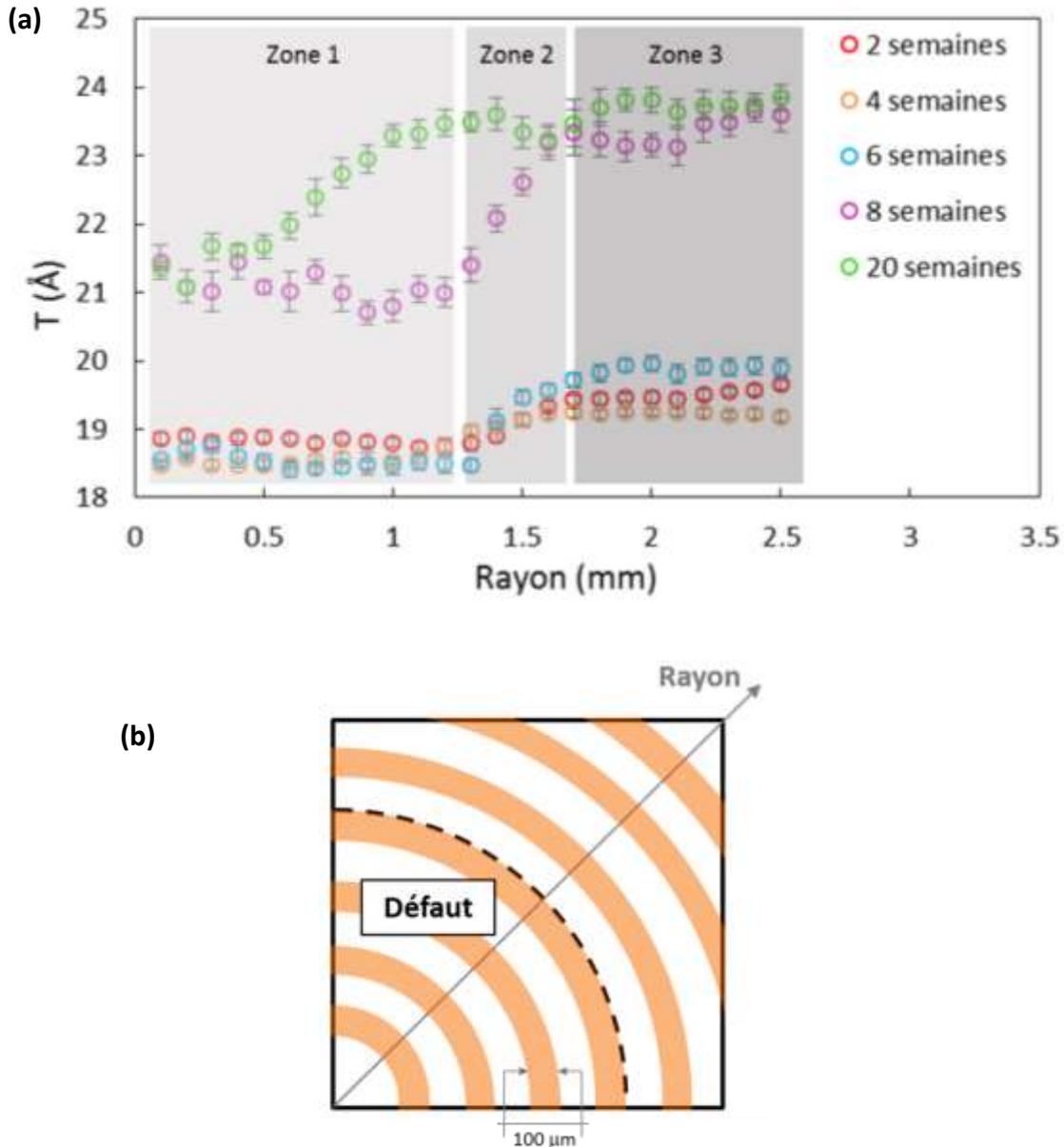


Figure III.8 : (a) Épaisseur des cristaux déterminée par SAXS en fonction du rayon pour les différents temps de régénération. (b) Principe de calcul adopté pour la détermination des valeurs moyennes du paramètre T à partir de la cartographie 2D de ce paramètre. Zone 1 : le défaut comblé (greffon osseux + os régénéré) ; zone 2 : interface et zone 3 : os naturel. Les résultats sont exprimés dans le panneau (a) en Angstrom (\AA) et sont présentés en moyenne ± 1 écart-type sur un intervalle compris entre 5 et 90 valeurs suivant la zone de calcul.

À 4 et 6 semaines, l'épaisseur moyenne dans la partie régénérée (zone 1) est légèrement inférieure à celle mesurée dans la partie régénérée à 2 semaines (respectivement une

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

épaisseur de $18,74 \pm 0,07 \text{ \AA}$, $18,67 \pm 0,15 \text{ \AA}$ et $18,87 \pm 0,05 \text{ \AA}$). Cette observation peut être expliquée par la néoformation osseuse avancée précédemment lors de l'analyse des observations histologiques et des évaluations par microtomographie X à ces temps de régénération. Au cours du temps, la phase minérale provenant de l'implant va être résorbée et remplacée par une autre, nouvellement formée, caractérisée par des cristaux plus minces (figure III.9). Comme nous l'avons observé précédemment sur les coupes histologiques, la formation osseuse est initiée dès les 2 premières semaines suivant la chirurgie et se poursuit pendant 6 semaines. Parallèlement, le remodelage du tissu (greffon et os néoformé) apparaît localement entre 4 et 8 semaines. Le défaut comblé à ce stade de régénération est donc un milieu hétérogène résultant de la résorption du greffon, de la néoformation et du remodelage osseux apparaissant localement dans le défaut. Il faut aussi garder à l'esprit qu'initialement, l'implant (le greffon osseux) contient des cristaux ayant des épaisseurs différentes (hétérogène de nature), étant donné que les rats donneurs sont jeunes (âgés de 8 semaines). La figure III.9 synthétise schématiquement l'évolution des épaisseurs des cristaux d'HA dans le défaut osseux (zone 1). La résorption progressive de l'implant et l'augmentation en nombre et en taille des cristaux dans l'os régénéré au cours du temps sont les deux principaux processus qui accompagnent l'évolution de l'épaisseur moyenne dans la partie régénérée (greffon + os néoformé).

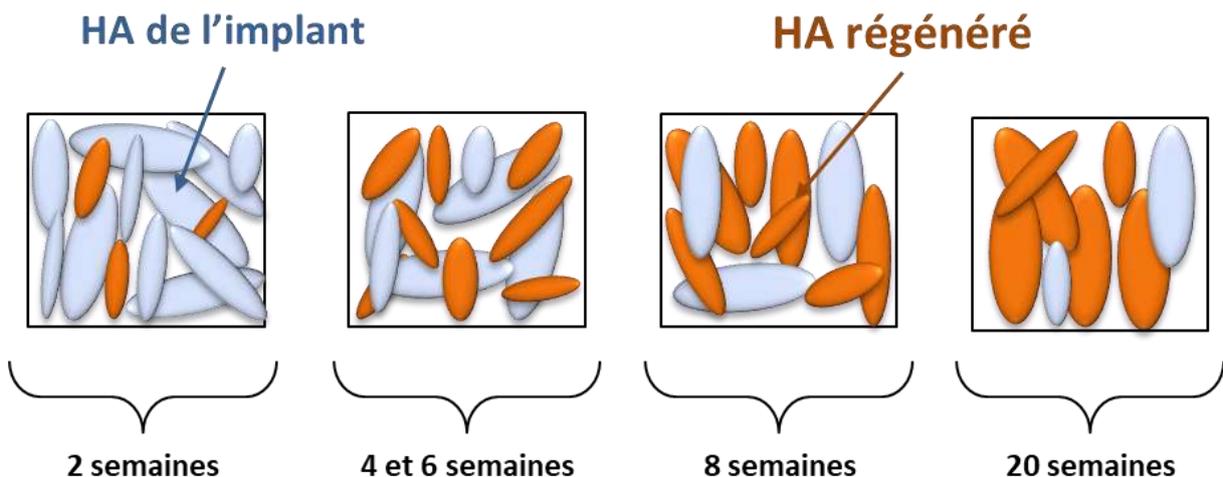


Figure III.9 : Représentation schématique de l'évolution des épaisseurs des cristaux d'HA dans le défaut osseux (greffon osseux et os régénéré).

L'évolution du paramètre T au cours du temps dans la zone 3 de la figure III.8.a (partie naturelle des rats opérés) peut être expliquée par un effet d'âge, traduit par l'augmentation des épaisseurs moyennes au cours de temps, et exposée précédemment dans la figure III.7. L'augmentation relative des épaisseurs entre 14 et 16 semaines (correspondant à 6 et 8 semaines de régénération) est brusque dans les parties naturelles (autour du défaut) chez les rats opérés (augmentation de $3,51 \text{ \AA}$) alors que l'évolution est graduelle et continue au cours du temps pour les rats non opérés ($0,71 \text{ \AA}$) (figure III.7 et tableau III.1). La comparaison de l'épaisseur moyenne entre des rats de même âge (exemple des rats de 28 semaines) opérés (20 semaines post-chirurgie) ($T = 23,72 \pm 0,21 \text{ \AA}$) et non opérés ($T = 25,00 \pm 0,07 \text{ \AA}$) montre

une différence systématique d'épaisseur des cristaux. L'évolution de l'épaisseur des cristaux liée à l'effet d'âge est donc plus lente dans le tissu naturel à proximité du défaut (tableau III.1), comparativement à une structure saine (non opéré).

Rat (os naturel)	10 semaines	12 semaines	14 semaines	16 semaines	28 semaines
Opéré	19,49 ± 0,07 Å	19,23 ± 0,06 Å	19,84 ± 0,12 Å	23,35 ± 0,23 Å	23,72 ± 0,21 Å
Non opéré	22,44 ± 0,05 Å	22,77 ± 0,09 Å	23,05 ± 0,07 Å	23,76 ± 0,07 Å	25 ± 0,07 Å

Tableau III.1 : Épaisseur moyenne des cristaux d'HA dans les calvarias des rats non opérés et dans les parties naturelles (zone 3, figure III.8.a) des calvarias implantées par greffe osseuse en fonction de l'âge. Les valeurs du tableau correspondent respectivement aux résultats de la figure III.7 et à la moyenne calculée dans la zone 3 de la figure III.8.a pour les différents temps de régénération. Les résultats sont exprimés en Angstrom (Å) et sont présentés en moyenne ± 1 écart-type sur un échantillon de 255 valeurs (resp. 1156) pour les rats opérés (resp. pour les rats non opérés).

Le tableau III.1 met en évidence un écart-type plus élevé dans le cas des rats opérés par rapport aux rats non opérés. L'hétérogénéité apparente du tissu adjacent au défaut peut s'expliquer par l'influence du processus de régénération, s'opérant au sein du défaut, sur le tissu natif à proximité, par un effet centrifuge. En effet, la régénération perturbe l'évolution de tissu autour du défaut. Cela peut également être la conséquence de l'inflammation qui s'installe au niveau du défaut dans les semaines post-opératoires.

En résumé, au cours du processus de régénération, l'âge a intrinsèquement pour effet d'augmenter l'épaisseur des cristaux. Deux points importants ont été mis en lumière dans la comparaison des épaisseurs moyennes après les différents temps de régénération. Tout d'abord, une augmentation de l'épaisseur des cristaux dans les parties naturelles a été mise en évidence, expliquée par le vieillissement naturel des rats, et qui atteint un palier à la fin des expériences. Ensuite, une homogénéisation des épaisseurs à 20 semaines sur l'ensemble de la zone étudiée (implant et partie naturelle) a été constatée. Ceci s'explique par la résorption d'une partie plus ou moins importante de l'implant et la synthèse d'une nouvelle matrice ayant des cristaux de taille proche de ceux de l'os naturel traduisant les effets du modelage et du remodelage.

III.5. Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré

La distribution spatiale des orientations des cristaux d'apatite dans l'os a été analysée à travers le facteur d'orientation d'Hermans, noté H. Dans notre étude, ce facteur d'orientation traduit l'orientation des cristaux par rapport à une direction de référence donnée. Ce facteur est déduit de l'analyse du profil du pic de diffraction {002} en WAXS selon la méthode détaillée dans le chapitre II. Il est à noter que le facteur d'orientation a été calculé systématiquement par rapport à la direction de traction qui correspond aussi à la direction préférentielle des cristaux d'apatite dans l'os crânien [Nakano et al. 2002].

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

La distribution du facteur H dans l'os naturel chez des animaux non opérés pour les différents âges étudiés (en particulier à 10 et 14 semaines, âges qui, pour rappel, correspondent à ceux des rats sacrifiés à 2 et 6 semaines post-chirurgie) montre que les cristaux s'orientent et s'organisent naturellement suivant le grand axe de l'os (figure III.10), caractérisé par des valeurs de H proche de 1. Une légère évolution dans le facteur H est néanmoins observée entre les animaux âgés de 10 et 12 semaines (figures III.10.a et III.10.b). En effet, à 10 semaines (ce qui correspond au début de l'expérience), les rats sont encore jeunes et les cristaux d'HA ne sont pas encore totalement organisés suivant une orientation préférentielle dans l'os. Chez les animaux plus âgés (à partir de 14 semaines) l'orientation des cristaux selon le grand axe (l'axe c) de l'os du crâne est alors bien visible (figures III.10.c et III.10.d).

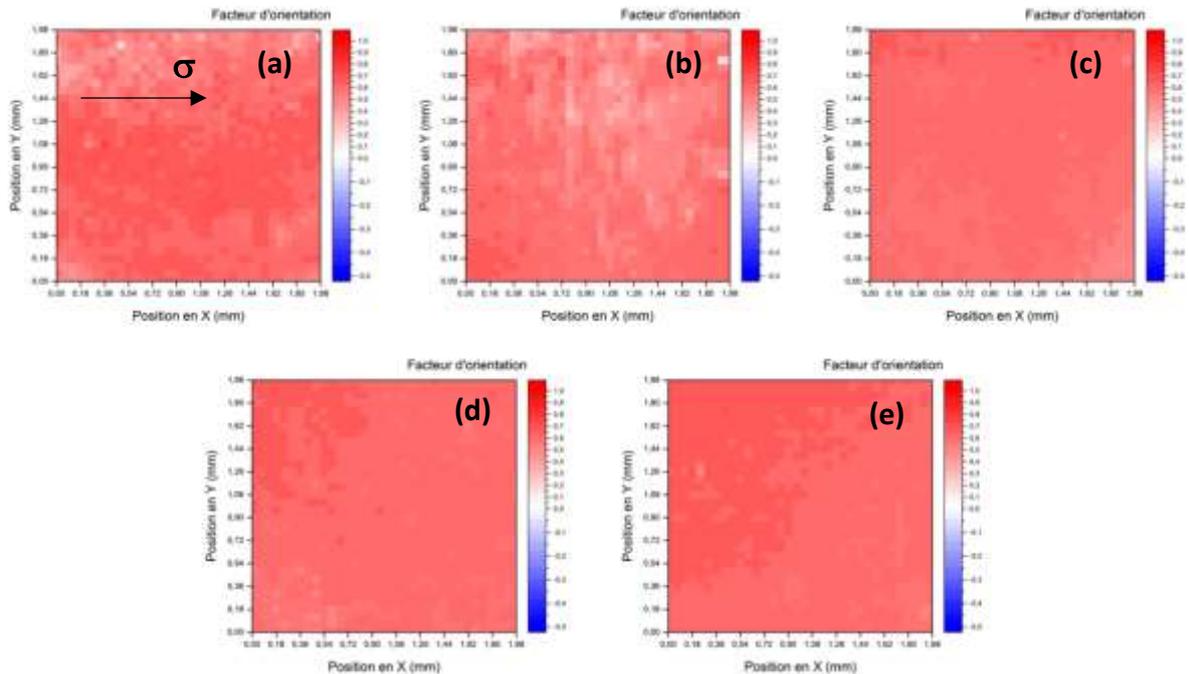


Figure III.10 : Cartographies du facteur d'orientation d'Hermans H chez des rats non opérés sacrifiés à différents âges, c'est-à-dire à (a) 10, (b) 12, (c) 14, (d) 16 et (e) 28 semaines (au début de l'expérience, l'âge des rats est de 8 semaines). La direction de sollicitation est représentée par σ .

La distribution du facteur d'orientation H, dans et autour du défaut comblé par un greffon osseux, est présentée sur la figure III.11 au travers des cartographies spatiales dans la zone d'intérêt choisie de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ pour les différents temps de régénération. Il est rappelé que le pas de mesure choisi est de $60 \mu\text{m}$ soit un nombre de points de mesure égal à 1156.

À 2 semaines de régénération (figure III.11.a), la distribution des orientations des particules minérales au sein du défaut est fortement aléatoire et ne présente aucune orientation préférentielle contrairement à la structure plus organisée observée dans la partie osseuse naturelle. D'autre part, l'interface entre le défaut implanté et l'os naturel est très visible sur cette cartographie à ce stade de régénération étant donné la variation brutale de l'organisation entre les deux tissus (régénéré et naturel).

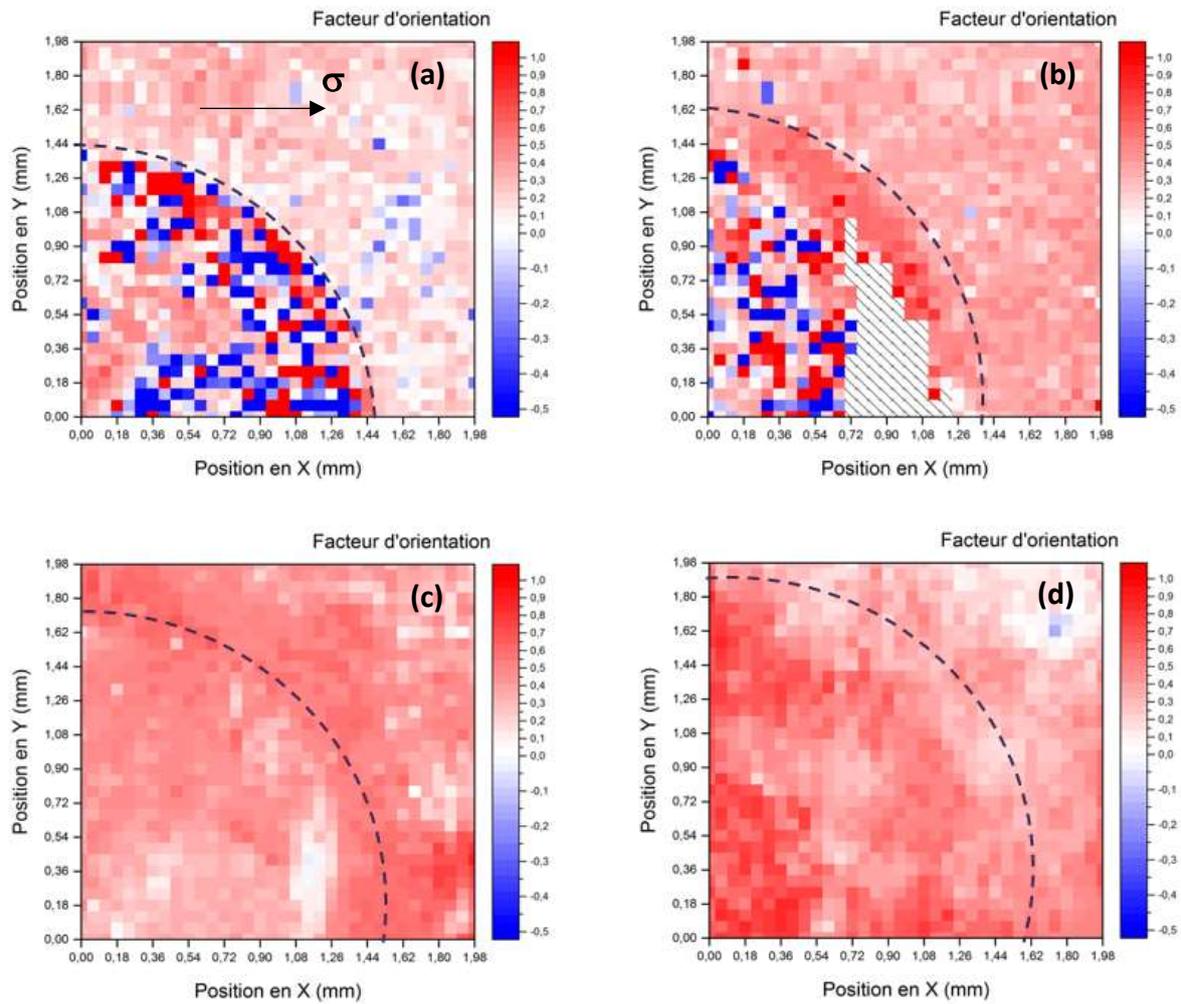


Figure III.11 : Cartographies du facteur d'orientation d'Hermans dans et autour du défaut (indiqué par des pointillés noirs) comblé par un greffon osseux après (a) 2, (b) 6, (c) 8 et (d) 20 semaines de régénération. La direction de sollicitation est représentée par σ .

À 6 semaines (figure III.11.b), le tissu présent dans le défaut (phases organique et minérale) est toujours majoritairement sans orientation particulière, excepté à l'interface entre l'os naturel et l'os régénéré, où l'orientation des cristaux est maintenant identique dans les deux tissus (néosynthétisé et natif). En revanche, la figure III.11.c indique clairement que l'organisation cristallographique des cristaux d'HA est, quant à elle, achevée à partir de 8 semaines de régénération. Les cartographies du facteur d'orientation H à 8 et 20 semaines sont homogènes et ne présentent quasiment plus aucune différence entre les deux tissus. D'un point de vue de l'orientation des cristaux, il n'y a donc plus d'évolution visible entre 8 et 20 semaines post-chirurgie contrairement aux épaisseurs obtenues par SAXS.

Ces résultats peuvent être corrélés à l'évaluation microarchitecturale évaluée par microtomographie X et aux activités biologiques observées dans la structure pendant le processus de la régénération. L'orientation aléatoire du défaut à 2 et 6 semaines de régénération s'explique par la présence des fragments d'os qui constituent le greffon osseux.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

Le greffon osseux n'est que partiellement résorbé à ce stade et une formation osseuse de type modelage (apposition osseuse à partir d'un site d'initiation non ciblé) démarre à la périphérie du défaut et autour des fragments osseux qui constituent l'implant. Pour certains échantillons, la minéralisation incomplète dans l'os régénéré induit des « trous » de minéralisation sur les reconstructions 3D réalisées au microtomographe (zones de tissu fibreux non minéralisé). Ces « trous » sont observés en périphérie du défaut, autour de l'os néoformé (figure III.5, microscan à 6 semaines). Ces « trous » sont visibles surtout dans les stades précoces de la cicatrisation et induisent également des zones non analysables dans les données WAXS (figure III.11.b zone hachurée de la cartographie à 6 semaines), puisque ce tissu fibreux est pauvre en cristaux (éléments diffractants). Cependant, la plupart des défauts sont comblés d'un tissu régénéré et calcifié. Enfin, l'organisation de la matrice minéralisée et la récupération de l'organisation spatiale à l'identique de celle du tissu naturel n'est obtenue qu'après 8 semaines de régénération pour un défaut de 3 mm de diamètre comblé par un greffon osseux. L'homogénéité de la cartographie du facteur H à 8 et 20 semaines post-chirurgie reflète la résorption progressive de l'implant et la synthèse d'une nouvelle matrice ayant des cristaux alignés avec ceux présents dans l'os naturel. À ce stade, la structure fibreuse n'est plus présente et seul l'os lamellaire (voir paragraphe I.1 et figure III.3) orienté du point de vue cristallographique est observé.

La figure III.8.a indique que la majorité des cristaux dans l'os néoformé (70 %) a une épaisseur proche de celle de l'os naturel après 20 semaines de régénération. En revanche, la figure III.11 montre clairement qu'une homogénéisation de l'orientation cristallographique des cristaux d'HA est observée plus tôt (8 semaines). Cela suggère que, dans un premier temps, la régénération osseuse consiste à combler le défaut osseux par un tissu riche en cristaux minces et bien orientés afin de rétablir la microarchitecture des éléments structuraux. Dans une deuxième étape, des phénomènes de résorption et de formation sont amorcés, entraînant alors un remplacement des fibres de collagènes et des cristaux d'HA provenant de l'implant par des nouveaux cristaux alignés avec ceux présents dans l'os naturel autour du défaut. Au cours de ces deux étapes, l'épaisseur des cristaux continue à évoluer avec le temps jusqu'à atteindre une valeur maximale qui reflète un état stable de la phase minérale.

III.6. Réponse mécanique des cristaux

III.6.1. Champs de déformation dans les cristaux d'HA

Les essais de traction *in situ* sous WAXS avec un microfaisceau synchrotron ont permis de déterminer spatialement la réponse en déformation (élastique) de la phase minérale (cristaux d'HA) de l'architecture osseuse. La figure III.12 montre les cartographies de la déformation longitudinale (i.e. selon la direction de traction) pour la famille de plans {002} des cristaux d'HA pour différents états de chargement (30 N, 40 N et 50 N) dans le cas de la stratégie de régénération par greffe osseuse à 2 semaines post-implantation. Dans ce cas, pour les mesures dans la direction de chargement, tous les cristaux participants au volume diffractant pour la famille de plans {002} vont avoir la normale au plan concerné parallèle au vecteur de diffraction qui est lui-même parallèle à la direction de sollicitation mécanique. Il est à noter que l'état de référence dans le calcul des déformations correspond à un état pré-chargé à 20N afin de s'affranchir de l'effet de la géométrie des échantillons d'os (cf. chapitre II, paragraphe I.2.1).

La forte hétérogénéité des propriétés mécaniques est soulignée par une distribution non uniforme du champ de déformation élastique de la phase minérale dans et autour du défaut, principalement due aux différences de forme (traduit ici par l'épaisseur) et de distribution spatiale des orientations cristallographiques des cristaux d'HA (facteur d'orientation H) entre les tissus nouvellement formés et naturels. Cette hétérogénéité est moins importante dans la zone correspondant à l'os naturel et diminue en s'éloignant du centre de défaut.

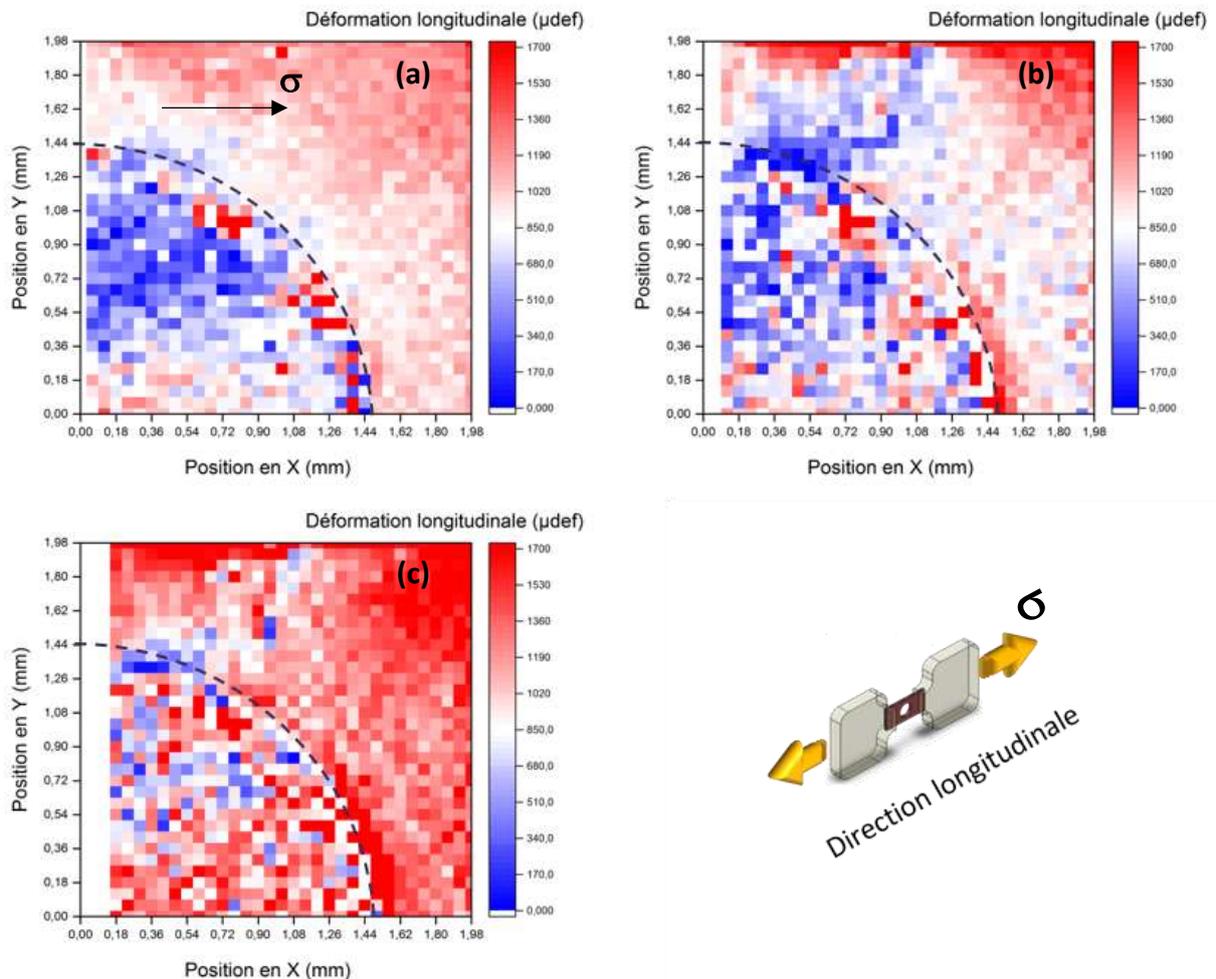


Figure III.12 : Cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans {002} dans les particules d'HA dans et autour du défaut comblé par un greffon osseux à 2 semaines de régénération pour une charge de (a) 30 N, (b) 40 N et (c) 50 N. Les valeurs des déformations sont données en microdéformations ($\times 10^{-6}$). La direction de sollicitation est représentée par σ .

Il est important de noter qu'à ce niveau d'analyse, la déformation moyenne dans l'implant ($589 \pm 267 \mu\text{def}$ à 30 N) est plus faible que celle de l'os naturel ($1167 \pm 103 \mu\text{def}$ à 30 N) ce qui résulte en une rigidité apparente relativement élevée de l'os nouvellement formé. En outre, une concentration de déformations élastiques (donc de contraintes) à l'interface os-implant, est observée pour les trois charges et s'accroît avec l'effort appliqué (figure III.12.c). Cette rigidité apparente pourrait être expliquée par un phénomène de transfert de charge. En effet, comme nous l'avons démontré précédemment, à 2 semaines, le phénomène de remodelage n'est pas encore rétabli et l'implant n'est pas encore résorbé à ce stade de régénération. Les

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

architectures en 3D obtenues par microtomographie X des calvarias à 2 semaines de régénération (figure III.5) montrent que la formation osseuse dans le défaut est incomplète et les coupes histologiques au même stade indiquent que des tissus mous (tissu fibreux et ostéoïde) comblent le défaut autour du greffon et assurent la liaison entre les fragments osseux de l'implant et l'os naturel en périphérie (figure III.3). Cette discontinuité de milieu provoque donc également une discontinuité mécanique entre les parties naturelle et régénérée de l'os. Ceci a pour conséquence de provoquer un faible transfert de charge entre les deux parties et ainsi une zone de concentration de déformations élastiques (donc de contraintes) importante au niveau de l'interface entre le tissu de comblement du défaut et l'os naturel. L'effort mécanique supporté par le tissu de comblement n'est alors pas équivalent à celui supporté par la partie naturelle.

Les cartographies des déformations longitudinales (dans la direction du chargement) de la famille de plans {002} des cristaux d'HA dans et autour du défaut comblé par le greffon osseux pour une charge de 30 N à 2, 6, 8 et 20 semaines de régénération sont présentées sur la figure III.13.

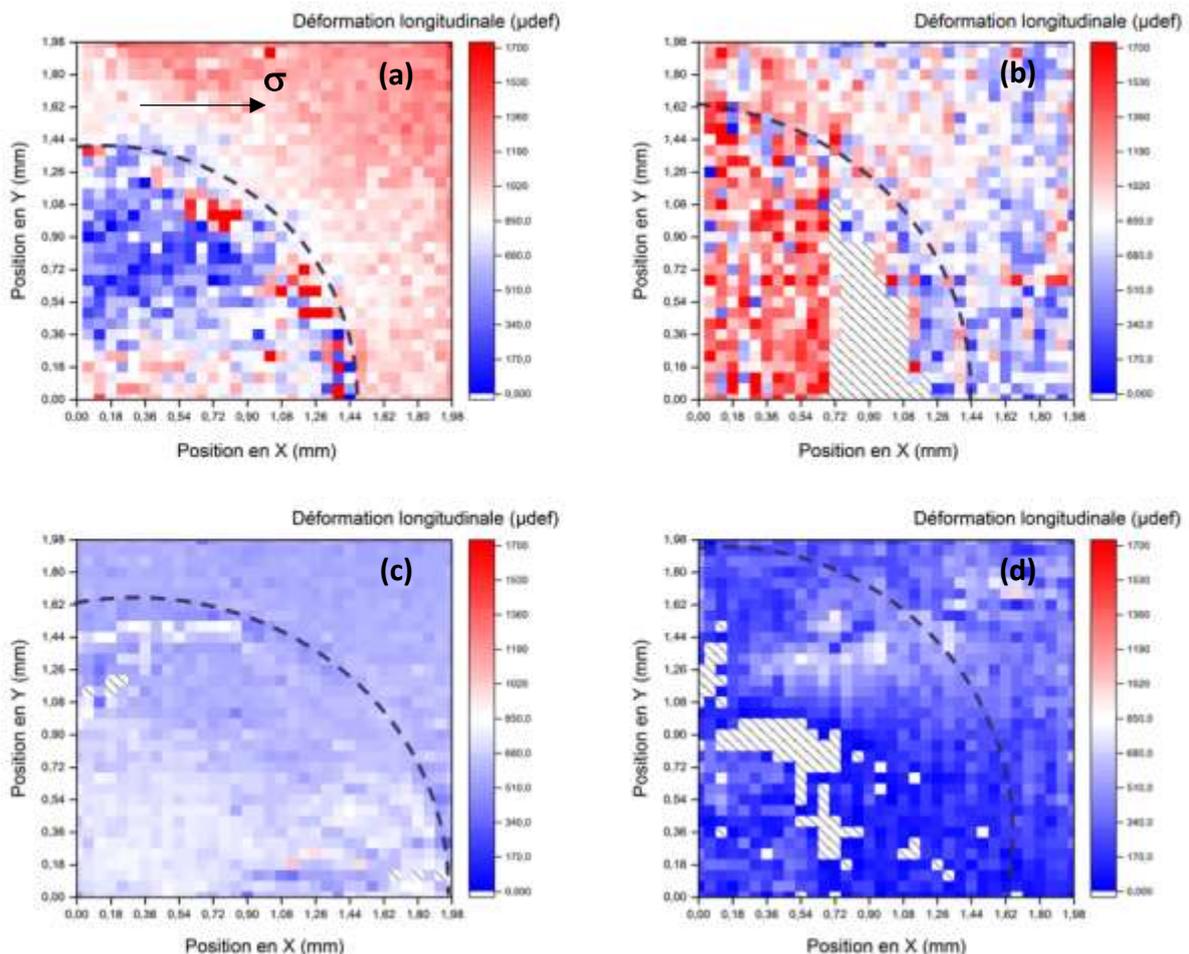


Figure III.13 : Cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans {002} dans les particules d'HA dans et autour du défaut comblé par un greffon osseux à (a) 2, (b) 6, (c) 8 et (d) 20 semaines de régénération pour une charge de 30 N. Les valeurs des déformations sont données en microdéformations ($\times 10^{-6}$). La direction de sollicitation est représentée par σ .

À 6 semaines de régénération, la déformation moyenne de l'os régénéré est, cette fois-ci, nettement supérieure à celle mesurée dans l'os naturel. En effet, la déformation moyenne dans l'implant est de $1105 \pm 191 \mu\text{def}$ pour une déformation de $789 \pm 186 \mu\text{def}$ dans l'os naturel (tableau III.2). Ceci implique une rigidité apparente plus faible dans l'implant et donc que la fonction mécanique de l'os au niveau de l'implant n'est pas encore restaurée. En effet, l'os nouvellement formé présente un module d'élasticité E apparent inférieur comme le montre le taux élevé de déformation observé dans le défaut comparativement à l'os naturel à 6 semaines de régénération. Il est à noter, que pour des chargements plus élevés (50 N), on a un comportement similaire entre l'implant et l'os naturel avec une rigidité apparente toujours plus faible dans l'os régénéré (cf. figure III.14).

Déformation moyenne (μdef)	2 semaines	6 semaines	8 semaines	20 semaines
Tissu osseux régénéré	589 ± 267	1105 ± 191	733 ± 53	385 ± 70
Tissu osseux naturel	1167 ± 103	789 ± 186	586 ± 33	440 ± 41

Tableau III.2 : Déformations longitudinales moyennes pour les groupes de cristaux d'HA correspondant à la famille de plans {002} dans le tissu osseux régénéré et dans la zone autour du défaut comblé par un greffon osseux pour les différents temps de régénération et pour une charge de 30 N. Les résultats sont exprimés en μdef et sont présentés en moyenne ± 1 écart-type sur un échantillon de 250 valeurs.

Ces observations peuvent s'expliquer par la fragilisation de la structure, occasionnée par l'importante zone non minéralisée entre l'os naturel et l'os régénéré, qui a été mise en évidence lors de l'analyse 3D par microtomographie X, et ce, malgré le comblement de la plus grande partie du défaut. Cette zone correspond à la surface hachurée sur la cartographie des déformations obtenue par WAXS (figure III.13.b). Cette zone correspondant donc aux points d'analyse où la mesure du pic {002} n'a pu être réalisée du fait de la présence d'un tissu non minéralisé. Ceci s'explique par un manque de support matériel dans cette zone particulière du défaut qui est dû à l'échappement d'une partie de l'implant pendant ou après l'opération (implantation et suture).

La distribution du champ de déformation des cristaux d'HA révèle que la qualité de résistance mécanique du tissu osseux est significativement différente entre l'os naturel et l'os nouvellement formé à ce stade de régénération (6 semaines). En effet, l'implant (greffon osseux + l'os néoformé) a un comportement complètement différent de l'os naturel autour du défaut et la transition entre les deux zones est abrupte (limite de l'implant à 2 et 6 semaines très bien définie (figure III.13)). D'autre part, l'analyse des déformations moyennes dans les parties naturelles et régénérées reflète des écarts-types élevés à 2 et 6 semaines (tableau III.2) qui illustrent l'hétérogénéité mécanique de la structure à ce stade de régénération. Dans certains cas, notamment pour les échantillons à 4, 8 et 20 semaines de régénération, les résultats des chargements à 50 N ne sont pas disponibles à cause d'un décollement de l'échantillon osseux de la résine qui constitue les mors ou d'une rupture précoce dans l'os au cours de la sollicitation.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

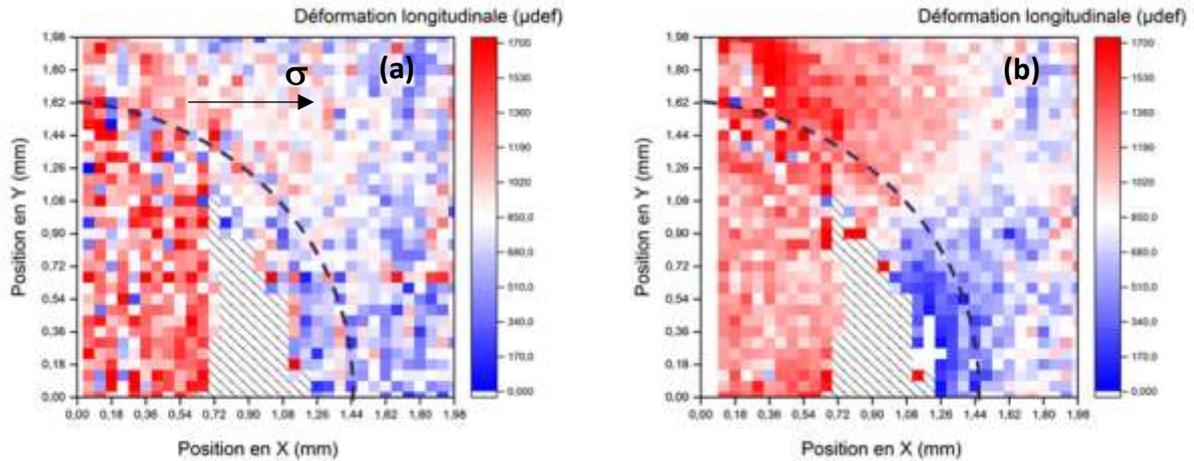


Figure III.14 : Cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans $\{002\}$ dans les particules d'HA dans et autour du défaut comblé par un greffon osseux à 6 semaines de régénération pour une charge de (a) 30 N et (b) 50 N. Les déformations sont données sous forme de microdéformations ($\times 10^{-6}$). La direction de sollicitation est représentée par σ .

Pour les temps de régénération plus longs (8 et 20 semaines), l'hétérogénéité des propriétés mécaniques du tissu osseux est beaucoup moins marquée, soulignée, à ce stade de régénération, par une distribution plus homogène et uniforme du champ de déformation élastique de la phase minérale dans et autour du défaut. En effet, la déformation moyenne dans l'implant à 8 semaines est de $733 \pm 53 \mu\text{def}$ pour une déformation de $586 \pm 33 \mu\text{def}$ pour la partie naturelle soit une différence de 20 %. Alors que les mesures par microtomographie X démontrent clairement un comblement total du défaut après 8 semaines (figure III.4), les champs de déformation indiquent que la fonction mécanique de l'os au niveau de l'implant n'est pas encore restaurée, bien que la charge mécanique supportée par le défaut soit déjà plus importante à 8 semaines (problème de transfert de charge moins important) comparées à 2, 4, et 6 semaines (ou la charge appliquée est principalement supportée par l'os naturel environnant). La récupération du comportement mécanique dans le nouvel os est, à cette échelle d'analyse, quasiment totale à 20 semaines avec des valeurs de déformations similaires dans les deux régions (tableau III.2). Ainsi, à 8 semaines post-implantation, l'os régénéré n'a pas encore achevé la fin du remodelage lui permettant de recouvrer des propriétés élastiques similaires à celles de l'os naturel. Le remodelage, qui se caractérise par une réorganisation de la distribution de la phase minérale dans l'os remodelé et une réorientation de ses cristaux dans la nouvelle matrice, stimule l'évolution de la réponse mécanique.

À 20 semaines, l'interface est invisible entre le défaut et l'os naturel pour les mesures WAXS. Seul le report de la position du défaut identifiée sur la figure III.13 sur la cartographie des déformations a permis de délimiter les deux zones. L'homogénéisation du champ de déformation observable dans le défaut, comparativement à l'os naturel à 20 semaines, démontre que le module élastique E des cristaux régénérés est très proche de celui des cristaux présents initialement dans l'os naturel environnant (figure III.13.d et tableau III.2). Il est à noter aussi qu'à 20 semaines, les déformations dans les deux zones sont plus faibles qu'à 8 semaines ($733 \pm 53 \mu\text{def}$ et $586 \pm 33 \mu\text{def}$, respectivement, mesurées dans les parties régénérée et naturelle à 8 semaines comparées à $586 \pm 33 \mu\text{def}$ et $440 \pm 41 \mu\text{def}$ mesurées à 20 semaines). Le matériau est donc globalement plus rigide avec le temps par un effet d'âge.

Les niveaux des déformations analysées dans la calvaria des rats non opérés diminuent au cours du temps. Cela résulte d'un changement dans la structure de l'os avec l'âge (figure III.15). La matrice osseuse se densifie avec une augmentation du taux de minéralisation et elle montre une rigidité plus élevée avec l'âge. En effet, on a vu précédemment qu'avec l'âge, les cristaux s'orientent selon le grand axe de l'os (correspondant ici à l'axe de traction) et leur épaisseur augmente. Les minéraux confèrent donc à l'os sa rigidité et leur organisation maximise sa résistance aux efforts appliqués. Les deux courbes présentées sur la figure III.15 présentent la même tendance. La microstructure de la partie naturelle est en évolution continue au cours de la régénération, induisant naturellement une évolution couplée de la réponse mécanique des os avec l'âge.

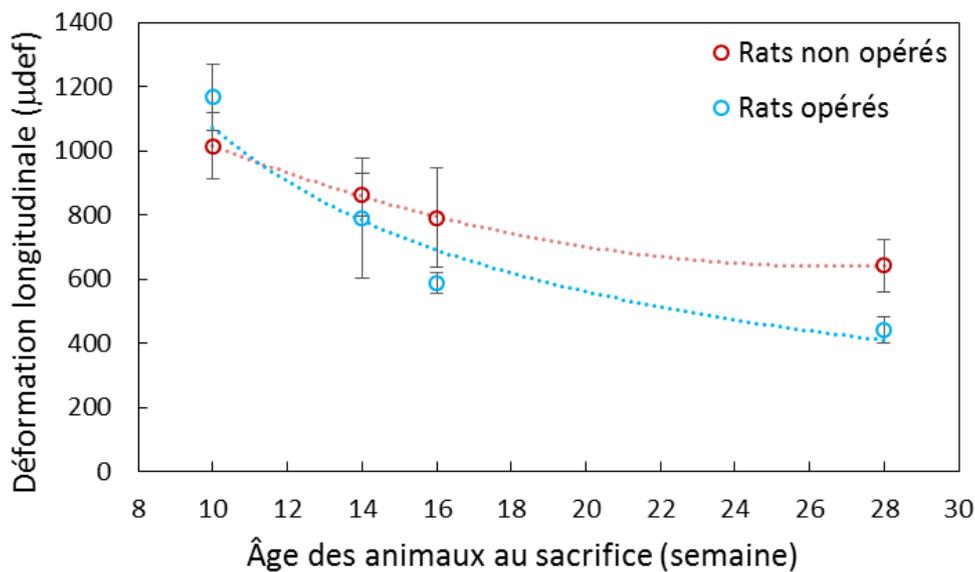


Figure III.15 : Déformations longitudinales moyennes de la famille de plans {002} dans les particules d'HA, dans la partie naturelle des rats ayant reçu une greffe osseuse et dans les calvarias des rats non opérés, en fonction de l'âge au sacrifice pour une charge de 30 N (au début de l'expérience, l'âge des rats est de 8 semaines). Les résultats sont exprimés en μdef et sont représentés en moyenne ± 1 écart-type sur un échantillon de 255 valeurs (resp. 1156) pour les rats opérés (resp. pour les rats non opérés).

En résumé, les changements structurels (d'un tissu non organisé à un tissu organisé), à 8 semaines de régénération, provoquent des modifications dans la situation mécanique de l'os. L'évolution des propriétés mécaniques de l'os régénéré débute avec l'initiation du processus de remodelage à 8 semaines et se poursuit à 20 semaines conduisant à un os fonctionnel majoritairement restauré. Le point critique de la régénération est l'adhésion entre l'implant (greffon osseux) et l'os environnant. La discontinuité de milieu, due à une interface affaiblie (os-implant), est donc à l'origine d'un problème de transfert de charge entre l'os régénéré et la partie naturelle environnante à des temps courts (entre 2 et 6 semaines de régénération). Entre 8 et 20 semaines après l'implantation, une meilleure transmission de la charge est constatée expérimentalement. Ceci traduit la cicatrisation effective de l'interface. L'homogénéisation dans la réponse en déformation (élastique) de la phase minérale de

l'architecture osseuse entre le défaut et l'os naturel à 20 semaines s'explique par une restauration des propriétés élastiques des cristaux régénérés qui ont un comportement mécaniquement proche de celui des cristaux présents initialement dans l'os naturel.

III.6.2. Nanoindentation

La quantification des propriétés élastiques de l'os à l'échelle des ostéons est apportée par la mesure du module d'indentation E_r et de la dureté H_b . Ces mesures ont été réalisées sur les échantillons après 8 et 20 semaines de régénération. Les mesures de nanoindentation ont été réalisées suivant la direction longitudinale des éprouvettes (correspondant à l'axe de traction des essais mécaniques).

L'analyse des modules E_r et de la dureté H_b mesurés dans les parties naturelles montrent que l'âge des rats peut avoir une incidence sur les mesures de nanoindentation (tableau III.3). Le module élastique mesuré dans l'os naturel (mesuré dans une partie naturelle à proximité du site opératoire, chez les contrôles) évolue de ≈ 17 GPa à ≈ 23 GPa et la dureté H_b de $\approx 0,6$ GPa à $0,8$ GPa, sur les prélèvements réalisés après 8 et 20 semaines post-chirurgie (l'âge de départ des rats est de 8 semaines). À cette échelle d'étude, les changements dans les propriétés mécaniques de l'os, dus à l'effet de l'âge, suivent la même tendance que ceux observés à l'échelle des cristaux.

Échantillon	H_b (GPa) dans l'os naturel	E_r (GPa) dans l'os naturel	H_b (GPa) dans l'os régénéré	E_r (GPa) dans l'os régénéré
Contrôle négatif (16 semaines)	$0,6 \pm 0,1$	$16,7 \pm 1,7$	$0,20 \pm 0,04$	$4,5 \pm 1,5$
Contrôle négatif (28 semaines)	$0,8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 2,7$	$0,3 \pm 0,1$	$6,7 \pm 2,9$
BG (16 semaines)	$0,5 \pm 0,08$	$17,9 \pm 2,5$	-	-
BG (28 semaines)	$0,6 \pm 0,1$	$22,2 \pm 2,8$	$0,30 \pm 0,04$	$7,2 \pm 0,4$

Tableau III.3 : Module élastique E_r et dureté H_b dans l'os régénéré et dans l'os naturel dans le cas des défauts comblés par un greffon osseux (BG) et des défauts laissés vides (contrôle négatif) à un âge de sacrifice de 16 et 28 semaines (correspondant à 8 et 20 semaines de régénération), mesurés par nanoindentation instrumenté. Les résultats sont exprimés en GPa en moyenne ± 1 écart type ($n = 15$).

Les mesures réalisées sont distribuées sur une ligne de mesure couvrant les différentes zones identifiées par SAXS et allant de la partie naturelle jusqu'à l'os régénéré et passant par une interface. La distribution du module d'indentation dans les défauts comblés par greffe osseuse à 20 semaines de régénération et les défauts laissés vides (rats de 28 semaines) est illustrée sur la figure III.16.

Les changements brusques dans les codes de couleurs de la figure III.16, traduisent les variations brutales dans les modules d'indentation E_r entre l'os naturel et l'os régénéré dans les deux cas étudiés (BG et contrôle négatif) à un temps de régénération de 20 semaines. Huit semaines après l'opération, le module élastique et la dureté mesurés dans la partie régénérée des contrôles négatifs ($E_r = 4,5$ GPa $\pm 1,5$; $H_b = 0,20 \pm 0,04$ GPa), sont nettement inférieurs à ceux de l'os naturel ($E_r = 16,7 \pm 1,7$ GPa ; $H_b = 0,6 \pm 0,1$ GPa). Ces propriétés évoluent entre 8

et 20 semaines (tableau III.3), mais n'atteignent toujours pas les propriétés mesurées dans l'os naturel.

Les mesures par nanoindentation, dans la partie régénérée dans les défauts implantés par un greffon osseux n'ont pas été réalisées, du fait que l'échantillon a été endommagé lors de l'opération de polissage. Vingt semaines après l'opération, le tissu osseux régénéré présente, à cette échelle d'analyse, un module élastique et une dureté toujours plus faibles (respectivement, 7,2 et 0,3 GPa) que le module élastique et la dureté moyens déterminés dans l'os naturel (respectivement, 22,2 et 0,6 GPa) (tableau III.3). Ceci est constaté en nanoindentation malgré un comblement de 54 % et une parfaite restauration de la microarchitecture de ces éléments structuraux (cristaux d'HA), illustrée par l'épaisseur des cristaux et une organisation de la matrice régénérée suivant le grand axe de l'os crânien (facteur H).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le processus de remodelage qui a débuté à 8 semaines est encore non achevé après 20 semaines de régénération. Les différences de structure du tissu osseux, qu'il soit juste formé (apposition simple) ou remodelé, sont à l'origine de la diminution du module d'indentation. En effet, les images des microstructures, présentées sur la figure III.16, montrent clairement les différences dans l'organisation des lamelles entre l'os naturel et l'os régénéré. Il est à rappeler ici, que les champs de déformation dans les cristaux (résultats WAXS) montrent une homogénéisation entre le tissu osseux naturel et le tissu régénéré (avec des valeurs proches de la déformation moyenne : $440 \pm 41 \mu\text{def}$ dans la partie naturelle et $385 \pm 70 \mu\text{def}$ dans la partie régénérée).

Comme indice de la fonction mécanique de l'os régénéré à l'échelle des ostéons, le module élastique E_r et la dureté mesurés dans l'os régénéré au niveau des défauts laissés vides et des défauts ayant reçu une greffe osseuse ne montrent pas de différences remarquables entre les deux situations (respectivement, $6,7 \pm 2,9$; $0,3 \pm 0,1$ GPa et $7,2 \pm 0,4$; $0,30 \pm 0,04$ GPa). Cela suggère que le tissu régénéré en absence de l'implant (contrôle négatif) et le tissu régénéré avec un greffon osseux (partie régénérée avec BG) possèdent les mêmes propriétés mécaniques à l'échelle de l'analyse en nanoindentation. La greffe osseuse permettrait alors simplement d'accélérer le comblement. Le tissu néoformé autour d'un greffon osseux est un tissu qui évolue au cours du temps et qui possède un comportement mécanique similaire à celui d'un tissu osseux qui se développerait sur un autre support qu'il soit fibreux ou osseux. L'avantage de la greffe osseuse est d'obtenir un volume osseux conséquent plus rapidement. Mais la résistance mécanique locale du tissu régénéré ne montre pas une évolution importante à cette échelle.

Ces points de mesure nous ont permis de quantifier les variations locales du module d'indentation dans l'os régénéré. Sur une distance d'environ 400 μm , les valeurs de ce module dans l'os régénéré dans le cadre de l'implantation d'un greffon osseux sont beaucoup moins dispersées par rapport à celui du contrôle négatif à ce stade de régénération (20 semaines). Le module élastique d'indentation est, respectivement, de $7,2 \pm 0,4$ GPa et $6,7 \pm 2,9$ GPa. En effet, lorsque l'on n'examine que le tissu osseux nouvellement formé dans les défauts initialement non comblés (contrôle négatif), les valeurs diminuent en s'éloignant de l'interface, ce qui résulte en une variation plus élevée des valeurs moyennes du module élastique et de la dureté traduite par un écart-type plus important.

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

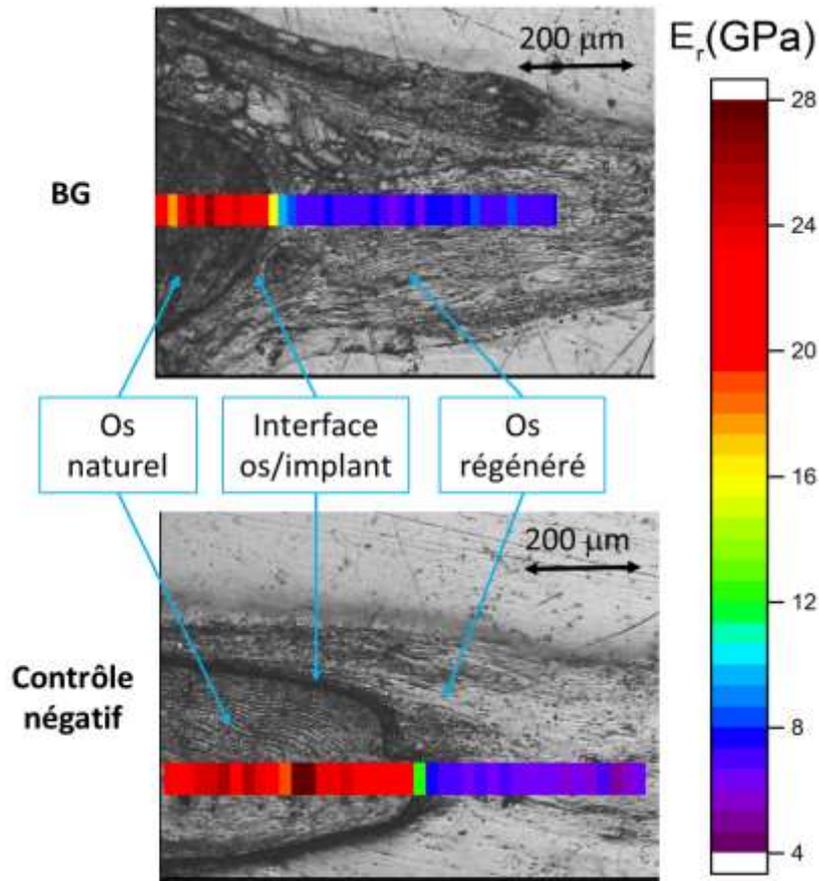


Figure III.16 : Module élastique E_r de l'os, régénéré et naturel, pour des défauts ayant reçu une greffe osseuse (BG) et des défauts laissés vides (contrôle négatif) à 20 semaines de régénération, mesuré par nanoindentation.

Finally, the local mechanical properties of the regenerated bone in the context of the implantation of a bone graft or in the context of spontaneous regeneration (negative control) are almost identical. The presence of the graft accelerates the filling of the defect and increases the bone regrowth, but it does not influence the mechanical properties of the newly formed tissue. Twenty weeks after the operation, the regenerated bone tissue, at the scale of the analysis of osteons, presents an elastic modulus and a hardness always lower than those of the natural part. This is explained by the differences in the organization of lamellae between natural bone and regenerated bone and by the fact that the remodeling process that started at 8 weeks is still not completed.

III.7. Conclusions

L'analyse de l'évolution de l'état mécanique, microstructural et biologique au cours de la régénération montre une forte corrélation entre la résistance mécanique osseuse et les processus biologiques en cours (résorption/formation). L'évolution de la taille des cristaux ainsi que la distribution spatiale de leur orientation cristallographique sont guidées par une activité cellulaire spécifique qui caractérise chaque étape de régénération (résorption et/ou formation).

Les essais de traction *in situ* en SAXS et WAXS avec un microfaisceau synchrotron et l'expertise complète des processus biologiques (la microarchitecture, l'activité cellulaire des ostéoblastes et ostéoclastes...), intervenant au niveau microscopique dans le processus de la réparation osseuse, ont montré que la régénération est caractérisée par une séquence d'évènements qui influencent les propriétés mécaniques de l'os à différentes échelles.

Dans le cadre de la réparation d'un défaut crânien par une greffe osseuse, ces événements peuvent être décrits de la manière suivante :

- Le tissu inflammatoire qui se forme dès les premières semaines de régénération (2 à 4 semaines) n'est pas suffisant pour assurer le transfert de charges entre les fragments osseux du greffon et l'os naturel autour du défaut. Malgré le rôle de ce tissu qui vient créer une continuité entre l'implant et l'os natif, le milieu peut être considéré comme un milieu discontinu du point de vue mécanique.
- L'implant n'est que partiellement résorbé pendant les premières semaines (entre 2 et 6 semaines) de régénération. Cela explique les orientations aléatoires des cristaux d'HA dans la partie régénérée qui se compose, à ce stade de régénération, du greffon osseux (petits fragments d'os) peu résorbé et de l'os néoformé principalement situé au périmètre du défaut et autour du greffon. Les défauts osseux sont initialement comblés par un tissu peu organisé (os fibrillaire ou « woven bone »). Ce tissu est ensuite résorbé et laisse place à un nouveau tissu osseux dans lequel les fibres et les cristaux d'HA sont mieux organisés.
- À partir de 8 semaines, le phénomène de remodelage a été initié et c'est à ce temps de régénération spécifique qu'on a pu mettre en évidence des modifications marquées dans les propriétés mécaniques et microstructurales de l'os régénéré à l'échelle nanométrique (amélioration dans la résistance mécanique, évolution dans l'épaisseur des cristaux et organisation parfaite des cristaux).
- La corrélation entre la taille des cristaux, leur organisation dans le tissu osseux nouvellement synthétisé et leur comportement mécanique à différents stades de régénération montrent que l'arrangement des cristaux maximise la résistance en traction. En effet, une récupération morphologique parfaite et une organisation des cristaux d'HA dans la matrice néoformée à 20 semaines induisent une homogénéisation entre les propriétés mécaniques de l'os régénéré et celles de l'os natif.
- Par contre, les mesures de nanoindentation à une échelle d'analyse supérieure (échelle des ostéons) à celle des analyses faites en diffraction (échelle des cristaux), ont montré que les propriétés mécaniques du tissu néoformé dans un défaut osseux ne sont pas influencées par la présence ou non du greffon osseux. La greffe osseuse augmente la repousse et accélère le comblement du défaut. Le tissu néoformé, dans ce cas, possède des propriétés mécaniques similaires au tissu néoformé

III. Caractérisations biologiques, microstructurales et mécaniques du tissu régénéré

spontanément (trou vide). Les propriétés mesurées en nanoindentation dans la partie régénérée sont toujours très inférieures à celles de la partie naturelle.

Le chapitre suivant sera dédié de manière similaire à l'étude des deux autres stratégies de régénération choisies dans notre étude. Ceci permettra alors, dans le dernier chapitre, de mieux comparer l'état mécanique et la microstructure du tissu néoformé pour les différentes stratégies étudiées et de corrélérer les phénomènes biologiques mis en jeu afin d'évaluer pleinement le succès clinique des différents types d'implants.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

IV.1.	Introduction.....	121
IV.2.	Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique	121
IV.2.1.	Description générale de la repousse (comblement du défaut) en fonction du temps.....	121
IV.2.2.	Description des défauts comblés par le BCP seul.....	123
IV.2.3.	Description des défauts comblés avec BCP + TBM.....	126
IV.3.	Evaluation micro architecturale	130
IV.4.	Épaisseur moyenne des particules minérales	135
IV.5.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré	136
IV.6.	Réponse mécanique des cristaux.....	139
IV.6.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	139
IV.6.1.	Nanoindentation	143
IV.7.	Conclusions.....	148

IV.1. Introduction

Imiter la nature et reproduire un tissu biologique tel que l'os fait toujours l'objet de nombreuses études. Dans certains cas de pertes osseuses critiques, le processus de réparation naturel peut être mis en échec, ce qui motive l'emploi de greffes osseuses (BG) afin d'accélérer la cicatrisation osseuse. En effet, c'est l'os lui-même (sous forme de greffe osseuse - BG) qui reste aujourd'hui le matériau le plus favorable à cette régénération osseuse. Néanmoins, le prélèvement des greffons ainsi que la morbidité et les dommages induits au site donneur sont les limites importantes de son utilisation. Aujourd'hui, la médecine régénérative évolue vers une chirurgie de moins en moins invasive par le développement de matériaux synthétiques capables de remplacer le BG, dans le but de réussir la récupération de la structure et la fonction des tissus perdus tout en en réduisant la morbidité importante. En effet, grâce au progrès de l'ingénierie tissulaire (matériaux plus ou moins biodégradables, utilisation de facteurs de croissance, incorporation de cellules (CSM, moelle osseuse...), ...), il est possible d'améliorer l'efficacité de la reconstruction des défauts osseux en se basant sur l'implantation de biomatériaux.

Actuellement, les céramiques à base de phosphate de calcium, seules ou associées à d'autres molécules (matériaux composites), sont communément utilisées en tant que substituts osseux de comblement grâce à leur ostéoconductivité ainsi que leur similarité en matière de composition chimique avec la partie minérale de l'os. La régénération osseuse par implantation de matériaux synthétiques ne se limite pas au simple comblement de défaut. Elle inclut également une récupération fonctionnelle rapide de la zone cicatrisée traduite par la tolérance à supporter les sollicitations mécaniques et par le développement d'une structure similaire à l'os d'origine, d'un point de vue microscopique.

Le premier objectif de ce quatrième chapitre est d'étudier l'évolution de la régénération osseuse de défauts crâniens qui ont été comblés par une matrice synthétique à base de phosphate de calcium biphasé (BCP) qui servira de support pour la migration et l'ancrage des cellules osseuses. Ces défauts sont identiques à ceux comblés par un greffon osseux dans le chapitre III. Le second objectif est de comparer la régénération osseuse obtenue en associant de la moelle osseuse totale (Total Bone Marrow : TBM) aux grains de BCP dans les mêmes conditions expérimentales.

IV.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique

Les différentes colorations histologiques effectuées sur les coupes réalisées au niveau du défaut (coupes frontales), pendant la régénération osseuse (cf. chapitre II) ont pour but de mettre en évidence les événements tissulaire et cellulaire se succédant dans et autour du défaut.

IV.2.1. Description générale de la repousse (comblement du défaut) en fonction du temps

Une première évaluation du comblement du défaut par un matériau synthétique montre que l'implantation du BCP seul ne favorise pas une régénération osseuse suffisante au niveau

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

macroscopique. En effet, comme le montrent les coupes de la figure IV.1, la formation d'un tissu mou fibreux, qui fait suite à l'inflammation induite par l'opération, est observable dès les premières semaines après la chirurgie. Néanmoins, peu ou pas de repousse osseuse a été constatée même à des temps plus longs. À ce niveau d'étude, ces observations peuvent valider l'absence d'efficacité du BCP utilisé seul dans le comblement d'un défaut osseux et mettre en évidence ses capacités limitées à stimuler la néoformation.

La figure IV.1 montre également clairement que l'ajout de la moelle osseuse (TBM) a un effet marqué sur la régénération osseuse à partir d'un matériau synthétique (BCP). En effet, la formation osseuse débute rapidement après implantation du mélange BCP + TBM (présence de tissu ostéoïde dès 2 semaines : marquage rouge sur les coupes de la figure IV.1) et un nouvel os apparaît dans le volume du défaut (tissu vert sur les coupes de la figure IV.1, à 8 et 20 semaines de régénération). Du point de vue biologique, l'association de la moelle osseuse au BCP favorise la régénération osseuse et présente des similitudes avec la régénération par greffon osseux.

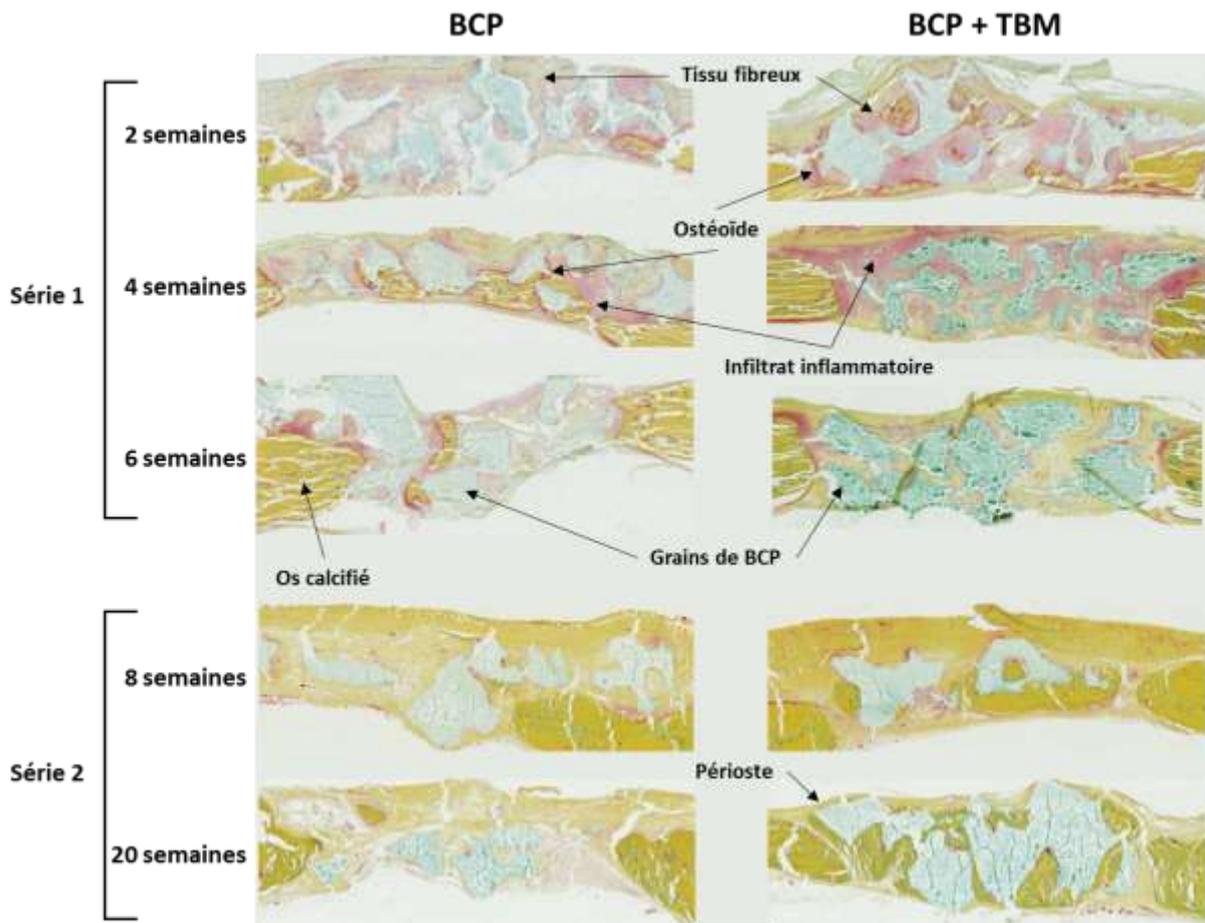


Figure IV.1 : Coupes histologiques frontales à 2, 4, 6, 8 et 20 semaines de régénération au niveau des défauts comblés par des grains de BCP seuls ou avec moelle osseuse (BCP + TBM). Une coloration au pentachrome de Movat a été réalisée. Les séries 1 et 2 font référence à deux groupes indépendants d'animaux opérés.

IV.2.2. Description des défauts comblés par le BCP seul

Dès 2 semaines post-chirurgie, le défaut est comblé par du tissu fibreux et un infiltrat inflammatoire plus ou moins abondant est présent autour des grains de BCP. Cet infiltrat est présent à tous les temps de régénération, surtout après 2, 4 et 6 semaines puis il s'estompe jusqu'à 20 semaines.

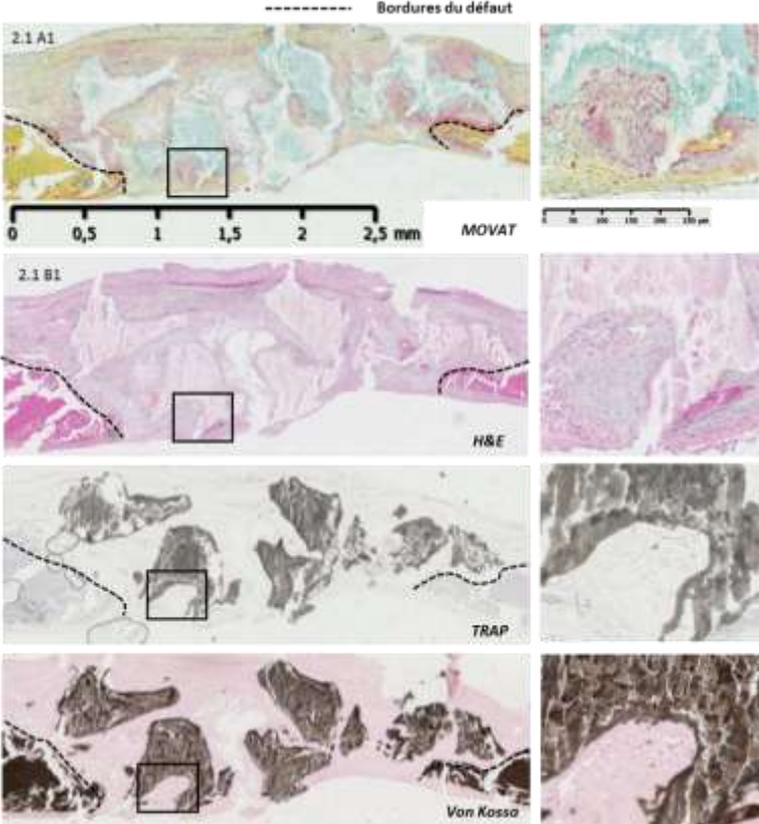
Sur les temps courts de régénération, comme dans le cas du défaut vide (voir chapitre III), une formation osseuse (bordure ostéoïde en rouge sur la coloration Movat) est observée sur les berges du défaut (os natif) et diminue après 6 semaines. Celle-ci n'est toutefois pas suffisante pour combler le défaut qui est toujours rempli de tissu fibreux, 20 semaines après chirurgie. À partir de 4 semaines, une formation osseuse peut être localement observée autour des grains de BCP. Le nombre et l'étendue du marquage sont très dépendants du défaut analysé, mais la coloration reste tout de même très localisée et peu étendue à l'exception du défaut analysé à 6 semaines qui présente plusieurs zones minéralisées au milieu des grains de BCP dans le défaut (les zones de repousse osseuse visibles sont surtout observables sur la coloration Movat et la présence de tissus minéralisés, en noir, à proximité des grains de BCP, en gris, sont identifiables grâce à la coloration Von Kossa).

Entre 4 et 8 semaines, une activité de résorption osseuse (coloration enzymatique TRAP spécifique aux ostéoclastes) est observée autour des granules de BCP mais les marquages restent très peu nombreux. Ceci indique néanmoins un début de dégradation des grains de BCP au niveau du défaut. Après 20 semaines de régénération, la coloration TRAP n'est plus visible, sans doute à cause de la diminution de la réaction inflammatoire, et les grains de BCP sont toujours présents au niveau des défauts.

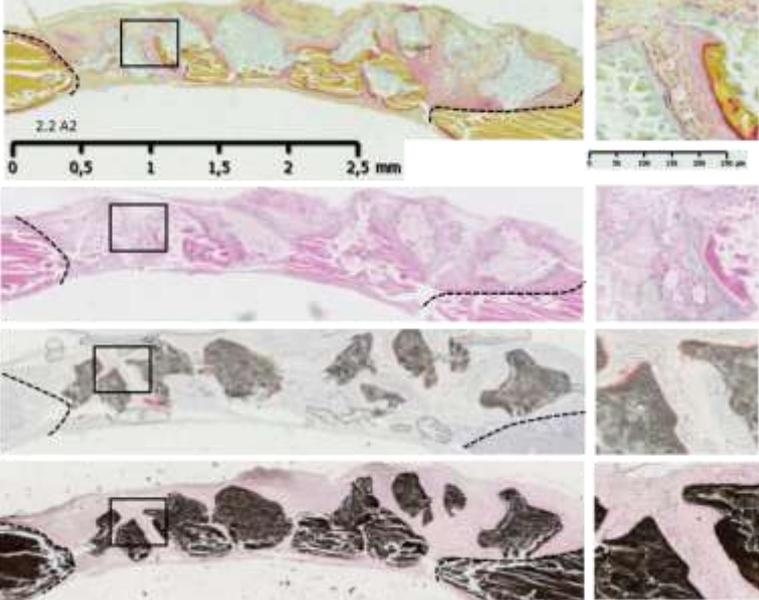
Globalement, le BCP seul n'a donc pas permis une repousse osseuse satisfaisante, même aux temps longs de régénération, et n'a pas été résorbé après 20 semaines. Le BCP a donc été moins efficace que l'utilisation du greffon osseux dans nos expériences. Les capacités d'ostéoconduction du BCP seul s'avèrent ainsi très réduites.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

A
2 semaines

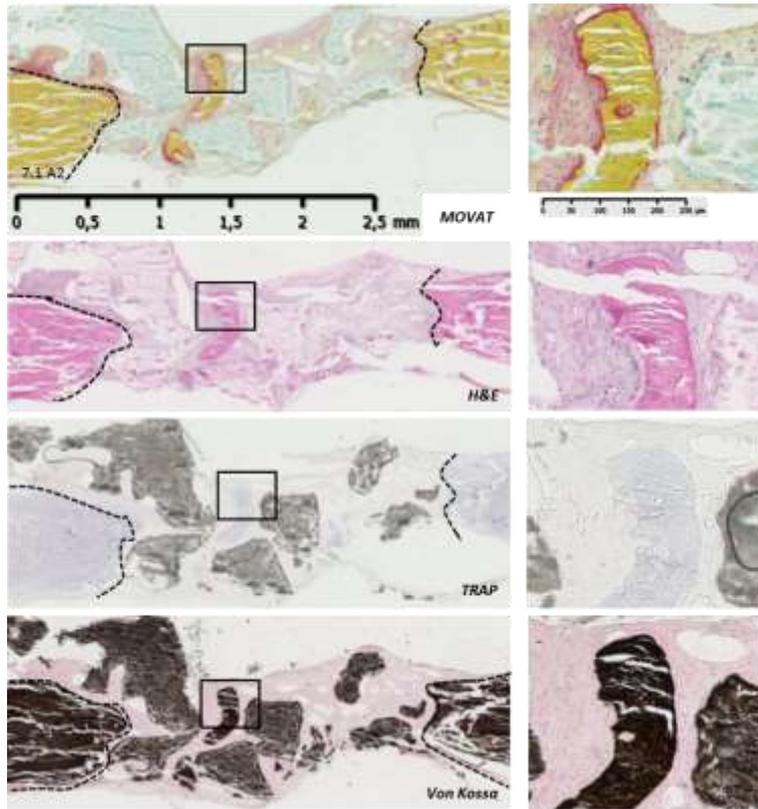


B
4 semaines

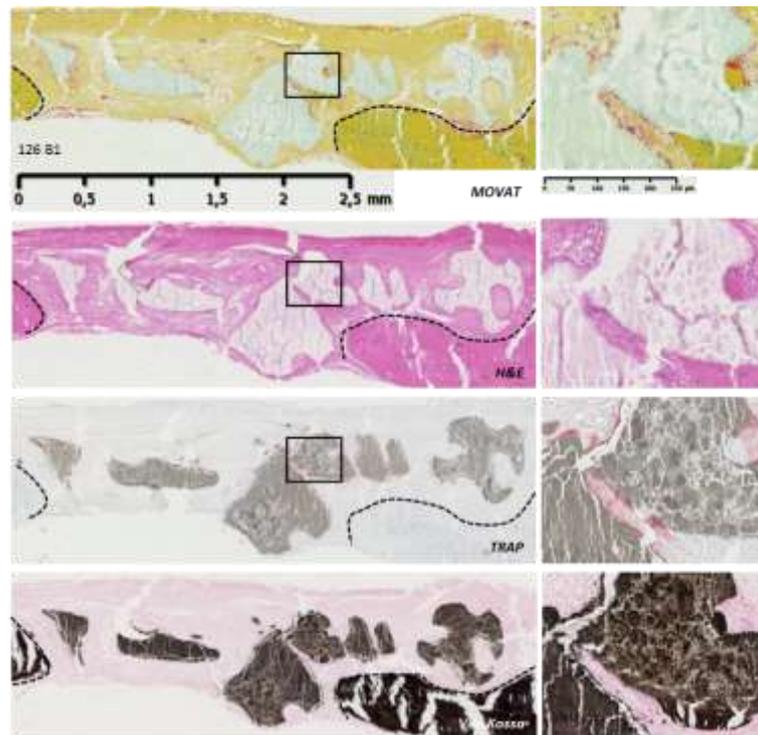


IV.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique

C
6 semaines



D
8 semaines



IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

E
20 semaines

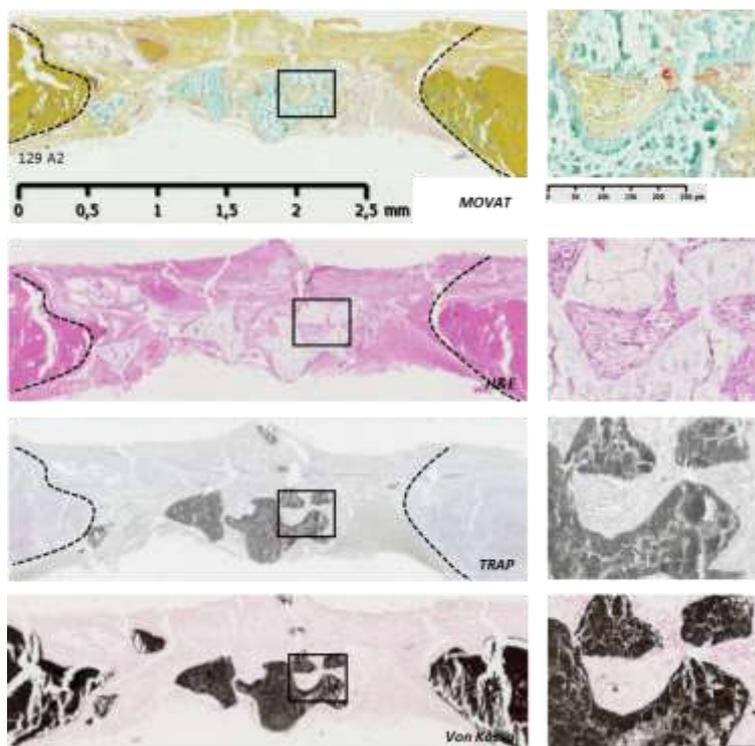


Figure IV.2 : Coupes histologiques (colorations de haut en bas: Movat, H&E, TRAP et Von Kossa) à (A) 2, (B) 4, (C) 6, (D) 8 et (E) 20 semaines de régénération des défauts comblés par des grains de BCP seuls. Les coupes histologiques représentatives montrent une coupe frontale de tout le défaut avec l'os natif visible sur les bords. Les rectangles noirs sur les images à gauche indiquent les zones présentées à droite à un grossissement plus élevé. Les coupes colorées au pentachrome de Movat sont celles reprises de la figure IV.1.

IV.2.3. Description des défauts comblés avec BCP + TBM

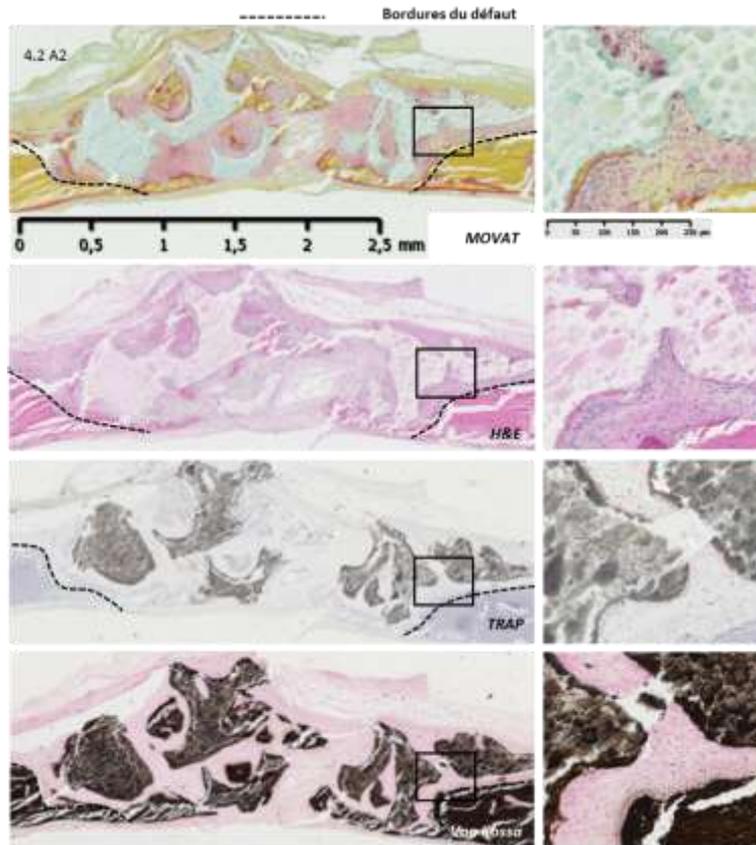
Le défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse est envahi par un tissu inflammatoire (figure IV.1 : BCP + TBM, tissu rosâtre). Cette inflammation, très présente à 2 et 4 semaines post-chirurgie, s'estompe à partir de 6 semaines.

Contrairement au BCP seul, la formation osseuse débute rapidement après implantation. En effet des bordures ostéoïdes sont visibles à la fois au niveau des berges osseuses (dès 2 semaines post-chirurgie) et au niveau des grains de BCP (après 6 semaines post-chirurgie), même si ceux-ci restent peu nombreux et peu étendus sur les coupes analysées.

Le marquage TRAP des ostéoclastes est visible dès 4 semaines (voir le détail de la coloration TRAP de la figure IV.4 : cellules colorées en rouge) et s'intensifie au cours du temps. Le marquage est en particulier très visible au niveau des grains de BCP. Il est probable que la présence de précurseurs ostéoclastiques dans la moelle osseuse ait aidé à l'amplification de la résorption du BCP. Il est possible de voir sur les coupes colorées à 8 et 20 semaines que les marquages ostéoïdes et marquages TRAP sont mutuellement exclusifs et sont souvent adjacents au niveau des grains de BCP indiquant des cycles de formation et de remodelage en cours. L'ostéoïde se dépose au niveau des grains de BCP et l'os formé est plutôt fibrillaire, non

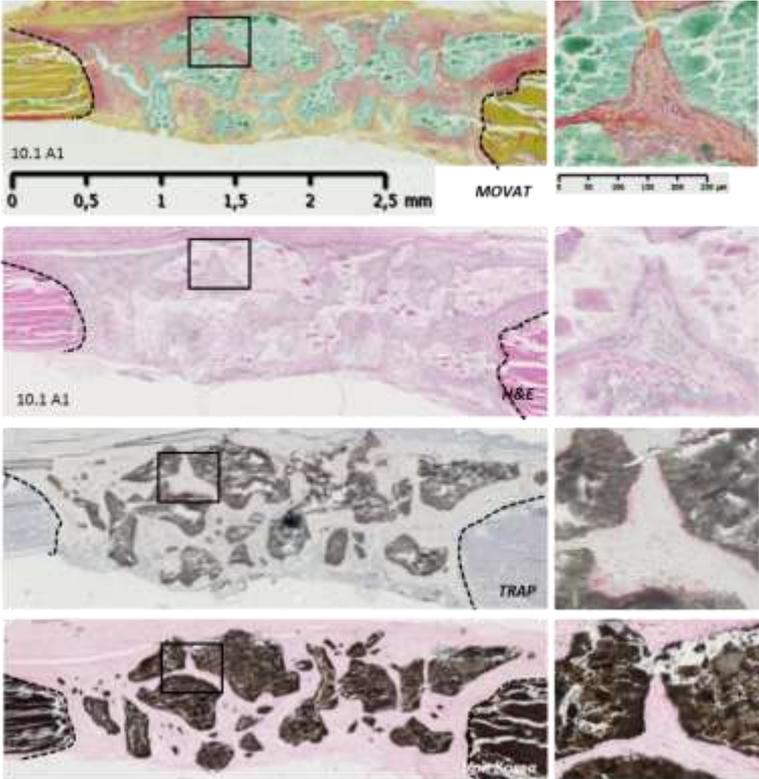
organisé. La proportion de tissu minéralisé dans le défaut augmente globalement entre 8 et 20 semaines de régénération, mais le défaut osseux initial n'est pas totalement comblé par du tissu minéralisé à l'issue de notre expérience. Le tissu minéralisé est parfaitement visible à partir de 8 semaines sur les coupes histologiques colorées au pentachrome de Movat et au Von Kossa. Les grains de BCP sont par ailleurs toujours visibles après 20 semaines au niveau du défaut.

A
2 semaines

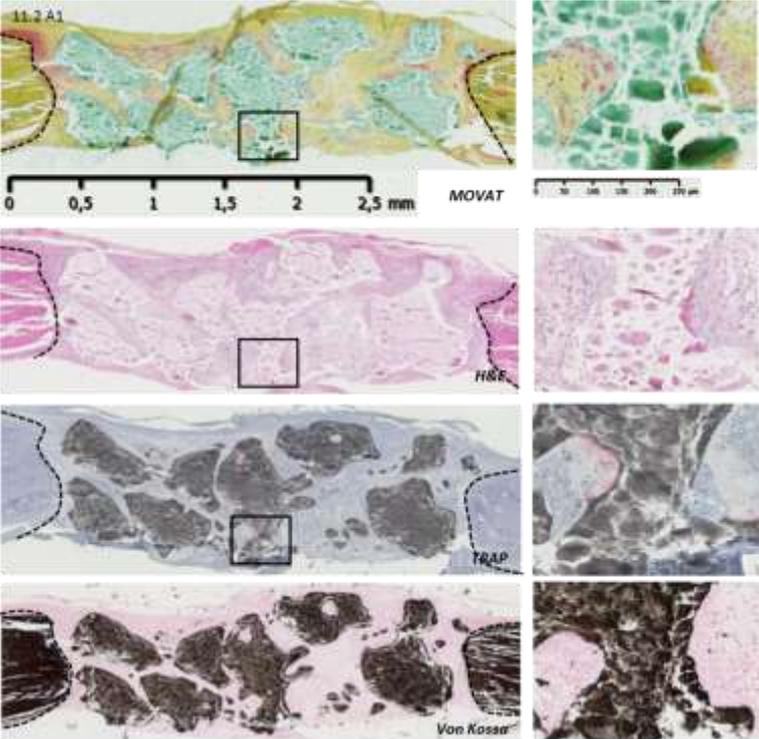


IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

B
4 semaines

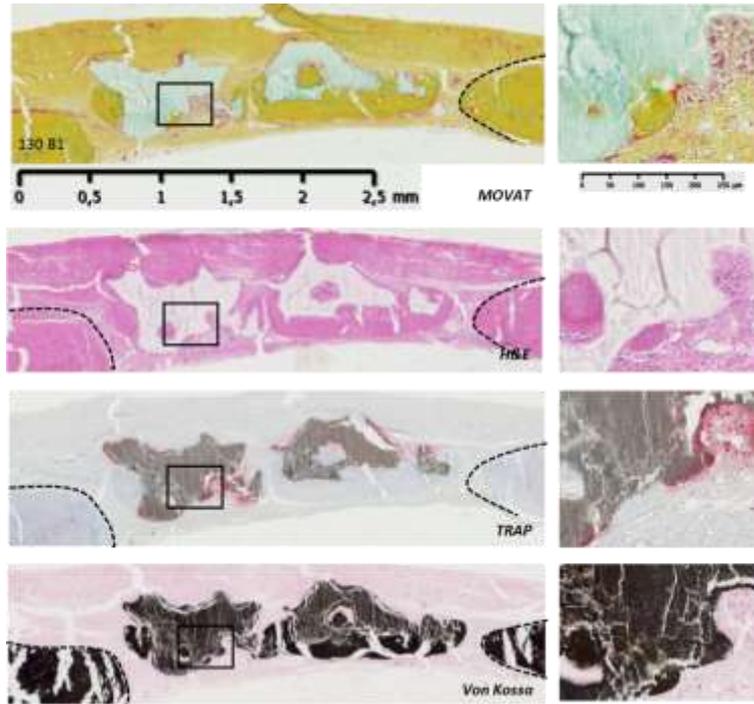


C
6 semaines



IV.2. Description histologique de la repousse osseuse et activité biologique

D
8 semaines



E
20 semaines

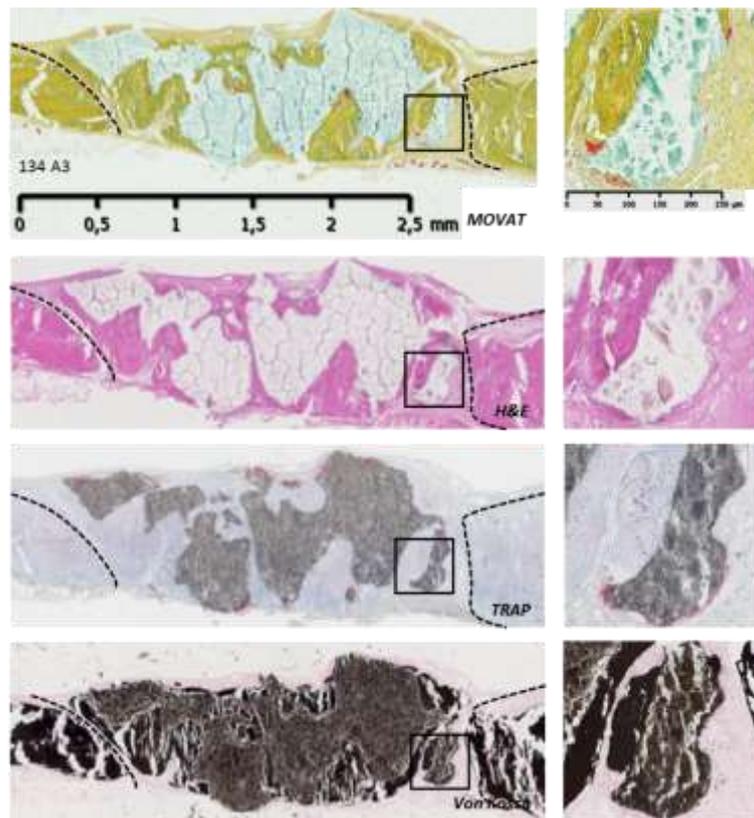


Figure IV.3 : Coupes histologiques (colorations de haut en bas: Movat, H&E, TRAP et Von Kossa) à (A) 2, (B) 4, (C) 6, (D) 8 et (E) 20 semaines de régénération des défauts comblés par un mélange de BCP et de moelle osseuse (Total Bone Marrow : TBM). Les coupes histologiques représentatives montrent une coupe frontale de tout le défaut avec l'os natif visible sur ses bords. Les rectangles noirs sur les images à gauche indiquent les zones présentées à droite à grossissement plus élevé. Les coupes colorées au pentachrome de Movat sont celles reprises de la figure IV.1.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

L'addition de la moelle osseuse aux grains de BCP a permis de mettre en évidence les propriétés d'ostéo-conduction du BCP. Les facteurs présents dans la moelle osseuse au début de l'expérience ont joué le rôle d'ostéoinducteur et ont permis d'induire la formation osseuse dans le défaut osseux à distance des berges grâce aux nombreuses cellules ostéoprogénitrices présentes dans la moelle osseuse. Néanmoins, le volume d'os néoformé dans le défaut est visiblement très inférieur à celui obtenu avec le greffon osseux.

En résumé, l'intégration d'un matériau synthétique est similaire à celle de la greffe osseuse dans la succession des événements au niveau tissulaire et cellulaire. Cependant, la formation osseuse reste moindre avec ces matériaux. Une des méthodes envisageables pour améliorer la bioactivité des matériaux de comblement, tels que le BCP, est l'ajout de moelle osseuse qui lui confère un caractère ostéoinducteur. Cette association peut influencer la repousse osseuse, mais également la résorption de la céramique (BCP). En effet, avec le BCP seul, un tissu ostéoïde (matrice collagénique sécrétée par les cellules ostéoblastiques) apparaît principalement sur les berges alors qu'avec l'association BCP + TBM, des bordures ostéoïdes sont visibles à la fois au niveau des berges osseuses et des grains de BCP. L'intérêt de l'ajout de la moelle osseuse figure aussi dans la présence de précurseurs ostéoclastiques qui ont aidé à l'amplification de la résorption du BCP. Cependant, 20 semaines ne sont pas suffisantes dans notre cas d'étude pour résorber la totalité de BCP et le remplacer par de l'os.

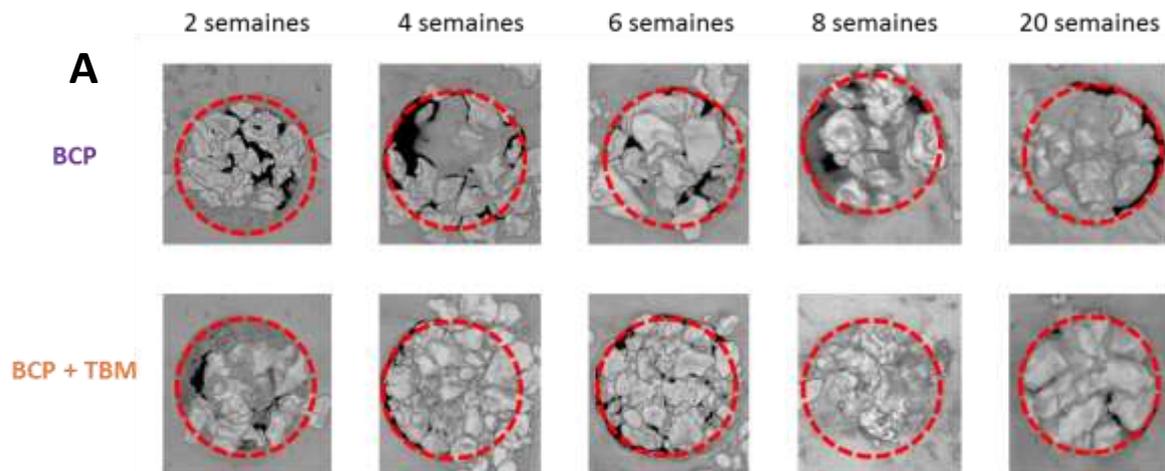
IV.3. Evaluation micro architecturale

L'architecture 3D des défauts crâniens comblés avec des grains de BCP seuls ou par un mélange BCP + TBM ainsi que les coupes frontales et sagittales au niveau du défaut sont présentées sur la figure IV.4 pour les 5 temps de régénération étudiés. Dans le premier groupe d'animaux (implantés par du BCP seul), très peu de repousses osseuses sont observées dans le défaut (le défaut initial est indiqué par le cercle en pointillé rouge sur la figure IV.4), au cours des premières semaines de régénération (2, 4 et 6 semaines). Cette repousse limitée est due à l'absence de cellules à activité ostéogénique dans le défaut (voir paragraphe précédent). Dans le cas de l'implantation de BCP seul, les activités cellulaires de résorption et de formation osseuse sont beaucoup plus réduites au centre du défaut (loin des berges de celui-ci) ce qui explique l'absence de néoformation autour des particules de BCP au cours des premières semaines de régénération. Les coupes coronales et sagittales des défauts implantés avec du BCP seul, présentées sur les figures IV.4.A et IV.4.B, montrent que la plupart des grains de BCP sont entourés par un tissu minéralisé à partir de 8 semaines et cette repousse est plus importante à 20 semaines. Cependant, même à la fin de l'expérience, le défaut n'est pas totalement comblé par l'os néoformé et des grains de BCP sont toujours visibles dans le défaut. À partir de 6 semaines de régénération, une continuité de la structure dans le défaut est observable. En effet la repousse osseuse est alors suffisante pour assurer l'adhésion entre les grains de BCP et l'os à la périphérie du défaut. La discontinuité surprenante entre le matériau de comblement et l'os natif autour du défaut, observée à 20 semaines, pourrait être due à un échauffement local de l'os créé par la vitesse de rotation de la tréphine (instrument chirurgical à lame cylindrique utilisé pour la trépanation) lors de la création du défaut. Cela peut ainsi entraîner la mort des cellules présentes dans la zone périphérique du défaut,

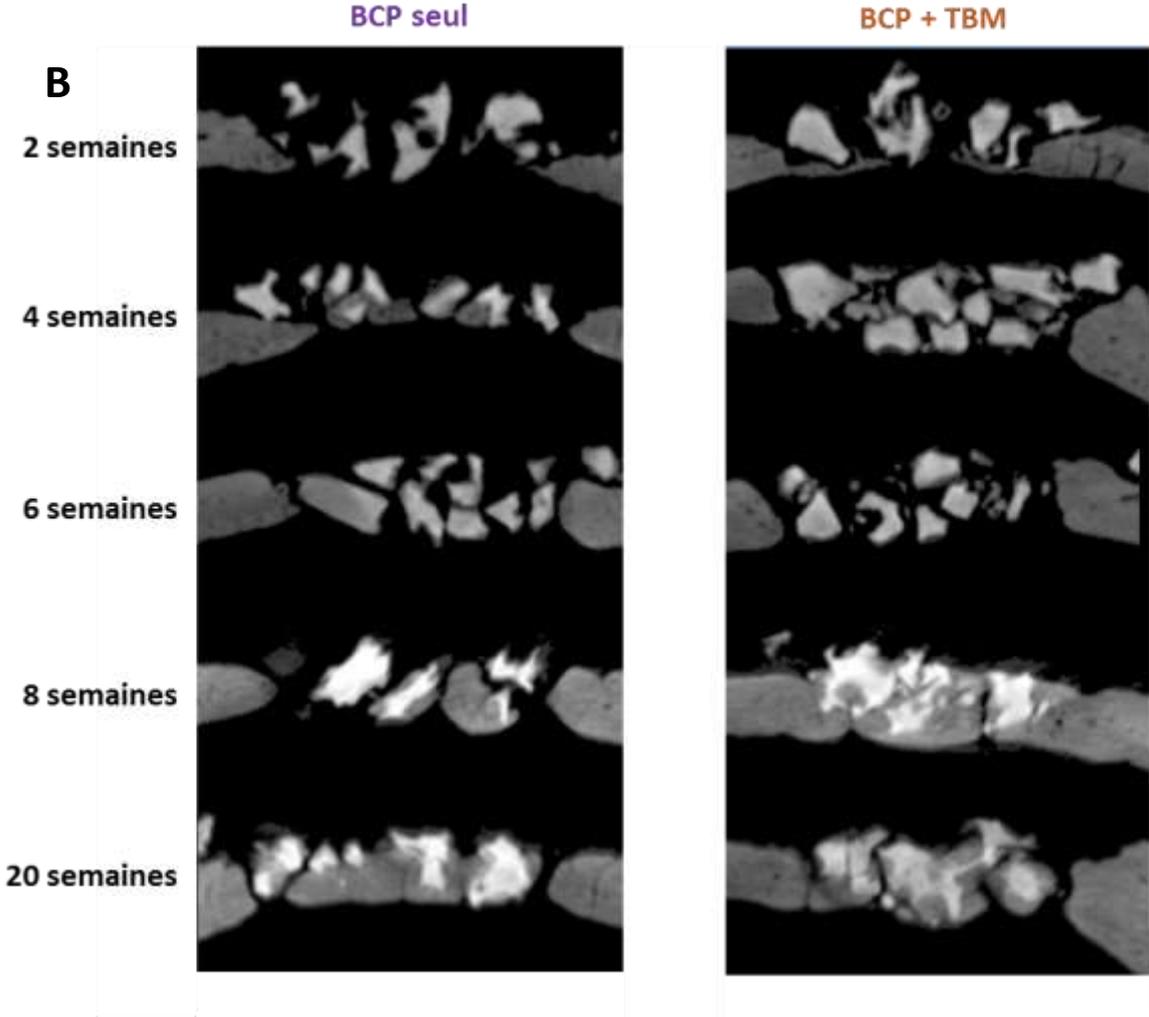
conduisant à son isolement. Il n'y a donc dès lors pas de migration cellulaire possible comme celle des ostéoprogéniteurs, celle des cellules endothéliales vasculaires..., du tissu naturel vers le défaut.

La repousse osseuse dans les défauts des rats ayant reçu un mélange de BCP et de moelle osseuse est plus importante et a été observée dès 2 semaines de régénération, non seulement sur la surface (figure IV.4.A), mais aussi sur la hauteur totale du défaut (figure IV.4.B et figure IV.4.C). Les grains de BCP sont parfaitement recouverts par de l'os néoformé à 8 et 20 semaines de régénération. Il est à noter ici que le recouvrement du défaut à 8 semaines semble être plus important qu'à 20 semaines. Ceci pourrait être dû à la taille des grains de BCP qui semble plus grande dans le défaut à 20 semaines.

L'ajout de la moelle osseuse favorise la repousse dans le volume du défaut. Cela s'explique certainement par les facteurs ostéoinducteurs présents dans la moelle osseuse. En effet, la conjonction des effets ostéoinducteurs et ostéoconduiteurs du mélange accélère la néoformation osseuse. Ces observations sont en accord avec les résultats qualitatifs obtenus en histologie qui ont montré une activité cellulaire importante dans le défaut dès les premières semaines de régénération. La présence des grains de BCP, partiellement résorbés à 20 semaines, est clairement identifiable sur la représentation 3D obtenue par tomographie X ainsi que sur les deux coupes de la figure IV.4.



IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)



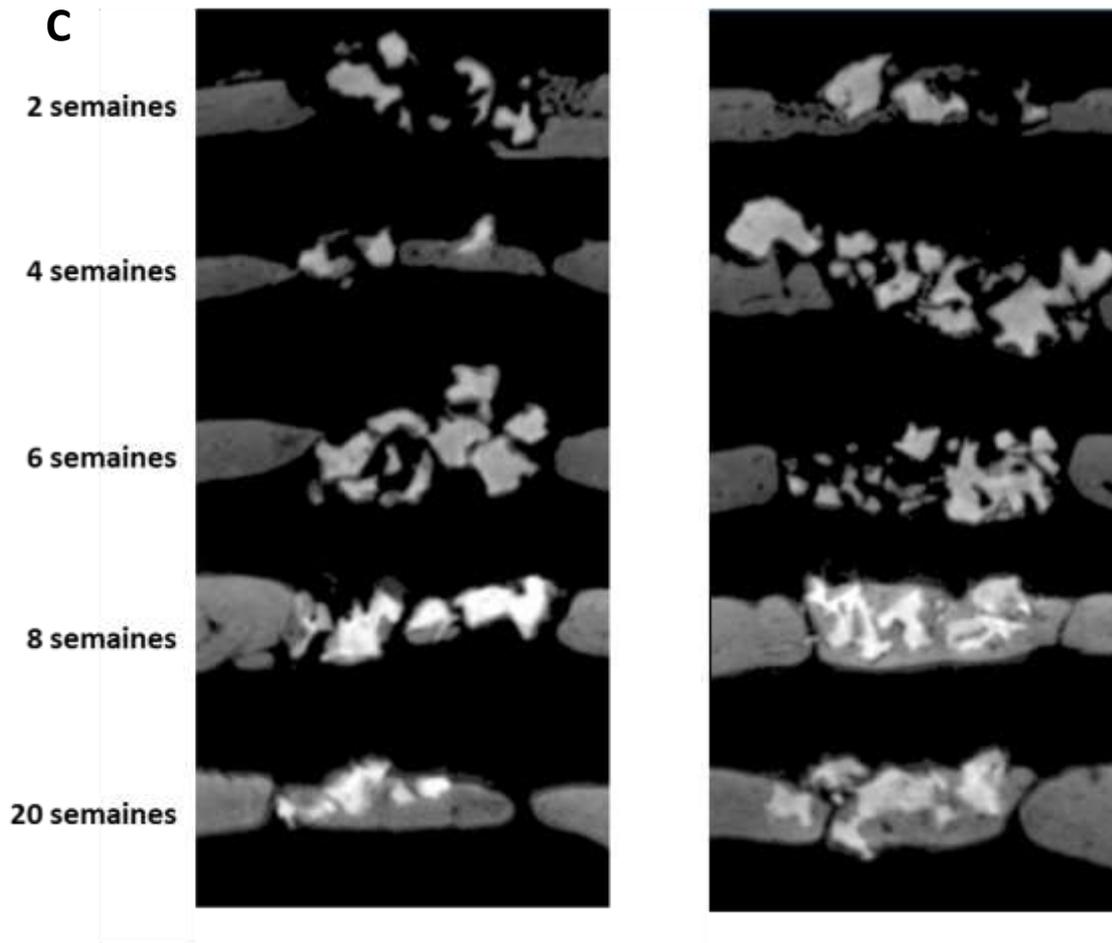


Figure IV.4 : Évaluation par microtomographie X de la repousse osseuse dans des défauts crâniens ayant reçu des grains de BCP seuls ou associés à de la moelle osseuse totale (Total Bone Marrow (TBM)) à 2, 4, 6, 8 et 20 semaines de régénération. (A) Vue du dessus, (B) coupe frontale au niveau du défaut, (C) coupe sagittale au niveau du défaut. Sur chaque coupe, les particules plus claires représentent les grains de BCP, les parties plus sombres autour de ces grains, l'os néoformé. Les berges de la calvaria (os natif ou naturel) sont visibles de part et d'autre du défaut.

La quantification de l'os néoformé est donnée par le rapport BV/TV (Bone Volume/Tissue Volume). Il est à rappeler ici, que la quantification de l'os néoformé est réalisée à travers une analyse d'image par seuillage des niveaux de gris qui permet de différencier l'os néoformé du BCP. La figure IV.5 montre que la masse de l'os néoformé après l'implantation du mélange BCP + TBM (16 %) est supérieure à celle avec du BCP seul (11 %) dès 2 semaines de régénération. Après 2 semaines, l'augmentation de la masse osseuse pour le groupe implanté avec du BCP seul est beaucoup plus lente au cours de temps (en moyenne 1 % de masse osseuse supplémentaire toutes les 2 semaines). L'augmentation observée chez les rats implantés avec du BCP + TBM au cours du temps est beaucoup plus variable. Cela peut être expliqué, en particulier pour les échantillons à 4 et 6 semaines, par la non-maîtrise de la quantité de biomatériaux et/ou de la moelle osseuse introduite pendant l'implantation. À 20 semaines de régénération, le ratio BV/TV atteint 31 % pour le mélange BCP + TBM contre seulement 24 % pour le BCP seul. Ces résultats confirment les observations faites précédemment en histologie. La figure IV.5 montre clairement que l'implantation du BCP, seul

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

ou associé à la moelle osseuse, induit une repousse osseuse. En effet, malgré l'évolution faible de la quantité d'os néoformé au cours de temps avec ces deux implants, elle reste considérablement supérieure à celle mesurée chez les contrôles.

L'augmentation du rapport BV/TV mesuré avec l'association BCP + TBM, suggère une augmentation de la formation osseuse. En effet, le volume minéral est la résultante de l'activité de formation et de résorption. Comme le montrent les observations histologiques, l'activité cellulaire des ostéoclastes (résorption) et l'apparition de l'ostéoïde sont nettement marquées dans les cas du mélange BCP + TBM comparé au BCP seul. Les phénomènes biologiques (activités cellulaires : résorption et formation), identifiés précédemment, sont donc en accord avec l'étude quantitative donnée par les mesures de la masse de l'os néoformé existant dans le défaut pour un temps de régénération donné.

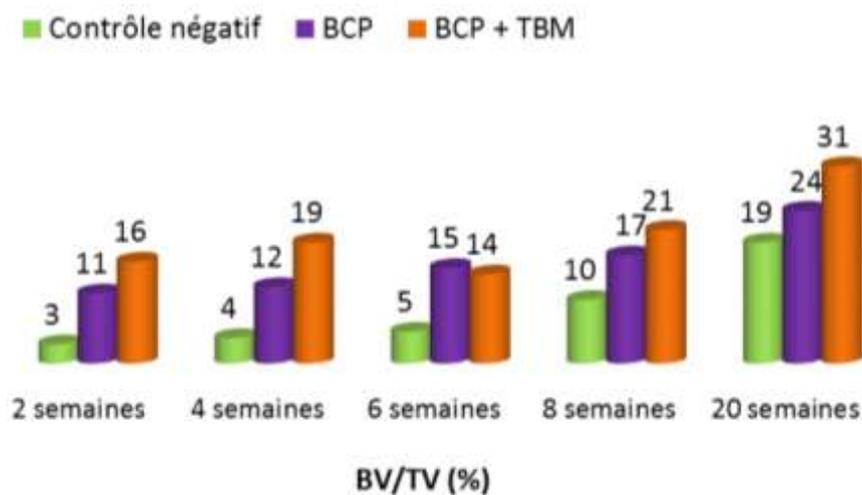


Figure IV.5 : Variation du volume osseux néoformé/volume total (BV/TV) en fonction du temps de régénération (2, 4, 6, 8 et 20 semaines) dans des défauts crâniens comblés par des grains de BCP seuls ou associés à de la moelle osseuse totale (Total Bone Marrow (TBM)) et les défauts laissés vides (contrôle négatif) . Ces résultats sont exprimés en % et chaque barre représente une mesure dans un défaut.

En résumé, une faible masse d'os néoformé par volume d'os a été mesurée dans les défauts comblés par des grains de BCP seuls comparée à celle des défauts comblés par un mélange de BCP et de moelle osseuse. La repousse osseuse n'a été initiée que sur les berges du défaut dans le cas d'implantation du BCP seul. Cependant, la repousse dans les défauts des rats ayant reçu un mélange de BCP et de moelle osseuse a été observée non seulement sur les berges, mais aussi dans le volume du défaut. L'ajout de la moelle osseuse au matériau synthétique augmente ainsi la quantité de tissu minéralisé formé grâce aux facteurs ostéoinducteurs et aux cellules présentes dans la moelle osseuse.

IV.4. Épaisseur moyenne des particules minérales

Tout d'abord, il convient de noter ici que la détermination du paramètre T en SAXS n'a pas pu être réalisée sur les zones implantées par les deux stratégies de régénération présentées dans ce chapitre (BCP et BCP + TBM). Outre les faibles quantités de repousses osseuses relatives aux faibles temps de régénération, la présence seule du matériau synthétique entraîne une forte atténuation du signal SAXS en transmission. Ainsi, la moindre présence d'une particule de BCP sur le trajet optique (i.e. dans l'épaisseur du volume sondé) induit non seulement une superposition du signal de diffusion de la particule de BCP à celui du tissu régénéré, mais aussi une modération du signal de diffusion des cristaux d'HA dont la contribution devient alors marginale, y compris pour 20 semaines de régénération.

De plus, lors de la campagne de mesures réalisée sur la série d'implants BCP + TBM, la configuration de la ligne de lumière I22 de DIAMOND n'a pas permis la réalisation de mesures en SAXS. Pour rappel, la structure intrinsèque de l'os crânien est caractérisée par une organisation modérée des fibres de collagène et nécessite donc une étude de l'ordre 1 du signal de diffusion du collagène en SAXS. Outre la faiblesse du signal SAXS induit par la faible organisation des fibres, l'analyse de l'ordre 1 contraint ce dernier à une proximité au faisceau direct qui impose une distance échantillon-détecteur importante qui n'a pu être réalisée sur la ligne I22.

Néanmoins, l'évolution des épaisseurs moyennes des particules minérales, au cours du temps, dans les parties naturelles des crânes des rats implantés initialement par des grains de BCP a été déterminée via l'évaluation du paramètre T (figure IV.6).

La figure IV.6 montre clairement la dépendance du paramètre T à l'âge, dans l'os à proximité du site opératoire. Une augmentation rapide et continue caractérise l'évolution des épaisseurs moyennes des cristaux d'HA entre 10 et 16 semaines (correspondant à 2 et 8 semaines de régénération), suivie d'une évolution moins notable entre 16 et 28 semaines annonçant un début de saturation. Cette évolution en deux phases est similaire aux résultats obtenus sur des rats non opérés (chapitre III). L'implantation d'un matériau synthétique (BCP) ne semble donc pas perturber outre mesure l'évolution des épaisseurs des cristaux présents dans le tissu osseux autour du défaut. En effet, à l'âge de 28 semaines (20 semaines post-chirurgie), les valeurs moyennes de T mesurées dans les calvariae non opérées ($T = 25 \pm 0,07 \text{ \AA}$) et les parties naturelles des rats opérés ($T = 25,7 \pm 0,5 \text{ \AA}$) sont très proches. Néanmoins, il est important de noter ici que les écarts-types déterminés avec les rats implantés sont plus élevés ($\approx 0,4 \text{ \AA}$ en moyenne sur tous les temps) que ceux déterminés avec les mesures dans les calvariae non opérés ($\approx 0,07 \text{ \AA}$ en moyenne sur tous les temps). Étant donné qu'un écart-type élevé traduit la dispersion des mesures, il est alors possible que le tissu adjacent au site opératoire soit beaucoup plus hétérogène du fait des activités biologiques induites par la régénération et la création du défaut.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

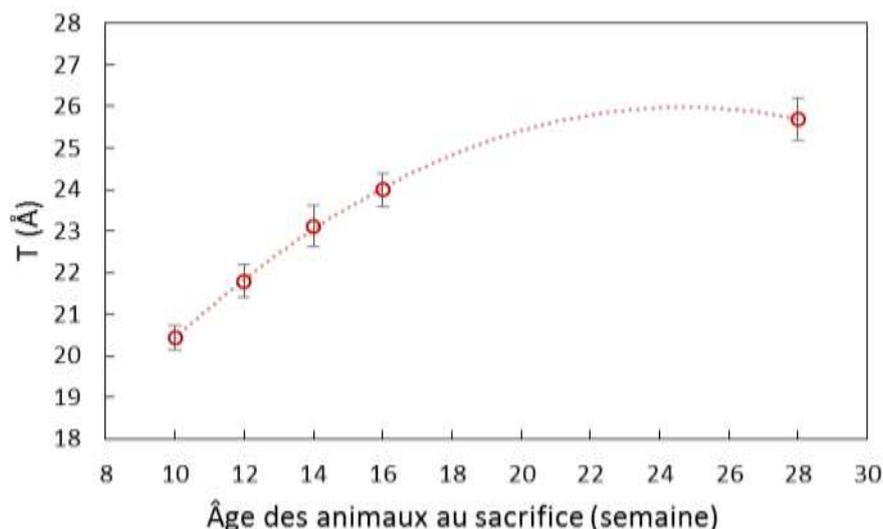


Figure IV.6 : Épaisseur moyenne des cristaux d'HA (paramètre T) déterminée par SAXS dans les parties naturelles des calvarias à l'extérieur des défauts implantés par du BCP en fonction de l'âge. La courbe en pointillés rouges est la courbe de tendance obtenue par une fonction polynomiale d'ordre 2. Les résultats sont exprimés en Angstrom (Å) et sont présentés en moyenne \pm 1 écart-type sur un échantillon de 100 valeurs.

Finally, in the rat, the natural aging of the bone tissue adjacent to a defect filled with BCP tends to increase the average crystal thickness, as observed in non-operated rats. A larger dispersion in the measurements in the natural parts of the calvarias implanted translates the probable influence of the regeneration process (inflammation, resorption, remodeling...) on the natural evolution of the bone tissue. The measurements in the implant for these 2 strategies could not be realized due to the strong perturbation of the BCP particles on the SAXS signal and technical limitations of the I22.

IV.5. Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré

La distribution du facteur d'orientation H dans et autour du défaut comblé par des grains de BCP est présentée sur les cartographies de la zone d'intérêt pour les différents temps de régénération (figures IV.7 et IV.8). Il est à rappeler que ce facteur d'orientation traduit l'orientation des cristaux par rapport à une direction de référence (qui correspond ici à la direction de traction donnée par σ sur la figure IV.7). Pour rappel, cette direction correspond aussi à la direction préférentielle des cristaux d'apatite dans l'os crânien. Les zones hachurées des figures IV.7 et IV.8 correspondent à des points de mesures inexploitable (donc éliminés de l'étude). En effet, la contribution du BCP au signal de diffraction dans ces zones d'analyse est majoritaire par rapport à celui des cristaux d'HA. Comme le facteur H est déduit d'une analyse de l'évolution de l'intensité intégrée du pic de diffraction {002} autour de l'anneau en

WAXS, sa détermination est rendue très délicate dès lors que le rapport d'intensité observé entre les pics de diffraction du BCP et ceux des cristaux d'HA devient défavorable. Ainsi, afin de récolter des informations fiables, les données ont été traitées point par point afin d'évaluer la qualité du signal, notamment le rapport signal sur bruit, la contribution du matériau synthétique au signal ainsi que la qualité de l'ajustement de la fonction mathématique au profil de raie. En dépit du nombre limité de données exploitables, les points de mesure dans la partie régénérée témoignent de la présence d'un os néoformé dans le volume du défaut. En effet, il est à rappeler que les mesures WAXS sont réalisées en transmission, et que, par conséquent, le signal enregistré est moyenné sur toute l'épaisseur de l'échantillon. Il est à souligner également que les zones inexploitable dans la partie naturelle sont dues à la présence de particules de BCP qui se sont échappées du défaut lors de l'opération chirurgicale (cf. les résultats de microtomographie X - figure IV.4).

La distribution du facteur H à 2 semaines de régénération d'un défaut comblé par du BCP seul (figure IV.7.a) montre que les cristaux nouvellement formés sur les berges du défaut s'orientent et s'organisent naturellement suivant le grand axe de l'os. Dès leur formation, les cristaux d'HA régénérés sont parfaitement alignés avec ceux initialement présents dans l'os natif. Une légère évolution du facteur H (à la périphérie de l'os natif) est néanmoins observée entre les animaux âgés de 10 et 28 semaines (figures IV.7.a et IV.7.e), correspondant respectivement à 2 et 20 semaines de régénération. En effet, à 10 semaines (deux semaines après la création du défaut et implantation du BCP), les rats sont encore jeunes et les cristaux d'HA de l'os natif ne sont pas encore totalement organisés suivant une orientation préférentielle dans la calvaria. Chez les animaux plus âgés (à partir de 28 semaines) l'orientation de l'axe c des cristaux selon le grand axe de l'os du crâne est alors bien visible (avec des valeurs de H proche de 1). Il est à noter que les zones riches en particules de BCP (correspondant aux zones hachurées, figure IV.7) diminuent avec le temps de régénération traduisant la néoformation osseuse. Les particules de BCP se résorbent parallèlement à une formation des cristaux d'HA autour d'elles. Ceci explique le fait que la contribution des cristaux d'HA dans le volume diffracté devient de plus en plus importante par rapport à celle des particules de BCP au cours du temps au niveau du défaut. Cette évolution décrite dans la figure IV.8 est en accord avec les observations faites par microtomographie X (figure IV.4) montrant une repousse plus importante avec le temps.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

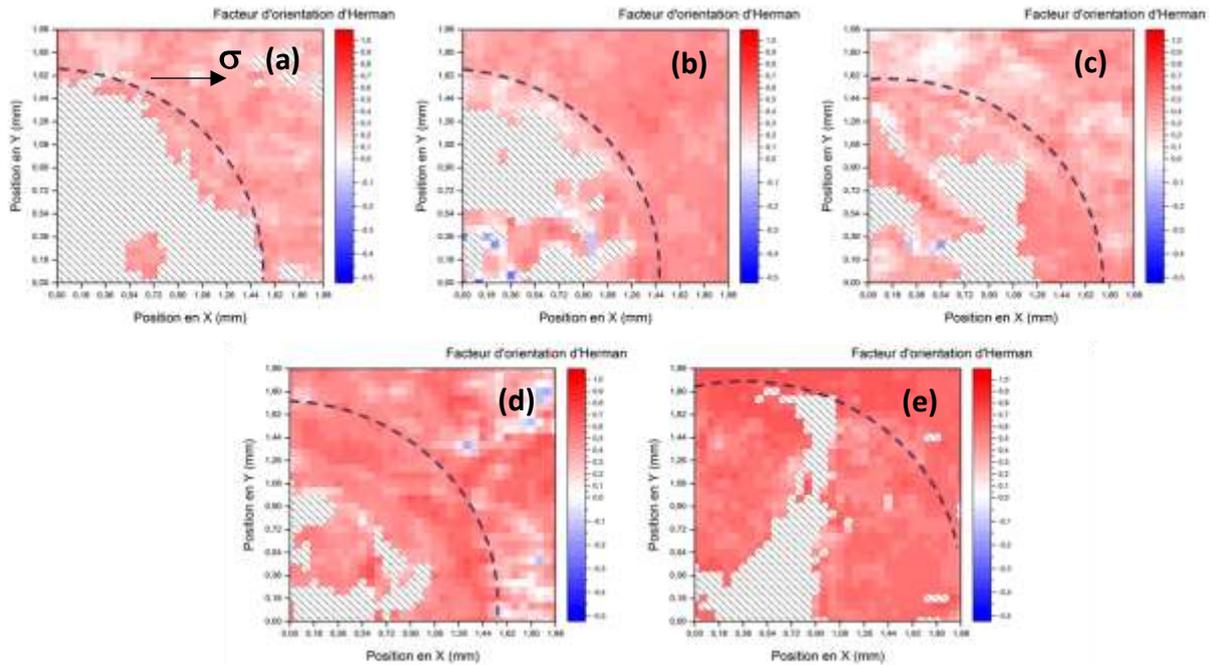


Figure IV.7 : Cartographies du facteur d'orientation d'Herman dans et autour du défaut (indiqué par des pointillés noirs) comblé par du BCP seul après (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 8 et (e) 20 semaines de régénération. La direction de sollicitation est représentée par σ .

L'ajout de la moelle osseuse n'a pas d'effet notable sur l'orientation des cristaux régénérés (figure IV.8). Comme pour les défauts remplis par du BCP seul, les cristaux nouvellement formés dans le cas de l'implant BCP + TBM sont orientés selon la direction préférentielle de l'os dès deux semaines.

Il est à noter ici, que les points exploitables dans les défauts comblés par le mélange BCP + TBM sont non seulement situés à l'interface implant/os natif, comme pour le BCP seul, mais ils sont aussi distribués sur toute la surface de la zone d'étude. Comme les points de mesure retenus traduisent la présence d'un os néoformé, ces mesures confirment les observations histologiques et montrent une régénération dans tout le volume du défaut contrairement à la repousse principalement localisée sur les berges pour le BCP seul.

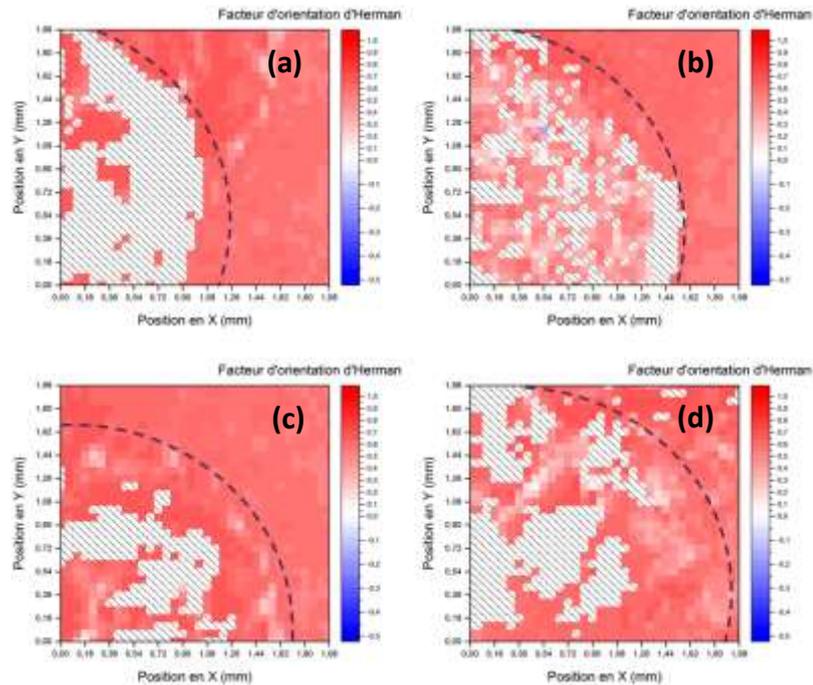


Figure IV.8 : Cartographies du facteur d'orientation d'Herman dans et autour du défaut (indiqué par des pointillés noirs) comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse après (a) 2, (b) 6, (c) 8 et (d) 20 semaines de régénération.

En résumé, les cristaux d'HA régénérés autour du matériau synthétique de comblement sont identiques en termes d'orientation cristallographique par rapport à l'os natif. La présence du BCP et l'ajout de la moelle osseuse n'entraînent pas une désorientation de la phase minérale qui est naturellement formée suivant le grand axe de l'os. Néanmoins, une régénération dans tout le volume du défaut est observée pour le BCP + TBM contrairement au cas du BCP seul où la repousse est principalement localisée sur les berges du défaut.

IV.6. Réponse mécanique des cristaux

IV.6.1. Champs de déformation dans les cristaux d'HA

La présence des grains de BCP, dont certains plans diffractants occupent la même gamme angulaire que la famille de plans {002} des cristaux d'HA, induit une difficulté majeure quant à la détermination de la réponse en déformation de la phase minérale de l'os régénéré. Tout comme pour les analyses relatives au paramètre H, les points de mesure retenus sur les figures IV.9 et IV.10 correspondent donc à des zones de néoformation exemptes de contribution notable des grains de BCP sur le trajet optique. Ces points résultent de la même analyse méticuleuse réalisée point par point pour la détermination du facteur H et détaillée au début de la section IV.5. Toutefois, la sélection est alors plus draconienne quant à l'ajustement de la fonction mathématique puisque la position angulaire est très sensible à la présence des grains de BCP induisant de fait des erreurs importantes dans le calcul de la déformation correspondante.

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

Par manque de repousse osseuse importante aux temps de régénération courts (entre 2 et 6 semaines de régénération) dans les défauts comblés par du BCP seul ou en mélange avec de la moelle osseuse (résultats des observations histologiques et de l'analyse par microtomographie X), l'analyse des champs de déformation a donc été focalisée sur les temps plus longs (8 et 20 semaines).

Les cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans {002} des cristaux d'HA dans et autour du défaut comblé par des grains de BCP pour une charge de 30 N à 8 et 20 semaines de régénération sont présentées sur la figure IV.9.

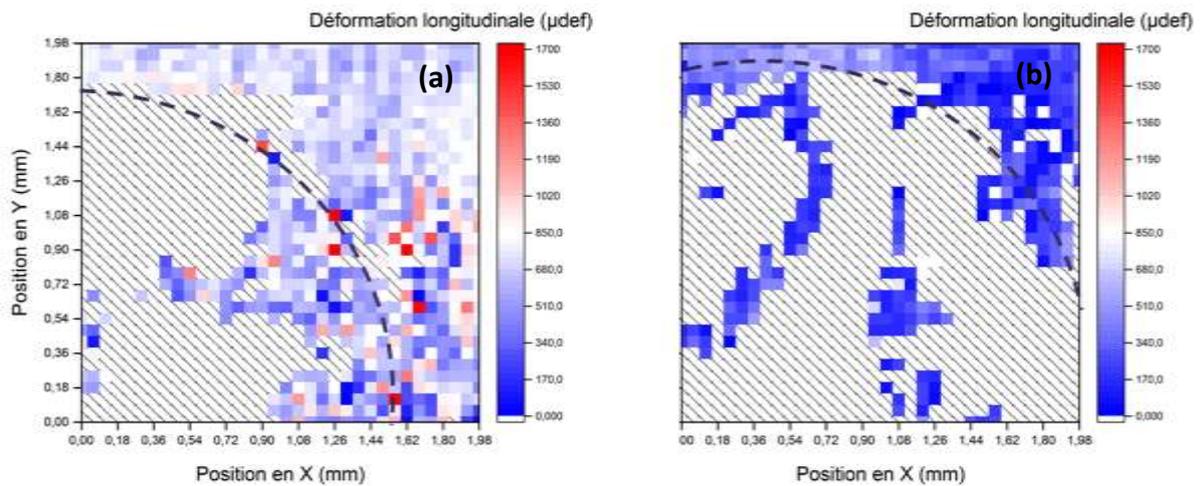


Figure IV.9 : Cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans {002} dans les particules d'HA dans et autour du défaut comblé par des grains de BCP à (a) 8 et (b) 20 semaines de régénération pour une charge de 30 N. Les déformations sont données en microdéformations (unité de 10^{-6}). La direction de chargement est suivant la direction X.

À 8 semaines, les déformations moyennes dans l'implant et dans l'os natif sont respectivement de $630 \pm 175 \mu\text{def}$ et de $703 \pm 90 \mu\text{def}$. À 20 semaines, ces déformations moyennes sont égales à $252 \pm 120 \mu\text{def}$ et à $419 \pm 142 \mu\text{def}$. Il est à relever qu'à 20 semaines de régénération les niveaux de déformation enregistrés dans l'os néoformé sont légèrement inférieurs à ceux mesurés dans l'os autour du défaut. Cela pourrait être expliqué par une rigidité apparente plus importante dans l'os régénéré par rapport à l'os natif ou par la présence de particules de BCP (matériau plus dur avec un module d'élasticité $E = 120 \text{ GPa}$ [Ruseska et Fidanchevska 2006]) non résorbé dans le défaut. Le caractère discontinu du tissu néoformé induit par l'implant synthétique, couplé à la forte hétérogénéité des propriétés mécaniques entre les grains de BCP et le tissu régénéré, créent ainsi une discontinuité mécanique dans le milieu, donc un faible transfert de charge entre les différentes zones de l'implant. Cet effet reste toutefois modeste aux vues des valeurs des déformations mesurées dans les deux parties.

La distribution du champ de déformation est relativement homogène entre la partie naturelle et la partie régénérée pour les deux temps de régénération présentés sur la figure IV.9. Cela traduit donc un module élastique E des cristaux régénérés proche de celui des cristaux présents initialement dans l'os autour du défaut. Cependant, ces résultats sont à nuancer en raison du nombre limité de points de mesure exploitables dans l'implant. En effet, le calcul

des déformations moyennes dans les parties naturelles et régénérées affiche des écarts-types élevés. Ainsi, ceux-ci ne permettent pas de conclure avec certitude sur l'homogénéité mécanique de la structure car ils sont emblématiques du peu de points exploitables. Il est à noter aussi qu'à 20 semaines, les déformations dans les deux zones sont plus faibles qu'à 8 semaines. Le matériau semble donc plus rigide avec le temps par un effet d'âge.

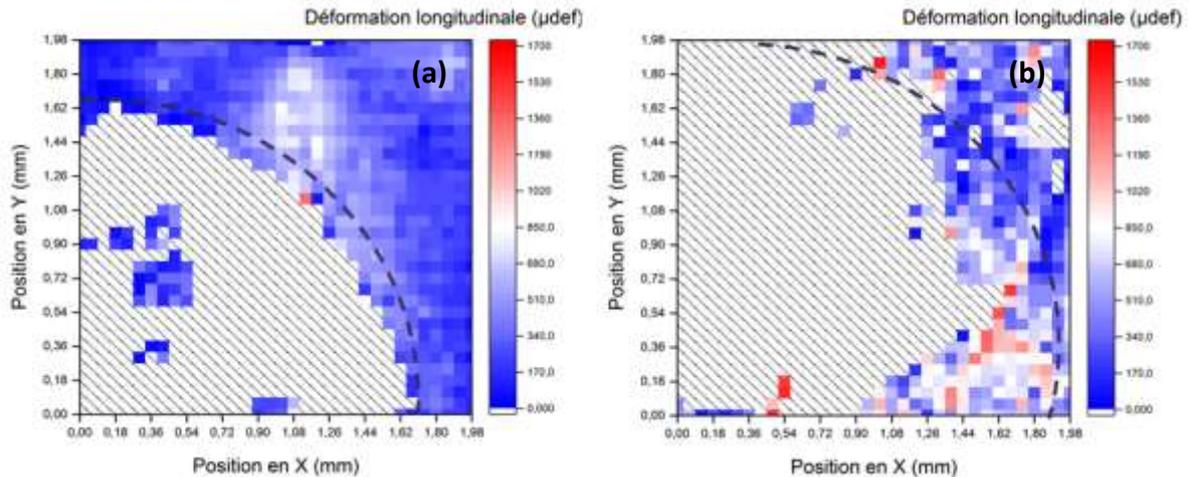


Figure IV.10 : Cartographies des déformations longitudinales de la famille de plans {002} dans les particules d'HA dans et autour du défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse à (a) 8 et (b) 20 semaines de régénération pour une charge de 30 N. Les déformations sont données sous forme de microdéformations (unité de 10^{-6}). La direction de chargement est suivant la direction X.

Les champs de déformations mesurés dans et autour du défaut comblé par le mélange BCP et moelle osseuse, à 8 et 20 semaines sont présentés sur la figure IV.10. Le nombre de points exploitables est encore plus faible ce qui rend délicate une interprétation très fine de nos résultats.

À 8 semaines, les déformations moyennes, respectivement dans l'implant et dans l'os natif, sont de $325 \pm 218 \mu\text{def}$ et de $332 \pm 110 \mu\text{def}$. À 20 semaines, ces déformations moyennes sont alors respectivement égales à $486 \pm 211 \mu\text{def}$ et à $520 \pm 254 \mu\text{def}$. À ces stades de régénération (8 et 20 semaines), les déformations semblent être homogènes dans la zone d'étude. Néanmoins, il est impossible de conclure sur l'implant en lui-même du fait du trop faible nombre de points.

Ces campagnes d'analyse ont permis de tester la méthodologie mise en place pour ce travail exploratoire pour l'analyse des paramètres microstructuraux et des champs de déformation par rayonnement synchrotron. Le nombre de points exploitables plus restreint pour la stratégie BCP + TBM ne peut être expliqué par les résultats obtenus lors des analyses biologiques qui montraient une repousse plus importante avec cette stratégie. Ceci met en lumière l'influence de la répartition non homogène des grains de BCP ainsi qu'une repousse osseuse non symétrique. Il serait alors nécessaire de faire des mesures sur l'ensemble du défaut et non sur $\frac{1}{4}$ de celui-ci. Ceci doit être fait sur plusieurs rats pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente au matériau étudié en se focalisant sur les temps de régénération élevés (8 et 20 semaines). En raison du temps limité de la thèse, le nombre de rats analysés par synchrotron a été nécessairement limité dès le départ. La présence des

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

particules de BCP nécessite également de développer une méthode d'analyse des pics de diffraction plus poussée. En effet, une procédure de déconvolution des pics de diffraction des différentes phases en présence semble être la meilleure stratégie à adopter ici. La figure IV.11 montre le travail initié afin d'augmenter le nombre de points exploitables dans le défaut. Cependant, les différences de profil des diffractogrammes entre les différents points de mesure, illustrées par les deux exemples présentés ci-dessous, rendent l'automatisation de la tâche impossible. Ces disparités peuvent être dues à une contribution plus ou moins importante du BCP dans le signal de diffraction ou à la formation d'une nouvelle phase dans la structure au cours de régénération.

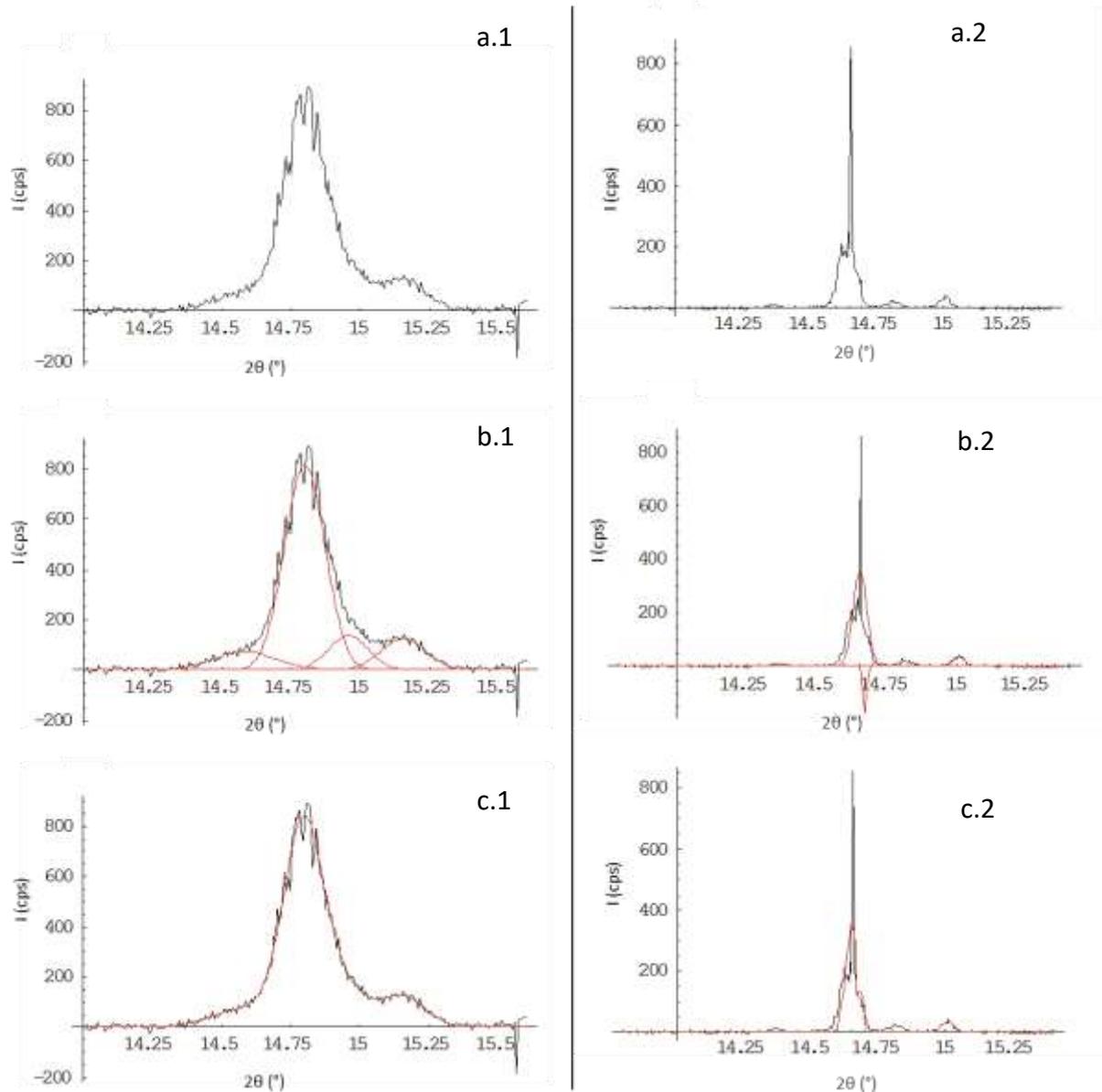


Figure IV.11 : Exemples de résultats de déconvolution des pics de diffraction dans deux points de mesures dans un défaut comblé par un mélange de BCP et de moelle osseuse. (a.1 et a.2) Diffractogrammes bruts en WAXS de deux points adjacents ; (b.1 et b.2) décomposition du signal de diffraction par quatre fonctions pseudo-Voigt ; (c.1 et c.2) ajustement global de la fonction mathématique (somme de quatre fonctions pseudo-Voigt).

En résumé, les cristaux d'HA présents dans le tissu régénéré autour des grains de BCP (matériau synthétique de comblement) et sur les berges du défaut présentent une réponse élastique identique à celle dans l'os natif au bout de 8 semaines de régénération. Cela traduit une restauration rapide des propriétés élastiques, à l'échelle des cristaux, du tissu néoformé à proximité du matériau de comblement. Cependant, ces résultats sont à relativiser de par le nombre réduit de points de mesure exploitables. À la lumière des résultats de cette étude exploratoire, une proposition d'une nouvelle méthodologie est faite pour résoudre les difficultés rencontrées.

IV.6.1. Nanoindentation

Les propriétés élastiques de l'os à l'échelle des ostéons ont été évaluées par nanoindentation. Étant donné la forte hétérogénéité induite par l'utilisation du matériau d'implant synthétique qu'est le BCP, le module d'indentation E_r et la dureté H_b ont été mesurés dans différentes zones afin de mettre en lumière les propriétés élastiques de l'os aux interfaces os natif – os régénéré et os régénéré – BCP. Les mesures par nanoindentation ont été réalisées sur les échantillons après 8 et 20 semaines de régénération pour les deux implants utilisés : BCP seul (figure IV.12) et le mélange BCP + TBM (figure IV.13).

L'analyse du module E_r et de la dureté H_b dans les parties naturelles montre les mêmes effets d'âge vus précédemment avec les mesures de déformation des cristaux d'HA (comportement plus rigide avec l'âge), peu importe le type d'implant considéré. En effet, le module d'indentation et la dureté évoluent respectivement de 18 ± 5 GPa à 23 ± 5 GPa et de $0,6 \pm 0,2$ GPa à $1 \pm 0,3$ GPa, entre 8 et 20 semaines de régénération pour les deux stratégies. Cette évolution est en accord avec les mesures réalisées dans la partie naturelle à proximité du site opératoire, chez les contrôles, qui ont montré une évolution du module E_r de ≈ 17 GPa à ≈ 23 GPa et de la dureté H_b de $\approx 0,2$ GPa à $\approx 0,3$ GPa, entre les prélèvements réalisés sur des rats âgés de 16 et 28 semaines (l'âge des rats au moment de la chirurgie est de 8 semaines). Les changements dans les propriétés mécaniques de l'os dus à l'effet de l'âge, à proximité d'un défaut comblé par un matériau synthétique, suivent la même tendance que ceux observés dans le cadre d'une repousse naturelle (trou vide).

Si on considère tout d'abord la partie régénérée des échantillons ayant des défauts comblés par du BCP seul à 8 et 20 semaines de régénération (figure IV.12), on peut alors remarquer que les valeurs du module d'indentation E_r évoluent peu sur cette durée. En effet, la variation dans les valeurs moyennes du module E_r et de la dureté H_b sont très faibles entre 8 et 20 semaines de régénération (respectivement, de $3,7 \pm 0,3$ GPa à $5,1 \pm 0,3$ GPa et de $0,16 \pm 0,02$ GPa à $0,23 \pm 0,02$ GPa). Il est à noter que les mesures de nanoindentation ont été réalisées dans une zone ne présentant que de la repousse osseuse (interface os natif – os régénéré) pour ce type d'implant (BCP seul) en raison de la faible repousse osseuse observée à l'interface os régénérée - BCP.

Vingt semaines après l'opération, le tissu osseux régénéré présente, à cette échelle d'analyse, un module élastique et une dureté beaucoup plus faible que le module élastique et la dureté déterminés dans l'os naturel. Ceci démontre que la récupération du comportement mécanique n'est pas encore achevée à ce stade de régénération. Ces effets peuvent être expliqués de par la nature du tissu qui comble le défaut à ce stade de régénération. En effet,

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

les observations histologiques montrent que le défaut est rempli d'un tissu fibreux non minéralisé à 20 semaines de régénération. D'autre part, l'image de la zone d'analyse par nanoindentation ne montre pas de structures lamellaires comparables à celles de la partie naturelle et influencent de fait fortement les caractéristiques mécaniques du tissu à cette échelle d'analyse. Cependant, ces résultats ne peuvent pas être généralisés sur tout le défaut en raison du caractère extrêmement localisé de l'analyse et du choix de la zone investiguée (loin du BCP).

Il est à rappeler ici, que les déformations moyennes dans les cristaux d'HA (résultats WAXS) du tissu osseux naturel ($520 \pm 254 \mu\text{def}$) sont proches des déformations moyennes dans le tissu régénéré ($486 \pm 211 \mu\text{def}$). L'homogénéisation du comportement mécanique à l'échelle nanométrique (échelle des cristaux) n'induit donc pas nécessairement une homogénéisation à l'échelle supérieure (échelle des ostéons et des lamelles). Ceci est forcément lié à la morphologie très différente entre l'os naturel (structure lamellaire) et l'os régénéré (os non organisé « woven bone »). En effet, les propriétés mécaniques de l'os à cette échelle sont conditionnées par l'empilement des lamelles, leur nombre et leur orientation.

Le module élastique E_r et la dureté mesurés dans l'os régénéré au niveau des berges de défauts laissés vides ($E_r = 6,7 \pm 2,9 \text{ GPa}$ et $H_b = 0,3 \pm 0,1 \text{ GPa}$) et des défauts ayant reçu du BCP ($E_r = 5,1 \pm 0,3 \text{ GPa}$ et $H_b = 0,23 \pm 0,02 \text{ GPa}$) ne montrent pas de différences importantes entre les deux situations. Cela suggère que le tissu régénéré en l'absence de l'implant (contrôle négatif) et le tissu régénéré avec du BCP possèdent pratiquement les mêmes propriétés mécaniques à l'échelle d'analyse en nanoindentation. Cette conclusion n'est valable que pour le tissu régénéré au niveau des berges du défaut, faute de mesures dans les différentes zones de défaut. En effet, le choix de la zone d'analyse s'est basé sur les résultats issus des observations histologiques qui montrent une néoformation importante sur les berges du défaut implanté par du BCP seul. Les similitudes dans les propriétés mécaniques du tissu régénéré, avec ou sans implant (respectivement chez les contrôles négatifs et les rats implantés par du BCP seul), peuvent être donc expliquées par une repousse spontanée (similaire à la repousse des trous vides) au niveau des berges du défaut où l'influence du BCP est minimale.

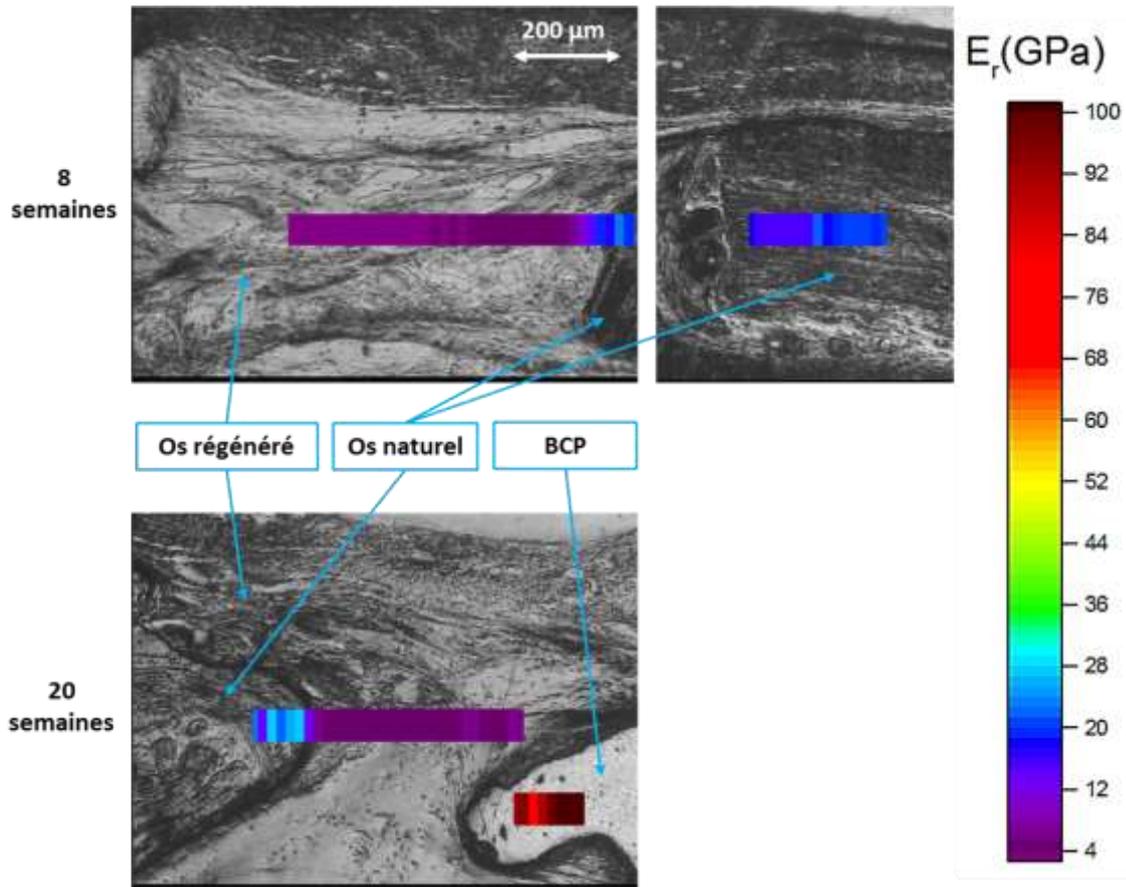


Figure IV.12 : Module élastique E_r des os régénéré et naturel des défauts comblés par du BCP seul, à 8 et 20 semaines de régénération, mesuré par nanoindentation.

L'étude par nanoindentation menée sur les défauts comblés par le mélange de BCP et de moelle osseuse a mis en lumière l'hétérogénéité du tissu régénéré et l'influence de la présence du BCP. En effet, la quantification des variations locales du module d'indentation E_r (figure IV.13) et de la dureté H_b a été réalisée suivant une ligne de mesure couvrant les différentes zones allant de la partie naturelle jusqu'à l'os régénéré en passant par des particules de BCP.

La figure IV.13 montre clairement l'influence de la présence d'un matériau synthétique de haute résistance ($E_r = 107 \pm 12$ GPa et $H_b = 5,1 \pm 0,8$ GPa) sur le comportement de l'os régénéré.

Une évolution progressive dans le module d'indentation a été observée à 8 et à 20 semaines de régénération, entre l'os natif et l'os régénéré et/ou entre les particules de BCP et l'os régénéré. En effet, on peut facilement constater la graduation des couleurs bleu vert ($E_r \approx 28$ GPa), bleu ($E_r \approx 20$ GPa) et violet ($E_r \approx 6$ GPa) sur la figure IV.13 au niveau des interfaces os natif – os régénéré et BCP – os régénéré, et qui traduit l'évolution du module d'indentation E_r à ces interfaces. Il est à noter aussi que l'os régénéré contigu aux particules de BCP semble être plus résistant que celui néoformé plus loin. Ceci pourrait être interprété par une influence sur les propriétés mécaniques de la structure néoformée due à la présence du BCP et/ou par la contribution de ce dernier à la réponse mécanique à l'interface BCP – os régénéré. D'autre

IV. Caractérisation de la régénération osseuse par un matériau d'implant synthétique (BCP)

part, il est admis que l'apposition d'un nouvel os s'appuie obligatoirement sur une surface préexistante telle que l'os natif, les surfaces du matériau de comblement (ici grains de BCP) ou encore une couche d'os néoformé déjà minéralisé (empilement des couches d'os néoformé). À l'interface se trouve donc l'os néoformé le plus « vieux » qui sera donc plus minéralisé que l'os néoformé plus récent que l'on trouvera plus loin de l'interface. Il est à rappeler ici que le degré de minéralisation confère à l'os sa rigidité. Il est possible d'identifier le tissu lamellaire dans le défaut régénéré par du BCP + TBM (figure IV.13 ; 8 semaines) et qui n'était pas visible sur les images des défauts implantés par du BCP seul (figure IV.12). Étant donné que la présence de l'os lamellaire améliore la résistance du tissu, il est possible de conclure que l'ajout de la moelle osseuse accélère la récupération de la fonction mécanique à l'échelle microscopique. Il est à noter que certaines zones d'os néoformé non organisé possèdent un module d'indentation supérieur à d'autres zones d'os lamellaire. Ceci peut s'expliquer par la différence de degrés de minéralisation entre les deux tissus, le second ayant subi le processus de remodelage. En effet, la présence d'os lamellaire néoformé est le résultat du remodelage de l'os primaire néoformé (woven bone) (résorption de l'os fibrillaire non organisé et formation d'un os lamellaire organisé). Il est possible donc que l'os non organisé soit plus minéralisé donc, plus résistant, que l'os remodelé (lamellaire).

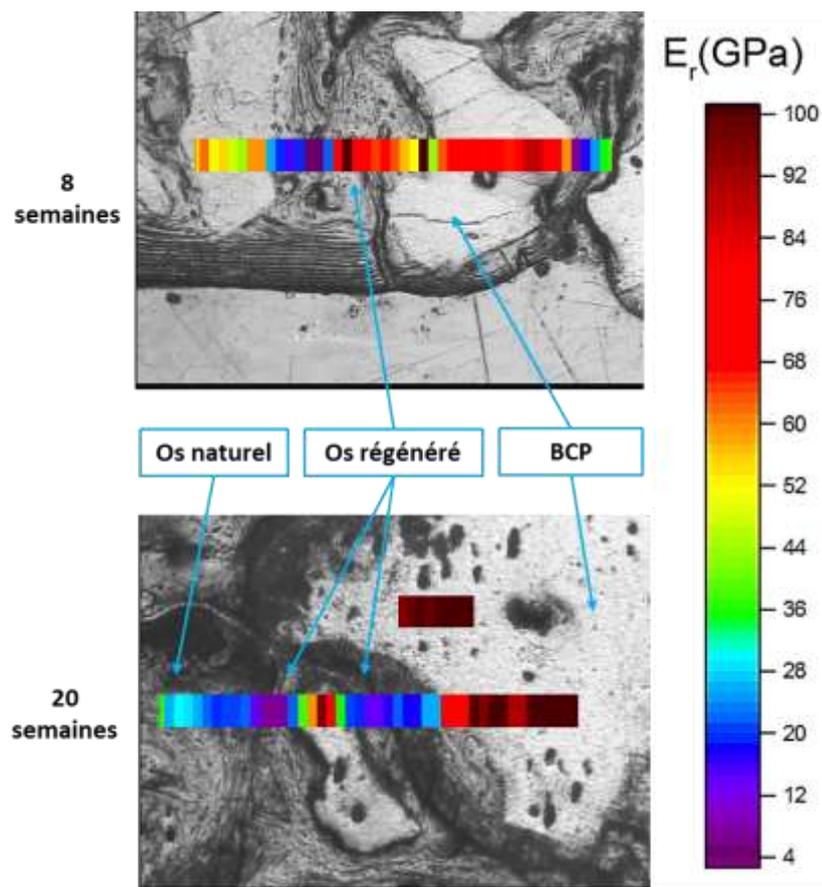


Figure IV.13 : Module élastique E_r des os régénéré et naturel des défauts comblés par un mélange de BCP et de moelle osseuse, à 8 et 20 semaines de régénération, mesuré par nanoindentation.

Finally, contrary to the implantation of the bone graft, the use of a synthetic material with superior mechanical properties for the filling of the defect influences the mechanical properties of the regenerated tissue. A stiffer structure was observed around the BCP grains compared to the regenerated one at a distance. The analyzed properties show an evolution in space and time and highlight the heterogeneity of the structure in the context of a regeneration using a synthetic filling material. The addition of bone marrow accelerates the formation of lamellar bone that improves the mechanical properties of the regenerated bone at this scale of study (scales of osteons and lamellae).

IV.7. Conclusions

L'analyse de l'évolution de l'état mécanique et l'expertise des processus biologiques au cours de la régénération osseuse d'un défaut par un matériau synthétique seul (BCP) ou associé à de la moelle osseuse montre que l'utilisation du BCP comme matériau de comblement permet, sur le plan structural et mécanique, une récupération des propriétés résultantes de l'os régénéré proches de celles obtenues par greffe osseuse. Néanmoins, l'efficacité du BCP est très limitée au vu du faible pourcentage de régénération osseuse dans le défaut. Du point de vue biologique, l'intégration d'un matériau synthétique est similaire à celle du greffon osseux, induisant inflammation, formation, résorption, et minéralisation. Cependant ces événements sont plus lents à cause du faible taux de résorbabilité du BCP par rapport à l'os (greffon osseux utilisé précédemment).

Une faible masse d'os néoformé par volume d'os a été mesurée dans les défauts remplis par du BCP seul. Cette néoformation est observable principalement sur les berges du défaut et ne conduit pas à un comblement parfait du défaut qui reste majoritairement rempli par des grains de BCP non résorbés à 20 semaines de régénération.

La présente analyse a pu mettre en lumière l'intérêt de l'ajout de la moelle osseuse aux particules de BCP utilisées dans le comblement d'un défaut crânien. En effet il a été démontré que l'association de la moelle osseuse au BCP lui confère sa bioactivité ainsi qu'un caractère ostéoinducteur qui stimule la repousse osseuse. L'association BCP + TBM induit une repousse, non seulement au niveau des berges osseuses, mais aussi dans le défaut au niveau des grains de BCP. De manière générale, une régénération plus importante est observée avec du BCP + TBM comparativement au BCP seul.

Du point de vue mécanique, l'interprétation des résultats des essais de traction *in situ* en WAXS avec un microfaisceau synchrotron est limitée à des zones localisées en raison de l'impossibilité d'exploiter le signal diffusé par l'os néoformé dans le défaut, qui est alors noyé dans le signal de diffusion des particules de BCP. Néanmoins, les zones étudiées ont permis d'observer une homogénéisation des propriétés mécaniques entre l'os néoformé et l'os natif autour du défaut à 8 et 20 semaines de régénération pour les deux implants. Il n'a pas été possible de conclure sur la totalité de l'implant, mais le comportement mécanique des zones analysées est similaire à celui obtenu avec la greffe osseuse. D'autre part, les mesures de nanoindentation montrent que le tissu régénéré autour des grains de BCP dans le cas du BCP + TBM présente une résistance mécanique améliorée de par l'ajout de la moelle osseuse qui favorise la formation d'un tissu lamellaire et donc une récupération mécanique rapide du tissu néoformé. Finalement, à l'échelle des lamelles, le tissu régénéré par implantation du BCP semble avoir une résistance plus importante que celui régénéré spontanément (contrôle négatif).

V. Discussion

V.1.	Introduction.....	151
V.2.	Évaluations biologiques.....	152
V.3.	Évaluation morphologique et distribution spatiale des orientations de la phase minérale HA	157
V.3.1.	Épaisseur moyenne des particules minérales (paramètre T).....	157
V.3.2.	Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré (paramètre H).....	159
V.4.	Évaluation du comportement mécanique.....	160
V.4.1.	Champs de déformation dans les cristaux d'HA.....	160
V.4.2.	Quantification des propriétés mécaniques de l'os par nanoindentation	161
V.5.	Description du processus de régénération au cours du temps suivant le type d'implant : confrontation des résultats des différentes techniques d'analyses	162

V.1. Introduction

Les phosphates de calcium biphasiques (BCP) synthétiques ont été largement utilisés en tant que substituts osseux au cours de ces dernières années, comme une alternative pertinente aux os autogènes. Plusieurs recherches se sont attardées à étudier l'intégration d'un matériau synthétique dans un milieu biologique afin d'analyser les réactions du tissu naturel, explorant les propriétés de biocompatibilité et de bioactivité de l'implant ainsi que son influence sur le processus de régénération osseuse. Cependant, une étude fine de la microstructure développée ainsi qu'une évaluation de la capacité de récupération mécanique fonctionnelle du tissu régénéré sont alors nécessaires afin de valider, de manière fiable, l'utilisation de certains matériaux synthétiques, tels que le BCP, comme une alternative viable aux implants osseux, qui restent aujourd'hui les plus efficaces pour la réparation des pertes osseuses. En effet, l'os (qu'il s'agisse d'autogreffe ou d'allogreffe) constitue actuellement la référence en matière d'implant pour la régénération osseuse puisqu'il regroupe les trois éléments-clés de la réussite de la reconstruction osseuse (l'ostéo-induction, l'ostéo-conduction et l'activité ostéogénique). Outre ses surfaces ostéoconductrices, il contient des cellules (MSCs, ostéoblastes quiescents...) qui sont capables d'activité ostéogénique sous l'induction de facteurs à propriétés ostéoinductrices (BMP, FGF, IGF...) présents localement dans la matrice osseuse. Le choix d'un matériau synthétique de substitution à l'os doit être justifié, à la fois biologiquement, mais aussi mécaniquement, et ce, au travers de critères pertinents.

L'objectif de ce cinquième chapitre est de confronter les résultats obtenus lors de la régénération par greffe osseuse (qui constitue la stratégie régénérative de référence) à ceux obtenus par implantation de phosphate de calcium biphasé (BCP) seul ou associé à de la moelle osseuse (TBM) afin de mieux évaluer la pertinence de l'utilisation du BCP dans la réparation osseuse. Par la suite, ce chapitre vise également à mettre en perspective les différents aspects investigués, tant du point de vue microstructural que mécanique, avec les processus biologiques associés et les cinétiques relatives, et enfin, de confronter la pertinence de ces conclusions au regard de la littérature.

Dans un premier temps, une synthèse des processus biologiques présents, des distributions morphologiques et de la répartition spatiale des orientations de la composante minérale (cristaux d'HA) régénérée ainsi que des caractéristiques mécaniques du tissu à deux échelles d'analyse (nano- et micro-scopique) est présentée pour les différents types d'implants (BG, BCP seul et BCP + TBM) afin de comparer les stratégies étudiées et conclure sur leurs efficacités relatives à régénérer l'os. Le positionnement du BCP en tant que matériau de comblement, comparativement à d'autres matériaux de comblement rencontrés dans la littérature, sera notamment discuté dans ce chapitre. Une confrontation entre les résultats des différentes techniques d'implantation utilisées sera faite pour apporter des éléments de réponse sur le processus de régénération au cours du temps après l'implantation d'un substitut osseux isolé (greffe osseuse), d'un biomatériau (BCP) seul ou associé à une moelle osseuse (BCP + TBM).

V.2. Évaluations biologiques

La première période (2 semaines), correspondant à l'expansion du tissu régénéré dans les défauts crâniens, montre deux cinétiques de régénération différentes entre le comblement par du BCP seul et le mélange BCP + TBM. Elles sont, respectivement, analogues à celles rencontrées lors de la repousse spontanée (contrôle négatif) et au cours de la régénération par greffe osseuse (BG) (figure V.1).

Sur le site du défaut implanté uniquement par du BCP, seuls du tissu fibreux et de l'infiltrat inflammatoire comblent le défaut et couvrent la surface des particules du matériau synthétique. Aucun signe de repousse osseuse n'a pu être observé dans le centre du défaut, comme dans le cas du contrôle négatif, ou encore autour des grains de BCP. Une formation osseuse (tissu ostéoïde, figure V.1) est uniquement initiée sur les berges du défaut à ce stade de régénération pour le contrôle comme pour les défauts remplis par du BCP seul.

Contrairement au BCP seul et au contrôle négatif, la formation osseuse avec du BG ou un mélange BCP + TBM débute rapidement après l'implantation, non seulement sur les berges, mais aussi dans le centre du défaut, loin de l'os natif. Outre le développement constaté sur les berges, un tissu ostéoïde est observé autour des grains de BCP à la manière de celui observé autour les fragments du greffon osseux à 2 semaines de régénération (figure V.1). Le mélange BCP + TBM manifeste ainsi des caractéristiques comparables à celles du greffon osseux en termes d'ostéoinductivité et d'apport de cellules à capacité ostéogénique inductible qui favorisent par conséquent la régénération osseuse, contrairement au BCP seul qui n'apporte pas les facteurs nécessaires pour stimuler la néoformation loin de l'os natif. Entre 4 et 8 semaines après chirurgie, une activité de résorption apparaît puis augmente au niveau du défaut surtout au niveau des grains de BCP et du greffon. Néanmoins, la résorption semble plus importante (plus de marquage TRAP sur les coupes histologiques) dans les défauts comblés par un greffon osseux ou par un mélange de BCP + TBM comparativement à ceux ayant reçu du BCP seul. Dès lors, il est également possible d'observer localement, dans ces défauts, des zones adjacentes de résorption (marquage TRAP) et de formation (zone ostéoïde) indiquant des zones restreintes de remodelage du tissu minéralisé.

Après 20 semaines de régénération, le site du défaut comblé par du BCP seul est majoritairement rempli par du tissu fibreux comme pour les contrôles négatifs (figure V.2). Néanmoins, une formation osseuse dans le centre du défaut peut être observée localement autour des grains de BCP non résorbés. Cela confirme les propriétés ostéoconductrices de ce matériau synthétique.

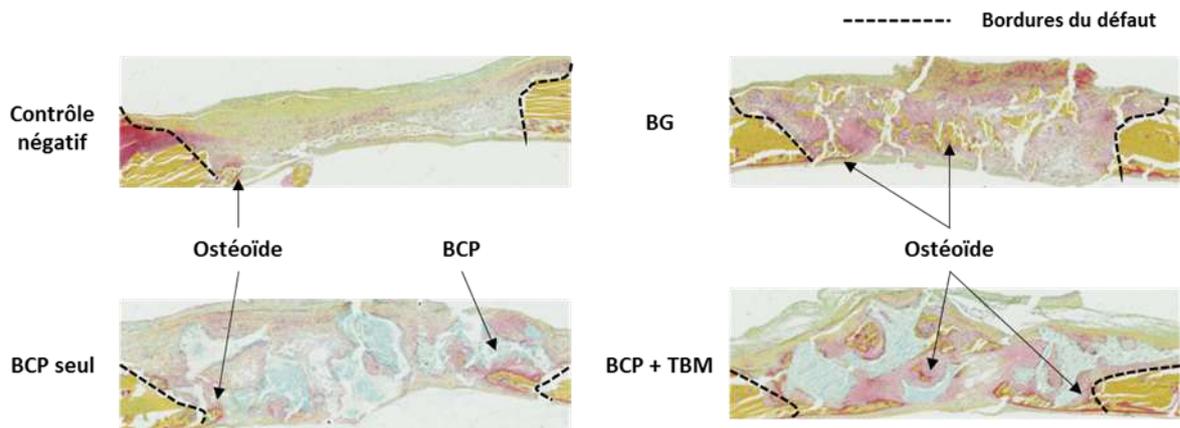


Figure V.1 : Coupes histologiques frontales (coloration au pentachrome de Movat) à 2 semaines de régénération au niveau d'un défaut laissé vide (contrôle négatif) ou comblé par un greffon osseux (BG), des grains de BCP seuls ou associés à de la moelle osseuse totale (BCP + TBM).

La figure V.2, montre la présence d'un tissu minéralisé sur le site du défaut implanté par un mélange BCP + TBM, qui est absent dans le cas du défaut régénéré avec du BCP seul. Cependant, la coupe histologique présentée ne montre pas que l'os de repousse est constitué d'un tissu lamellaire bien organisé comme cela est observé dans le défaut régénéré par greffe osseuse. En outre, dans un le cas d'une régénération parfaite, l'os nouvellement formé devrait remplacer le matériau d'implantation, celui-ci étant résorbé pendant le processus de réparation. Toutefois, ce résultat souhaité (remplacement du BCP par du tissu osseux) n'a pas été atteint dans la présente étude. Une période de régénération de 20 semaines n'est donc pas suffisante dans nos conditions expérimentales pour que le BCP soit résorbé. L'ajout de moelle osseuse contenant des précurseurs ostéoclastiques, qui favorise la résorption du BCP comme l'ont montré Lerouxel *et al.* [Lerouxel et al. 2006] sur un autre modèle animal, n'a pas non plus permis la résorption complète du matériau. En effet, ces auteurs ont montré que la quantité de BCP restante dans un défaut de 3 mm dans les tibias de rats après 3 semaines de régénération est trois fois plus faible avec un mélange ICPS + TBM (ICPS : Injectable Calcium Phosphate Scaffold, BCP mélangé avec un polymère hydrophile dans un rapport pondéral de 50/50) qu'avec l'ICPS seul. Ces résultats permettent d'apprécier l'efficacité due à l'ajout de la moelle osseuse de manière générale sans pour autant nous permettre de réaliser une comparaison quantitative étant donné les différences entre les cinétiques de régénération dans les os longs et les os plats.

V. Discussion

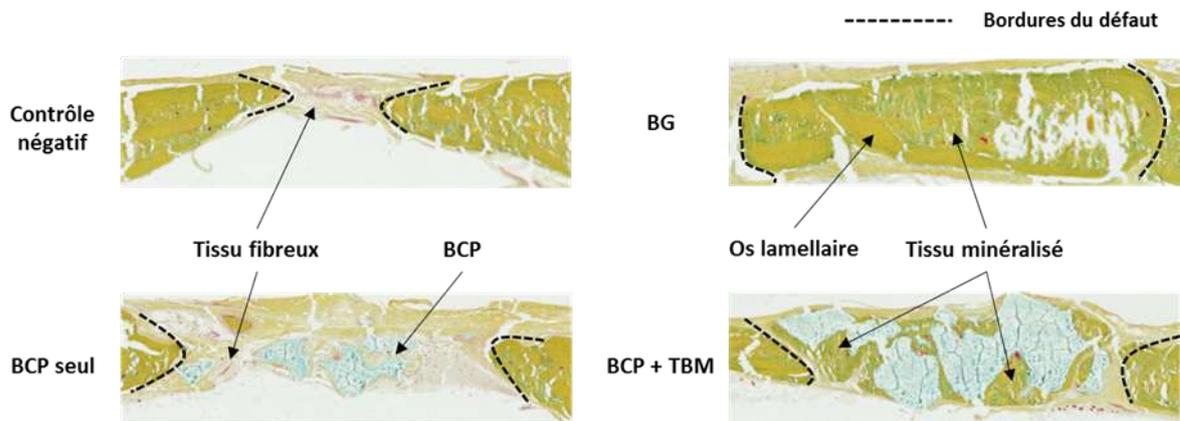


Figure V.2 : Coupes histologiques frontales (coloration au pentachrome de Movat) à 20 semaines de régénération au niveau d'un défaut laissé vide (contrôle négatif) ou comblé par un greffon osseux (BG), des grains de BCP seuls ou associés à de la moelle osseuse totale (BCP + TBM).

Le volume minéral (Mineral Volume : MV) présent dans les défauts qui ont reçu un greffon osseux (BG), des grains de BCP seuls ou mélangés à la moelle osseuse est illustré par le pourcentage MV/TV (figure V.3). Il est à préciser ici que le volume minéral quantifié inclut non seulement le volume des minéraux contenu dans l'os néoformé, mais aussi celui afférent au matériau de comblement (BCP ou BG) dans la région d'intérêt. Ainsi, pour des temps courts (2 et 4 semaines de régénération), le volume minéral mesuré dans les défauts comblés par des implants à base de BCP (seul ou en mélange) est supérieur à celui mesuré dans les défauts comblés par un greffon osseux (figure V.3). Ceci ne peut être attribué à une formation osseuse importante à ces temps de régénération, mais plutôt à un volume de départ plus grand du matériau d'implant dans le défaut. En effet, la grande taille et l'irrégularité de forme des grains de BCP par rapport aux fragments osseux qui composent le greffon osseux expliquent le volume minéral quantifié supérieur (la quantité de BCP présent dans le défaut est beaucoup plus importante que celle du BG). Par ailleurs, en utilisant un seuillage approprié, la quantification du volume de BCP présent dans le défaut à chaque temps de régénération montre qu'il évolue peu au cours du temps. Les volumes de BCP et du BG mesurés à 2 semaines peuvent être considérés comme le volume initial implanté dans le défaut.

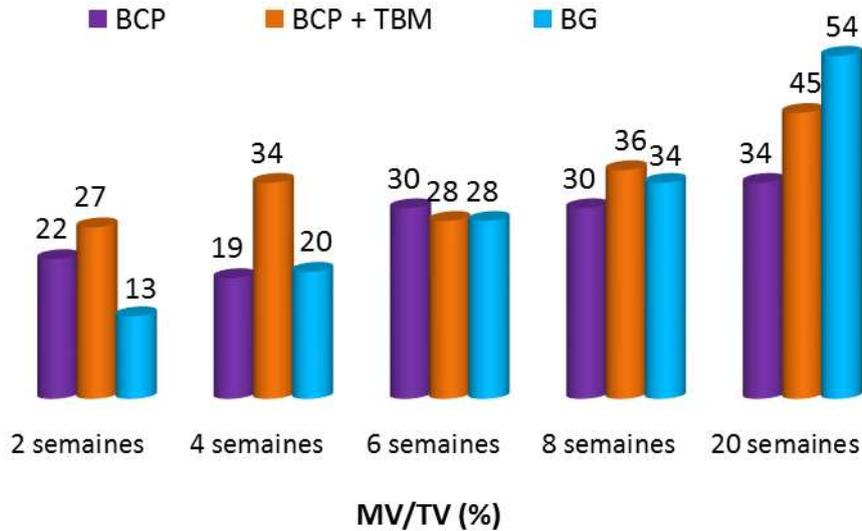


Figure V.3 : Évolution du volume minéral/volume total (MV/TV) en fonction de la durée de régénération (2, 4, 6, 8 et 20 semaines) dans des défauts crâniens comblés par un greffon osseux, des grains de BCP seuls ou associés à la moelle osseuse totale (BCP + TBM). Ces résultats sont exprimés en % et chaque barre représente une mesure dans un défaut.

Afin de s'affranchir du volume minéral initial de l'implant qui rend les résultats moins lisibles, nous proposons de suivre l'évolution du rapport MV/TV au cours de temps en rapportant le volume minéral quantifié à chaque temps à celui mesuré à 2 semaines qui est alors considéré comme référence (volume initial de l'implant) et permettant, en première approximation, une comparaison plus aisée et fiable entre les différents implants (figure V.4).

L'augmentation du volume minéral entre le premier (à 2 semaines) et le dernier prélèvement (à 20 semaines) dans les défauts qui ont reçu des grains de BCP mélangés à la moelle osseuse (18 %) est supérieure à celle du volume dans les défauts comblés par du BCP seul (12 %). Néanmoins, cette augmentation, que l'on peut associer à l'ajout de moelle osseuse, reste largement inférieure à celle obtenue avec le greffon osseux (41 %). De plus, l'augmentation du volume minéral au cours du temps obtenu avec le BG est beaucoup plus régulière et importante comparée à celle obtenue avec le BCP mélangé à la moelle osseuse. En effet, le graphe ne montre une réelle augmentation qu'au temps de régénération le plus long pour l'association BCP + TBM. Malgré les différences au niveau des activités de formation et de résorption observées sur les coupes histologiques entre les implants de BCP avec et sans moelle, il n'y a pas de différence notable au niveau de la quantification du volume minéral avant 20 semaines de régénération. Ceci peut s'expliquer par la différence de sensibilité entre l'histologie et l'analyse par microtomographie X, mais également par l'évaluation 2D sur seulement 2 à 3 niveaux de coupes histologiques qui ne sont pas complètement représentatifs du défaut dans son ensemble alors que l'analyse 3D au microtomographe X prend en compte la totalité du défaut pour la quantification.

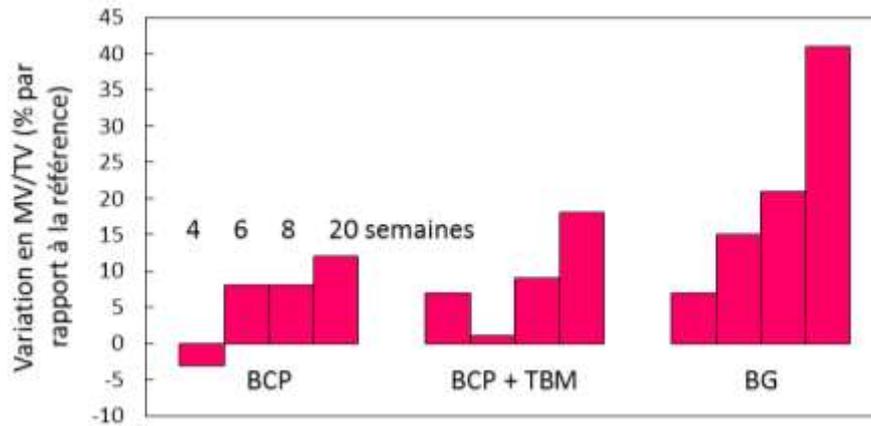


Figure V.4 : Variation du volume minéral/volume total (MV/TV) calculé à chaque temps de régénération et rapporté au MV/TV mesuré à 2 semaines (référence) dans des défauts crâniens comblés par un greffon osseux, des grains de BCP seuls ou associés à la moelle osseuse totale (BCP + TBM).

Cette analyse indique que l'ostéoinduction induite et la quantité de cellules à capacité ostéogénique apportée par l'ajout de la moelle osseuse ne sont pas suffisantes pour atteindre le niveau de réussite de l'allogreffe du point de vue biologique. Toutefois, il est à noter que l'association de la moelle osseuse au BCP semble être plus efficace que le BCP seul. Ce constat corrobore les résultats d'études similaires réalisées sur d'autres types de xéno greffes. En effet, les observations histologiques de Develioglu *et al.* [Develioglu et al. 2009], réalisées sur les coupes d'un défaut crânien régénéré à l'aide d'une matrice extracellulaire d'hydroxyapatite d'origine bovine, montrent aussi que la repousse osseuse n'est pas suffisante pour conduire au comblement du défaut et que la néoformation est initiée uniquement sur les berges du défaut. Les auteurs affirment ainsi que le matériau de la xéno greffe ne montre aucun signe de résorption et ils ne constatent aucune formation osseuse dans la région centrale du défaut.

L'apport lié à l'association de la moelle osseuse au BCP a été évalué non seulement chez des rats sains, mais aussi dans un milieu irradié. Espitalier, Thery et leurs collaborateurs [Espitalier et al. 2009 ; Thery et al. 2015] ont montré que, même dans un milieu irradié, l'association de TBM au BCP est bénéfique à la régénération. En effet, la formation osseuse avec le mélange BCP + TBM est largement supérieure à celle obtenue avec du BCP seul (20 fois plus de volume osseux à 3 semaines post-implantation en milieu irradié). Les auteurs ajoutent que le défaut comblé avec le mélange BCP + TBM est mieux revascularisé que celui implanté par du BCP seul (3 fois plus de vaisseaux dans la zone d'étude). En effet, ils considèrent que l'ajout de la moelle osseuse favorise la formation osseuse et accélère la cicatrisation grâce à sa contenance en diverses populations cellulaires, notamment en cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques qui peuvent se différencier en ostéoblastes et ostéoclastes (cellules compétentes responsables de la production et la résorption des tissus minéralisés).

V.3. Évaluation morphologique et distribution spatiale des orientations de la phase minérale HA

V.3.1. Épaisseur moyenne des particules minérales – cristaux d’HA (paramètre T)

La relation de dépendance à l’âge du paramètre T, représentant l’épaisseur moyenne des cristaux d’HA, a été analysée chez des rats non opérés (pas de perturbation chirurgicale) ainsi que dans les parties adjacentes aux défauts, lors des régénérations par implantation d’un greffon osseux ou d’un matériau synthétique (BCP). Les différentes situations étudiées (sans défaut, BG et BCP) montrent une évolution de l’épaisseur des cristaux avec l’âge des animaux. Cette évolution est caractérisée par deux phases (figure V.5) : une augmentation rapide s’opérant entre 10 et 16 semaines suivie d’une décélération jusqu’à la saturation du paramètre T entre 16 et 28 semaines. Cette progression en deux temps de l’épaisseur des cristaux a également été observée par Fratzl *et al.* en 1991 [Fratzl et al. 1991a] et expliquée par le processus de minéralisation dans les os et le vieillissement naturel des rats.

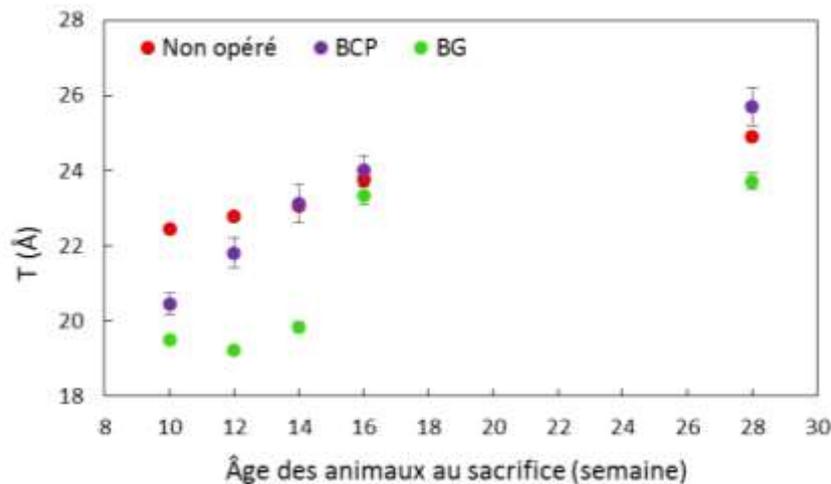


Figure V.5 : Épaisseur moyenne des cristaux d’HA (paramètre T) déterminée par SAXS dans les parties naturelles des calvariae non opérées et à l’extérieur des défauts implantés par du BCP seul et par un greffon osseux, en fonction de l’âge

Il est à noter ici que la différence systématique d’épaisseur des cristaux entre les rats de même âge (exemple des rats de 28 semaines) implantés par greffe osseuse ($T = 23,72 \pm 0,21 \text{ \AA}$) et non opérés ($T = 25,00 \pm 0,07 \text{ \AA}$) n’est pas présente dans le cas des rats ayant subi une implantation de BCP ($T = 25,7 \pm 0,5 \text{ \AA}$). Ceci peut être lié à une dispersion biologique correspondant à une variabilité inter-individu. En effet, au début de l’expérience (à l’âge de 10 semaines), la valeur moyenne de l’épaisseur dans les parties naturelles des rats ayant été implantés par du BCP ($20,43 \pm 0,26 \text{ \AA}$) est supérieure à celle des rats implantés par greffe osseuse ($19,49 \pm 0,07 \text{ \AA}$). Cependant, l’évolution entre 10 et 28 semaines est quasi-identique pour les deux situations (augmentation de $4,27 \text{ \AA}$ pour le BCP et de $4,23 \text{ \AA}$ pour le BG). Quelle que soit la nature du matériau de comblement (BG ou BCP), les écarts-types déterminés sur

les rats implantés sont plus élevés que ceux déterminés dans les calvariae non opérées. Ceci traduit l'hétérogénéité apparente du tissu adjacent au défaut et peut s'expliquer par l'influence du processus de réparation, s'opérant au sein du défaut, sur le tissu natif environnant au travers des activités biologiques induites par la régénération (inflammation, migration cellulaire des berges vers le défaut...). En effet, d'une part, les rats non opérés n'ont pas subi de lésion qui peut déstabiliser l'évolution habituelle des cristaux. D'autre part, la réaction à la perturbation due à la création du défaut peut être différente d'un individu à l'autre.

L'analyse temporelle de la distribution du paramètre T dans un défaut comblé par un greffon osseux au cours de sa régénération montre une évolution importante entre 6 et 8 semaines post-chirurgie, suivie d'une homogénéisation des épaisseurs à 20 semaines de régénération sur l'ensemble de la zone étudiée (défaut et partie naturelle). Un gradient spatial observé à 8 et 20 semaines a mis en évidence une évolution centripète du paramètre T au sein du défaut et une homogénéisation progressive entre l'os natif et régénéré, initiée à la lisière du défaut. Hoerth *et al.* [Hoerth et al. 2014] ont analysé l'évolution spatiale et temporelle du paramètre T en déterminant par SAXS l'épaisseur moyenne des particules minérales en fonction de la distance au site opératoire sur des fémurs de rats, et ce, à différents stades de régénération (2, 3 et 6 semaines de régénération) dans le cas de défauts (non critique de 1 mm et critique de 5 mm) régénérés spontanément (contrôle négatif). Les auteurs montrent que le paramètre T présente un gradient spatial, mais sans variation dans le temps. En effet, les valeurs moyennes des épaisseurs dans l'os régénéré augmentent en s'éloignant du centre du défaut, mais aucune évolution n'a été observée au cours du temps. Les auteurs ajoutent que les valeurs du paramètre T dans l'os régénéré sont très proches des valeurs déterminées dans l'os natif dès la seconde semaine de régénération. Cette discordance de résultat peut être expliquée par la présence de l'implant (matériau de comblement) dans le cas de notre étude qui peut influencer la taille des cristaux régénérés. De plus, l'âge initial (début de l'expérience) des rats de l'étude de Hoerth *et al.* (12 semaines) est différent de celui de cette étude (8 semaines). Dans notre cas, l'épaisseur des cristaux au début des expériences n'a pas encore atteint son maximum (les rats ne sont pas encore matures) et elle est donc toujours en évolution continue sous l'effet de l'âge. Liu *et al.* [Liu et al. 2010] ont décrit des phénomènes similaires à ceux observés dans notre étude, dans le cadre d'une régénération spontanée d'un défaut de 3 mm d'un os long de mouton (fémur) âgé de 2 ans et demi. Les auteurs mettent en évidence non seulement l'évolution du paramètre T en fonction de la distance au site opératoire, mais aussi une évolution continue au cours du temps de l'épaisseur des cristaux. Une évolution importante de l'épaisseur des cristaux est observée entre 6 et 9 semaines, de manière analogue à celle constatée entre 6 et 8 semaines dans notre étude. L'évolution observée dans ces études pour les temps courts laisse à penser que l'homogénéisation aurait été constatée si celles-ci avaient été poursuivies suffisamment longtemps.

V.3.2. Distribution spatiale des orientations des particules minérales dans l'os régénéré (paramètre H)

Au regard de la forte dépendance du comportement mécanique de l'os à l'échelle nanométrique à l'orientation des cristaux, la distribution spatiale de l'orientation des particules minérales au sein du défaut au cours de sa régénération a fait l'objet de plusieurs études.

Les coupes histologiques de cette étude montrent que, dans les défauts comblés par un greffon osseux, les fragments ont été progressivement et majoritairement résorbés au bout de 8 semaines de régénération et ils ont été remplacés par de l'os néoformé ayant des cristaux alignés avec ceux de l'os naturel. Les cristaux d'HA régénérés sont donc parfaitement alignés avec les cristaux de l'os natif dès leur première formation et seuls les cristaux provenant de l'implant non résorbé montrent un désalignement. De manière analogue, l'analyse de l'évolution du facteur H au cours de la régénération des défauts comblés par du BCP seul ou mélangé à la moelle osseuse a montré que les cristaux d'HA régénérés autour du matériau synthétique sont orientés selon la direction préférentielle des cristaux présents dans l'os natif dès leur première formation. Pour la greffe osseuse, il est à rappeler que la distribution du facteur H dans le défaut est initialement fortement aléatoire en raison de la présence originelle du greffon osseux. Aucune orientation préférentielle à 2 et 6 semaines de régénération n'est observée, à l'exception de l'interface entre l'os naturel et l'os régénéré dû à la présence du tissu néoformé (figure V.6). Pour les stratégies BCP ou BCP + TBM, une évolution similaire est constatée pour l'orientation des cristaux du tissu néosynthétisé (figure V.6).

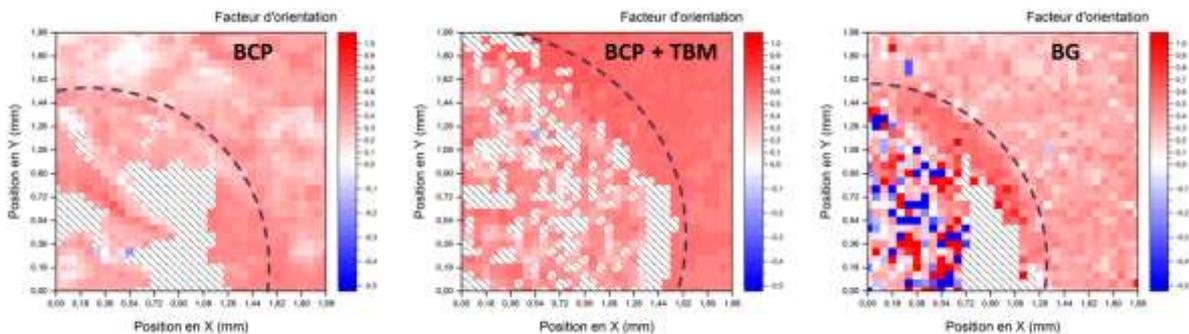


Figure V.6 : Cartographies du facteur d'orientation d'Hermans dans et autour du défaut (indiqué par des pointillés noirs) comblé par un greffon osseux, du BCP seul ou mélangé avec de la moelle osseuse, après 6 semaines de régénération.

L'homogénéité de la cartographie du facteur H à 8 et 20 semaines post-chirurgie des défauts comblés par un greffon osseux (figure III.11) reflète la résorption de l'implant et la synthèse de la nouvelle matrice. De la même manière, l'augmentation du nombre de points analysables dans les cartographies du facteur H des défauts comblés par du BCP et du BCP + TBM incarne une repousse plus importante avec le temps (figure IV.7 et IV.8). En effet, les points de mesure

retenus traduisent la présence d'un os néoformé dont les cristaux sont systématiquement orientés selon l'orientation préférentielle de l'os natif.

Il est possible d'affirmer ici que la présence d'un matériau de comblement n'entraîne pas une désorientation de la phase minérale régénérée, qui est naturellement formée suivant le grand axe de l'os.

V.4. Évaluation du comportement mécanique

V.4.1. Champs de déformation dans les cristaux d'HA

L'analyse de la distribution des champs de déformation par WAXS dans l'os en cours de régénération constitue une des principales originalités de cette étude. À notre connaissance, les propriétés mécaniques à l'échelle des cristaux de l'os régénéré ne sont pas abordées dans la littérature.

Dès 8 semaines de régénération, la distribution du champ de déformations semble relativement homogène entre les parties naturelle et régénérée, et ce, pour les trois implants étudiés (tableau V.1). Cela traduit donc un module élastique E des cristaux régénérés proche de celui des cristaux présents initialement dans l'os natif environnant. Cependant, ces résultats sont à nuancer en raison du nombre limité de points de mesure exploitables dans la partie régénérée pour les deux implants à base de BCP. Cette homogénéisation des champs de déformations des cristaux se produit de manière concomitante au remodelage du greffon ou à la production d'une nouvelle matrice autour des grains de BCP. Cette homogénéisation pourrait s'expliquer par l'alignement des cristaux dans l'os néoformé avec ceux de l'os naturel dans le cas de l'implantation par un greffon osseux. Il est à rappeler que dans les deux autres stratégies de régénération (implantation par du BCP seul et par du BCP + TBM), les grains de BCP n'étaient que peu résorbés à la fin de l'expérience. Néanmoins, les cristaux régénérés avaient une orientation identique à celle de l'os natif dès leur formation. Ceci montre la forte corrélation entre l'orientation des cristaux et les propriétés mécaniques de l'os régénéré à l'échelle nanométrique.

Déformation moyenne (μdef)	BCP seul		BCP + TBM		BG	
	Tissu osseux régénéré	Tissu osseux naturel	Tissu osseux régénéré	Tissu osseux naturel	Tissu osseux régénéré	Tissu osseux naturel
8 semaines	630 ± 175	703 ± 90	325 ± 218	332 ± 110	733 ± 53	586 ± 33
20 semaines	253 ± 120	419 ± 142	486 ± 211	520 ± 254	385 ± 70	440 ± 41

Tableau V.1 : Déformations longitudinales moyennes pour les groupes de cristaux d'HA correspondant à la famille de plans {002} dans le tissu osseux régénéré et dans la zone autour du défaut comblé par un greffon osseux, du BCP seul ou mélangé avec de la moelle osseuse, à 8 et 20 semaines de régénération et pour une charge de 30 N.

À l'exception de l'échantillon comblé par un mélange BCP + TBM, pour une charge donnée, la déformation des cristaux à 20 semaines de régénération (correspondant à un âge des rats de 28 semaines) est plus faible que celle observée à 8 semaines (âge de 16 semaines), sur toute la zone d'étude (tissus régénéré et naturel). Ceci est en accord avec les mesures réalisées sur des rats non opérés qui montrent que le matériau est plus rigide avec le temps par un effet d'âge traduisant une minéralisation du tissu, se manifestant par une augmentation de l'épaisseur des cristaux et un alignement de la phase minérale au cours de temps. On peut observer, parmi les 3 stratégies étudiées, que le BG permet d'obtenir des champs de déformations homogènes dans le défaut avec des valeurs proches de celles de la partie naturelle dès 20 semaines avec des écarts-types associés très faibles du fait du remodelage de la greffe osseuse à ce stade. *A contrario*, pour les deux autres cas, la présence encore significative du BCP induit une hétérogénéité mécanique prononcée à l'échelle des cristaux dans l'implant pour le même temps de régénération. Il est à noter ici que, de manière générale, les déformations dans les parties naturelles pour les différents implants à un âge donné sont du même ordre de grandeur.

V.4.2. Quantification des propriétés mécaniques de l'os par nanoindentation

Les mesures de nanoindentation dans les parties adjacentes au défaut régénéré ont mis en évidence l'effet d'âge sur le comportement mécanique de l'os à l'échelle des ostéons, indépendamment de la stratégie de régénération considérée et de manière similaire au contrôle négatif. De manière analogue aux résultats obtenus par WAXS, un comportement plus rigide, traduit par l'augmentation des valeurs de module d'indentation E_r avec l'âge, a été observé dans les quatre situations étudiées (tableau V.2).

	Contrôle négatif	BCP seul	BCP + TBM	BG
16 semaines	16,7 ± 1,7	17,9 ± 2,5	19 ± 2,7	17,9 ± 2,5
28 semaines	23,1 ± 2,7	22 ± 6	23,9 ± 3,8	22,2 ± 2,8

Tableau V.2 : Module élastique E_r (GPa) dans l'os naturel dans le cas des défauts laissés vides (contrôle négatif) et comblés par un greffon osseux (BG), du BCP seul ou mélangé à de la moelle osseuse (BCP + TBM) à un âge de sacrifice de 16 et 28 semaines (correspondant à 8 et 20 semaines de régénération), mesuré par nanoindentation instrumentée. Les résultats sont exprimés en GPa en moyenne ± 1 écart type (n = 15).

Ces observations peuvent être expliquées par la minéralisation des ostéons au cours du temps, ayant pour effet de maximiser la résistance de l'os [Bensamoun et al. 2008]. Cette explication est valable aussi pour l'évolution des propriétés mécaniques observées dans le tissu régénéré entre 8 et 20 semaines chez les contrôles négatifs tout comme dans les défauts ayant reçu du BCP (pour le BCP, de 3,7 ± 0,3 GPa à 5,1 ± 0,3 GPa pour le module d'indentation E_r , et de 0,16 ± 0,02 GPa à 0,23 ± 0,02 GPa pour la dureté H_b).

Vingt semaines après implantation, l'os régénéré dans les défauts ne possède, à cette échelle, toujours pas de propriétés mécaniques similaires à l'os natif quelle que soit la nature de l'implant (BG, BCP ou BCP + TBM). Cependant, les champs de déformation présentés

précédemment montrent une homogénéisation des propriétés mécaniques à l'échelle des cristaux entre l'os régénéré et l'os natif. Il est possible d'affirmer ici que la récupération des propriétés mécaniques à l'échelle nanométrique (échelle des cristaux) couplée à une récupération des caractéristiques microstructurales (épaisseur et facteur H) ne coïncide pas nécessairement avec une récupération mécanique à l'échelle microscopique (échelle des ostéons et des lamelles). En effet, à cette échelle, la contribution de la phase organique, et notamment l'organisation en lamelles, influence fortement le comportement mécanique de l'os régénéré.

V.5. Description du processus de régénération au cours du temps suivant le type d'implant : confrontation des résultats des différentes techniques d'analyses

Les différents points précédents ont permis de comparer, dans un premier temps, les résultats obtenus pour les différentes stratégies de régénération de notre étude suivant les différents types de mesures effectuées. Des outils d'analyses microscopiques (microtomographie X) et histologiques ont été associés à des techniques de mesures par diffusion des rayons X et d'indentation reliant diverses échelles d'analyse afin de décrire le processus de régénération au cours du temps, dans le cadre d'ingénierie tissulaire basée sur l'implantation d'un substitut osseux isolé (greffe osseuse), d'un biomatériau (BCP) seul ou associé à une moelle osseuse (BCP + TBM). La confrontation entre ces différents résultats permet alors d'apporter des éléments de réponse sur le processus de régénération au cours du temps. De manière générale, les analyses montrent que, durant sa période de réparation, indépendamment de la stratégie d'implantation considérée, le tissu osseux subit plusieurs changements avant de récupérer sa fonction mécanique et sa structure originelle.

- Quelle que soit la nature du matériau de comblement (biologique ou synthétique), l'intégration de l'implant se produit selon les mêmes processus tant qu'il n'y a pas de réaction de rejet par le corps et que la biocompatibilité est assurée. Un tissu inflammatoire est d'abord généré aux temps courts (entre 2 et 4 semaines). Ce tissu de nature fibreuse vient créer une continuité dans le défaut entre l'os natif et les particules de l'implant (les fragments osseux ou les grains de BCP). Néanmoins, ce tissu mou n'est alors pas suffisant pour assurer le transfert de charge entre l'os natif et le défaut comblé. Ceci se traduit par une discontinuité mécanique dans les échantillons montrant des déformations plus faibles dans les cristaux d'HA régénérés (figure III.12). Ces effets ont été particulièrement observés sur les échantillons des rats ayant reçu une greffe osseuse à des temps courts de régénération. La quantification des déformations des cristaux d'HA dans et autour du défaut comblé par des grains de BCP ou par le mélange BCP + TBM, à des temps courts de régénération (entre 2 et 6 semaines), a mis en lumière, qu'à ces temps de régénération, il y a peu ou pas de repousses significatives dans le défaut (défaut rempli majoritairement par le matériau synthétique).
- La phase inflammatoire s'estompe avec le temps et des processus de formation et de résorption se mettent en place dans les différentes zones du défaut implanté (figures III.4 et IV.2 : coloration Movat (tissu ostéoïde) ; coloration TRAP (marquage des ostéoclastes)). Il a été montré que la résorption reste incomplète quel que soit le type d'implant. Leur remplacement par un os néoformé n'a été observé que sur les rats ayant reçu une greffe

V.5. Description du processus de régénération au cours du temps suivant le type d'implant :
confrontation des résultats des différentes techniques d'analyses

osseuse et pour des temps longs (20 semaines de régénération). Seuls les défauts ayant reçu les implants de BCP mélangés à la moelle osseuse montrent des zones de marquage TRAP très étendues sur les granules de BCP bien que cette activité ostéoclastique ait été insuffisante pour conduire à une résorption importante de ceux-ci et à leur remplacement par de l'os néoformé. Ceci peut être lié à la taille des particules de BCP qui jouent un rôle prépondérant dans la densité des surfaces accessibles aux ostéoclastes et à leurs précurseurs, par rapport aux fragments spongieux (greffon osseux) qui sont de taille plus faible et de porosité plus élevée. L'accessibilité réduite des ostéoclastes induit donc une réduction de la vitesse de résorption du matériau synthétique qui peut ne pas être liée à une résorbabilité réduite du BCP. Des zones d'os néoformés sont néanmoins visibles entre les grains de BCP indiquant qu'une apposition de matrice a eu lieu. Quelques zones de remodelage sont également visibles localement dès 6 semaines de régénération.

- Pour des temps plus courts (entre 2 et 6 semaines), la résorption incomplète de l'implant dans le cas de la greffe osseuse explique les orientations aléatoires des cristaux dans le défaut, résultant de la réparation aléatoire des fragments osseux non résorbés du greffon (figure III.11). De même, la présence des fragments osseux à ces temps de régénération explique la faible épaisseur des cristaux d'HA déterminée dans le défaut (figure III.8). En effet, l'implant de l'allogreffe utilisée provient de l'os spongieux de la métaphyse fémorale, prélevé sur un rat âgé de 8 semaines (âge de départ des rats implantés). Il est à rappeler ici que les cristaux HA de l'os spongieux sont connus pour être plus minces, étant donné le taux de remodelage plus élevé de l'os spongieux comparé à l'os cortical. Une fois que les fragments osseux ont été majoritairement résorbés et remplacés par de l'os néoformé, une homogénéisation complète de l'orientation des cristaux entre l'os régénéré et l'os natif est observée à 8 semaines de régénération. En outre, une évolution marquante de l'épaisseur des cristaux dans l'os régénéré a été observée à 8 semaines (qui résulte de la résorption de l'implant) avant qu'elle n'atteigne la valeur mesurée dans l'os natif plus tard (20 semaines) par un effet d'âge. Finalement, les cristaux d'HA régénérés aux berges du défaut, sur les surfaces des grains de BCP ou autour des fragments osseux, sont parfaitement alignés avec les cristaux initialement présents dans l'os natif, dès leur formation (figures IV.7 et IV.8). Néanmoins, leur épaisseur est en évolution continue avec l'âge (figure IV.6). Ceci est en accord avec les résultats des études de Rossi *et al.* [Rossi et al. 2012] montrant que l'ultrastructure de l'os régénéré entourant deux types de biomatériaux (composite hydroxyapatite-alginate et hydroxyapatite frittée) est caractérisée par un os lamellaire dont les cristaux sont orientés suivant le grand axe de l'os (parallèlement aux cristaux présents dans l'os natif) et présentent une épaisseur identique à celle rencontrée dans l'os natif. Les auteurs ont réalisé des mesures à un temps particulier de régénération (13 semaines). Il est donc impossible de comparer l'évolution au cours du temps. D'autre part, il est important de noter ici que le modèle animal ou osseux (os long, plat...) ainsi que la composition des implants (présence ou non de cellule et/ou de facteurs ostéoinducteurs, taille des particules implantées, porosité...) peuvent fortement faire varier les résultats entre les différentes études. Notre résultat ne peut être donc généralisé puisque d'autres études montrent que des cristaux régénérés n'ayant initialement pas d'orientation préférentielle subissent une réorientation au cours du temps. Dans l'étude d'Ishimoto *et al.* [Ishimoto et al. 2013], l'indice d'organisation des cristaux

régénérés dans un défaut fémoral, comblé par un mélange de protéine morphogénétique osseuse et d'hydrogel de gélatine biodégradable, évolue au cours du temps pour atteindre l'indice mesuré dans l'os natif à 12 semaines de régénération. Ceci a d'ailleurs aussi été montré par Nakano *et al.* [Nakano et al. 2012] dans une étude où une évolution au cours du temps est observée et une adéquation parfaite entre l'os régénéré et l'os naturel se produit pour une durée de 6 semaines pour un défaut dans un cubitus de lapin comblé avec un hydrogel de gélatine délivrant un facteur de croissance, le BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor).

- La récupération de la fonction mécanique de l'os régénéré et les modifications marquantes dans sa structure interne (évolution dans l'épaisseur des cristaux et organisation de la matrice minérale) sont initiées à un temps spécifique de régénération où le phénomène de remodelage est mis en place. En effet, des zones de remodelage ont été systématiquement observées à partir de 8 semaines de régénération sur nos coupes pour les 3 types d'implants. Ceci n'exclut cependant pas que le remodelage ait pu localement débiter plus tôt. Ceci a mis en évidence l'influence des mécanismes de régénération sur les modifications des propriétés mécaniques et microstructurales de l'os régénéré à l'échelle nanométrique. À cette échelle d'étude, la nature du matériau de comblement influence la vitesse de repousse osseuse et la quantité de l'os néoformé dépend, par ailleurs, de la disponibilité des zones d'apposition entre les grains de matériau, des facteurs ostéoinducteurs et des cellules ostéogéniques présentes sur le site. Néanmoins, les caractéristiques mécaniques des cristaux néoformés ne semblent pas être affectées par le matériau de comblement. Il est à noter que ceci est vrai pour des temps de régénération longs où une repousse osseuse suffisante a déjà été produite afin d'assurer la continuité du tissu. En effet, à ce temps particulier (à partir de 8 semaines de régénération), une homogénéisation des champs de déformations des cristaux d'HA entre l'os régénéré et l'os natif est observée, non seulement dans les défauts comblés par un greffon osseux, mais aussi dans les défauts ayant reçu des implants à base de BCP (seul ou mélangé à la moelle osseuse).

- À l'échelle nanométrique, la distribution spatiale (orientation et taille) des cristaux a un rôle déterminant dans l'amélioration des propriétés mécaniques de l'os. Toutefois, ceci constitue une condition nécessaire, mais pas suffisante à la récupération de la fonction mécanique à l'échelle microscopique (échelle des lamelles). En effet, nos résultats de nanoindentation ne montrent pas d'amélioration du comportement mécanique de l'os régénéré après 20 semaines. Les propriétés mécaniques mesurées dans l'os régénéré pour les 3 types d'implants sont largement inférieures à celles mesurées dans l'os natif une fois l'orientation et la taille des cristaux HA rétablis. Cette observation est en accord avec d'autres études montrant que l'orientation et la récupération morphologique des cristaux HA ainsi que la récupération de la densité minérale n'induisent pas systématiquement le rétablissement de la fonction mécanique. Ishimoto *et al.*, [Ishimoto et al. 2013] se sont intéressés à corréliser la densité minérale, l'orientation des cristaux et le module d'indentation. Après 24 semaines de régénération d'un implant constitué d'un hydrogel de gélatine biodégradable contenant de la BMP dans des défauts dans l'ulna du lapin, le module d'indentation dans les parties régénérées se révèle beaucoup plus faible que celui de l'os natif malgré un comblement parfait du défaut. Les auteurs ont constaté une évolution importante du module élastique de

V.5. Description du processus de régénération au cours du temps suivant le type d'implant :
confrontation des résultats des différentes techniques d'analyses

l'os régénéré entre 6 et 12 semaines, suivie d'une variation beaucoup plus faible entre 12 et 24 semaines. Ils attribuent la première phase à la récupération de la densité minérale et de l'orientation des cristaux, mais ils n'expliquent pas le retard de la récupération mécanique. Les mêmes effets ont été décrits par Manjubala *et al.*, [Manjubala et al. 2009] lors d'une régénération spontanée d'un défaut tibial où le recouvrement d'une orientation préférentielle des cristaux et d'une densité minérale n'a pas induit la récupération de la fonction mécanique à l'échelle des ostéons. Les propriétés mécaniques de l'os à cette échelle sont donc conditionnées non seulement par la récupération de la phase minérale, mais aussi par l'architecture de la matrice régénérée traduisant l'empilement des lamelles, leur nombre et leurs orientations.

- L'influence des matériaux de comblement est plus marquée à l'échelle supérieure (échelle des lamelles). En effet, les mesures de nanoindentation ont mis en évidence des différences de caractéristiques mécaniques liées à la stratégie adoptée. Ceci met en lumière la pertinence d'une approche expérimentale multiéchelle pour aborder cette problématique. En effet, la structure osseuse développée en présence de grains de BCP est plus rigide que celle régénérée grâce à une greffe osseuse ou lors d'une régénération spontanée en l'absence d'un matériau de comblement (Chapitres III et IV). Ceci est expliqué par un remodelage plus rapide lié au volume limité d'os néoformé dans le cas de l'implantation d'un matériau synthétique comparativement au volume plus important formé grâce à la greffe osseuse. En effet, le tissu régénéré autour des grains de BCP est rapidement remplacé par un tissu organisé (lamellaire) grâce à un phénomène de résorption intense du tissu régénéré alors que les grains de BCP sont, *a contrario*, caractérisés par une résorption plus lente. En présence du greffon osseux, la résorption de l'implant et la résorption du tissu régénéré (remodelage) peuvent se produire, cette fois-ci, de manière simultanée et avec des vitesses comparables. L'activité cellulaire, dans ce cas, est alors répartie sur des surfaces plus importantes de l'implant. En effet, la repousse osseuse étant plus importante, elle nécessite un temps plus long pour assurer le remodelage de l'ensemble de l'os régénéré et la minéralisation de la structure néoformée. Le nombre des zones d'activation du remodelage dépend aussi, des progéniteurs disponibles et des facteurs d'induction provenant des fragments osseux et de la moelle osseuse qui composent les différents implants. Tous ces facteurs induisent des taux de remodelage variables dans les différentes zones du défaut, dépendant de la nature de l'implant utilisé. Ces effets peuvent induire une minéralisation plus faible donc une résistance mécanique également plus faible dans le cas de l'os régénéré par greffon osseux par rapport à l'os régénéré à partir d'un matériau synthétique à temps de régénération identique (20 semaines). Il est à noter ici que l'ajout de la moelle osseuse favorise la formation d'un tissu lamellaire qui induit une amélioration rapide des propriétés mécaniques du tissu néoformé. Cependant, les propriétés élastiques de l'os régénéré, à cette échelle d'étude, sont largement inférieures à celles de l'os natif. Ceci est certainement lié au remodelage qui a pour effet d'organiser la structure en lamelles. En effet, le remodelage induit une structure lamellaire, en passant par des processus de résorption et d'apposition d'une nouvelle matrice osseuse. Ceci implique une minéralisation faible du nouveau tissu. Il est alors possible que le comportement de l'os soit amélioré après ces phénomènes biologiques qui ont débuté par la

V. Discussion

mise en place de l'os lamellaire qui sera minéralisé ultérieurement couplée à une évolution de l'organisation des lamelles au cours du temps.

Conclusions générales et perspectives

Cette étude a proposé une nouvelle méthodologie basée sur l'analyse complémentaire et multiéchelle de paramètres biologiques, microstructuraux et des champs de déformations par rayonnement synchrotron qui constitue un nouvel outil d'évaluation structurelle et fonctionnelle dans le contexte de l'étude de l'os régénéré. En effet, l'amélioration continue des implants utilisés dans la régénération osseuse et le développement de stratégies innovantes nécessitent une caractérisation fiable de la qualité de l'os reconstruit et la détermination des différents facteurs influençant le processus de réparation. Le tissu régénéré subit des changements structuraux tout au long du processus de régénération qui influencent ses propriétés mécaniques. Notre méthodologie, basée sur une combinaison de techniques d'analyse multiéchelle et multidisciplinaire a permis de mieux comprendre l'intégration entre les phénomènes biologiques impliqués dans l'intégration des greffons et la genèse du nouveau tissu, le changement de la structure régénérée et l'évolution des caractéristiques mécaniques au cours du temps ainsi que le rôle du matériau de comblement dans le processus de régénération. L'analyse de la réponse mécanique de la phase minérale à des chargements de traction (*in situ*) par diffusion des rayons X aux grands (WAXS) et petits angles (SAXS) a été corrélée aux distributions spatiale, morphologique et cristallographique des cristaux minéralisés et aux processus biologiques, associés à la cinétique de régénération lors du processus de réparation par implantation.

Ce travail a permis d'apporter des éléments de réponses sur l'influence des techniques d'ingénierie osseuse et la nature de l'implant sur le comportement mécanique global de l'os à travers l'analyse de trois types d'implant : 1) une greffe osseuse; 2) des grains de phosphate de calcium biphasé (BCP) et 3) un mélange de BCP avec de la moelle osseuse.

Un certain nombre de résultats ont permis de mettre en lumière des perspectives intéressantes :

L'ajout de la moelle osseuse confère aux matériaux synthétiques un caractère ostéoinducteur et apporte des cellules à potentiel ostéogénique induisant une meilleure repousse osseuse similaire à la néoformation par greffe osseuse. L'influence de l'ajout de la moelle osseuse au BCP sur la régénération est illustrée par la masse osseuse néoformée mesurée dans les défauts comparée à celle dans des défauts comblés par des grains de BCP seuls. Cependant, cette formation reste relativement faible par rapport à celle obtenue par greffe osseuse. Ceci est lié en partie au faible espace de repousse disponible du fait du volume important de matériau d'implant non résorbé. En effet, la forme des granules de BCP peut influencer l'adhérence des cellules et la texture de surface du matériau synthétique peut moduler l'activité cellulaire. L'influence de la granulométrie, de la forme ainsi que de la texture de surface des grains de BCP sur la repousse osseuse doivent être analysées plus en détail afin de mettre en lumière l'effet de la morphologie de l'implant sur la régénération osseuse et sur l'intensité de l'activité cellulaire (résorption et formation).

Les cristaux d'HA nouvellement déposés sur l'ostéoïde synthétisé, autour des fragments osseux et des particules de BCP, sont orientés suivant le grand axe de l'os dès leur formation, montrant que les biomatériaux et la greffe osseuse facilitent la production de cristaux bien orientés. Cette étude a montré l'intérêt d'analyser l'évolution de l'orientation des cristaux dans le cas d'une repousse spontanée (i.e. contrôle négatif) afin de bien appréhender

l'influence du matériau de comblement sur l'organisation de l'os néoformé. Extrapoler l'étude sur les os longs pourrait être intéressant. En effet, ceux-ci sont mécaniquement beaucoup plus sollicités et présentent une structure plus fortement organisée comparée à celle de l'os crânien. De plus, les os longs permettront des essais mécaniques *in situ* plus faciles à mettre en place, plus fiables du fait de la géométrie inhérente à ces os avec des niveaux de charges appliquées plus élevés.

Le début du remodelage représente un moment particulier au cours de la régénération qui induit des changements marquants dans la structure et le comportement mécanique de l'os régénéré aux échelles nano- et microscopique. En effet, le remodelage de l'os néoformé a pour effet la résorption de l'implant et son remplacement par une structure bien organisée, l'évolution notable de l'épaisseur des cristaux et une homogénéisation dans les champs de déformations entre les cristaux d'HA régénérés et natifs pour les implants utilisés dans notre étude. L'homogénéisation des champs de déformations, mesurés lors d'essais mécaniques *in situ* par WAXS, traduit une récupération du comportement mécanique de l'os régénéré à l'échelle des cristaux (avec un module élastique E proche du module de l'os natif). Cependant, notre étude a montré clairement que la récupération de l'épaisseur des cristaux d'HA, de leur répartition géographique, de leur orientation spatiale et de la fonction mécanique de l'os régénéré à l'échelle nanométrique n'induit pas nécessairement un comportement mécanique rétabli à l'échelle microscopique (échelle des ostéons et des lamelles). En effet, les propriétés mesurées en nanoindentation dans la partie régénérée restent toujours très inférieures à celles de la partie naturelle. Ceci est lié à la structure des lamelles, leur organisation et leur densité au sein du tissu régénéré. Dans des travaux futurs, il sera important d'étudier plus en détail l'évolution de ces paramètres et d'analyser leur influence sur la réponse mécanique de l'os régénéré sur une durée plus longue que 20 semaines.

L'os régénéré autour des grains de BCP présente une structure lamellaire, montrant que ce matériau synthétique facilite la mise en place d'un remodelage rapide pour produire un tissu osseux structuré. Ceci est cependant très dépendant de la zone d'analyse. Il serait nécessaire dans les études futures de réaliser les analyses sur l'ensemble du défaut et non sur des zones restreintes dont les résultats sont fortement affectés par le caractère hétérogène de la répartition des particules des différents implants couplé à une repousse osseuse non symétrique dans le défaut. En effet, nous avons montré que les analyses en diffusion des rayons X et en nanoindentation devraient être réalisées sur l'intégralité du défaut. De plus, il est également nécessaire de tenir compte de la variabilité inter-individus et analyser plusieurs rats.

Finalement, notre étude a permis de mettre en perspective les différents aspects étudiés, tant du point de vue microstructural que mécanique, avec les processus biologiques associés et les cinétiques relatives, et enfin de confronter la pertinence de ces conclusions au regard de la littérature. Ainsi, notre méthodologie a pu fournir une série d'informations sur la structure régénérée à différentes échelles d'étude et valider la faisabilité de la démarche adoptée à cet effet (analyse du comportement mécanique de l'os au cours de sa régénération). Cette validation nous permet d'envisager d'étendre cette méthodologie d'analyse à d'autres problématiques telles que l'évaluation du succès clinique des traitements de maladies

osseuses telles que l'ostéoporose, au travers d'une démarche multidisciplinaire englobant simultanément les phénomènes biologiques, microstructuraux et mécaniques, fortement couplés. De plus, cette première approche a permis d'étudier des caractéristiques biologiques microstructurales et mécaniques à différentes échelles qui pourraient alimenter un modèle numérique à transition d'échelles. Dans un premier temps, une modélisation mécanique tenant compte des caractéristiques microstructurales principales aux échelles dominantes de l'os peut être mise en place en utilisant la méthode des éléments finis et différentes méthodes micromécaniques (approche autocohérente, Mori-Tanaka, méthode des stratifiés....) et dont les constituants élémentaires de l'os (minéral, collagène, eau, cross-links,...) constitueront le premier niveau (nanoscopique). Dans un deuxième temps, une approche du remodelage osseux considérant les effets des sollicitations mécaniques et des facteurs biologiques tels que les activités cellulaires devra être élaborée pour déterminer les variables internes et lois d'évolution pertinentes.

Références bibliographiques

- AKHTAR, R., DAYMOND, M.R., ALMER, J.D. AND MUMMERY, P.M. 2008. Elastic strains in antler trabecular bone determined by synchrotron X-ray diffraction. *Acta Biomaterialia* 4, 6, 1677–1687.
- AL-AQL, Z.S., ALAGL, A.S., GRAVES, D.T., GERSTENFELD, L.C. AND EINHORN, T.A. 2008. NIH Public Access. *Journal of Dental Research* 87, 2, 107–118.
- ALBREKTSSON, T. AND JOHANSSON, C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* 10, S96–S101.
- ALMER, J.D. AND STOCK, S.R. 2005. Internal strains and stresses measured in cortical bone via high-energy X-ray diffraction. *Journal of Structural Biology* 152, 1, 14–27.
- ALMER, J.D. AND STOCK, S.R. 2007. Micromechanical response of mineral and collagen phases in bone. *Journal of Structural Biology* 157, 2, 365–370.
- ANTOUN, H., KAROUNI, M. AND SOJOD, B. 2013. La régénération osseuse guidée : résultats, limites et perspectives. *Actualités Odonto-Stomatologiques* 261, 11–21.
- ASCENZI, A., BASCHIERI, P. AND BENVENUTI, A. 1990. The bending properties of single osteons. *Journal of Biomechanics* 23, 8, 763–771.
- ASCENZI, A. AND BONUCCI, E. 1964. The tensile properties of single osteons. *The Anatomical Record* 158, 4, 375–386.
- ASCENZI, A. AND BONUCCI, E. 1976. Mechanical similarities between alternate osteons and cross-ply laminates. *Journal of Biomechanics* 9, 2.
- ASCENZI, A., BONUCCI, E. AND SIMKIN, A. 1973. An approach to the mechanical properties of single osteonic lamellae. *Journal of Biomechanics* 6, 3, 227–235.
- ASHMAN, R.B. AND RHO, J.Y. 1988. Elastic modulus of trabecular bone material. *Journal of Biomechanics* 21, 3, 177–181.
- ASHMAN, R.B., RHO, J.Y. AND TURNER, C.H. 1989. Anatomical variation of orthotropic elastic moduli of the proximal human tibia. *Journal of Biomechanics* 22, 8–9, 895–900.
- BALA, Y., DEPALLE, B., DOUILLARD, T. ET AL. 2011. Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: An instrumented indentation study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 7, 1473–1482.
- BARBER, A.H., KERSCHNITZKI, M., KRAUSS, S. ET AL. 2013. Intrafibrillar plasticity through mineral/collagen sliding is the dominant mechanism for the extreme toughness of antler bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 28, March, 366–382.
- BARBER, T., BROCKWAY, J. AND MOFFATT, C. 1969. static compression testing of specimens from an embalmed human skull. *Texas reports on biology and medicine* 28, 497–508.
- BAYRAKTAR, H.H., MORGAN, E.F., NIEBUR, G.L., MORRIS, G.E., WONG, E.K. AND KEAVENY, T.M. 2004. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *Journal of Biomechanics* 37, 1, 27–35.

Références bibliographiques

- BENSAMOUN, S., FAN, Z., BRICE, I., RHO, J.Y. AND HO BA THO, M.-C. 2008. Assessment of Mechanical Properties of Human Osteon Lamellae Exhibiting Various Degrees of Mineralization By Nanoindentation. *Journal of Musculoskeletal Research* 11, 03, 135–143.
- BLÉRY, P., CORRE, P., MALARD, O. ET AL. 2014. Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25, 12, 2711–2720.
- BONNEL, F. AND TACHOT, B. 1989. Biologie de la cicatrisation des fractures. *Le tissu osseux.*, 171–179.
- BOSKEY, A. 2006a. « CHAPTER 12 - Mineralization, Structure and Function of Bone A2 - SEIBEL, MARKUS J. » In *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition)*, édité par SIMON P. ROBINS et JOHN P. BILEZIKIAN, 201 - 12. Burlington: Academic Press. .
- BOSKEY, A. AND PLESHKO CAMACHO, N. 2007. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* 28, 15, 2465–2478.
- BOSKEY, A.L. 2006b. Assessment of bone mineral and matrix using backscatter electron imaging and FTIR imaging. *Current Osteoporosis Reports* 4, 2, 71–75.
- BOSKEY, A.L. 2015. Bone composition: relationship to bone fragility and anti-osteoporotic drug effects. *BoneKEy Reports* 4, December, 1–11.
- LE BOURHIS, E. 2014. Instrumented Nanoindentation Applied to Thin Films. In: *Mechanics and Technology, Second Edition*. 305–322.
- LE BOURHIS, E. AND PATRIARCHE, G. 2003. Effects of annealing on structure of GaAs(001) nanoindentations. *Philosophical Magazine Letters* 83, 3, 149–158.
- BOYDE, A., HENDEL, P., HENDEL, R. AND MACONNACHIE, EJONES, S.J. 1990. Human cranial bone structure and the healing of cranial bone grafts: a study using backscattered electron imaging and confocal microscopy. *Anatomy and Embryology* 181, 3, 235–251.
- BOYER, A. 2014. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées. .
- BÜNGER, M.H., OXLUND, H., HANSEN, T.K. ET AL. 2010. Strontium and bone nanostructure in normal and ovariectomized rats investigated by scanning small-angle X-ray scattering. *Calcified Tissue International* 86, 4, 294–306.
- BUSER, D., DULA, K., HIRT, H.P. AND SCHENK, R.K. 1996. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 54, 4, 420–433.
- CARTER, D.R., SMITH, D.J., SPENGLER, D.M., DALY, C.H. AND FRANKEL, V.H. 1980. Measurement and analysis of invivo bone strains on the canine radius and ulna. *Journal of Biomechanics* 13, 1, 27–38.
- CHOI, K., KUHN, J.L., CIARELLI, M.J. AND GOLDSTEIN, S.A. 1990. The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *Journal of Biomechanics* 23, 11, 1103–1113.

- COATS, B. AND MARGULIES, S.S. 2006. Material Properties of Human Infant Skull and Suture at High Rates. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* 23, 8, 1222–1232.
- COLAT-PARROS, J. AND JORDANA, F. 2009. Les substituts osseux. *Université Médicale Virtuelle Francophone* 6, 2, 120–127.
- COLLIGNON, A.M., LESIEUR, J., VACHER, C., CHAUSSAIN, C. AND ROCHEFORT, G.Y. 2017. Strategies developed to induce, direct, and potentiate bone healing. *Frontiers in Physiology* 8, NOV, 1–8.
- CORRE, P., MERCERON, C., LONGIS, J. ET AL. 2015. Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects - A preclinical study. *Acta Biomaterialia* 26, 306–317.
- CORRE, P., REMY, S., MERCERON, C. ET AL. 2013. Determining a Clinically Relevant Strategy for Bone Tissue Engineering: An “All-in-One” Study in Nude Mice. *PLoS ONE* 8, 12, e81599.
- DACULSI, G., BOULER, J.-M. AND LEGEROS, R.Z. 2008. Adaptive Crystal Formation in Normal and Pathological Calcifications in Synthetic Calcium Phosphate and Related Biomaterials. 129–191.
- DELILLE, R. 2008. Contribution à la compréhension du comportement mécanique de l'os du crâne humain sous différents moyens de conservation et de sollicitation. .
- DESOUTTER, J., MENTAVERRI, R., BRAZIER, M. AND KAMEL, S. 2012. Le remodelage osseux normal et pathologique. *RFL Revue francophone des laboratoires* 2012, 446, 33–42.
- DEVELIOGLU, H., UNVER SARAYDIN, S. AND KARTAL, U. 2009. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental Materials Journal* 28, 4, 396–400.
- DIMITRIOU, R., P.V., G., JONES, E. AND MCGONAGLE, D. 2011. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9.
- DONG, N. AND GUO, E. 2004. The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. *Journal of Biomechanics* 37, 8, 1281–1287.
- DONG, X., ALMER, J.D. AND WANG, X. 2011. Post-yield nanomechanics of human cortical bone in compression using synchrotron X-ray scattering techniques. *Journal of Biomechanics* 44, 4, 676–682.
- DONG, Y. DA AND BOYD, B.J. 2011. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *International Journal of Pharmaceutics* 417, 1–2, 101–111.
- DONNAY, M., PONÇOT, M., TINNES, J.P., SCHENK, T., FERRY, O. AND ROYAUD, I. 2017. In situ study of the tensile deformation micro-mechanisms of semi-crystalline poly(ethylene terephthalate) films using synchrotron radiation X-ray scattering. *Polymer* 117, 268–281.
- ESPITALIER, F., DACULSI, G., LEROUXEL, E. ET AL. 2009. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials* 30, 5, 763–769.
- FRATZI, P. AND HOSPITAL, H. 1996. Characterization of Bone Mineral Crystals in Horse Radius by Small-Angle X-Ray Scattering. 341–346.
- FRATZL, P. 1994. Statistical model of the habit and arrangement of mineral crystals in the

Références bibliographiques

- collagen of bone. *Journal of Statistical Physics* 77, 1–2, 125–143.
- FRATZL, P., FRATZL-ZELMAN, N., KLAUSHOFER, K., VOGL, G. AND KOLLER, K. 1991a. Nucleation and Growth of Mineral Crystals in Bone Studied by Small-Angle S (q). 407–413.
- FRATZL, P., VOGL, G. AND KLAUMUENZER, S. 1991b. Small-angle scattering from porous amorphous substances. *Journal of Applied Crystallography* 24, pt 5, 588–592.
- FRAYSSINET, P., FAGES, J., BONEO, G. AND ROUQUET, N. 1998. Biotechnology , material sciences and bone repair. *European Journal of orthopaedic Surgery and Traumatology*, 17–25.
- FUJISAKI, K., TODOH, M., NIIDA, A., SHIBUYA, R., KITAMI, S. AND TADANO, S. 2012. Orientation and deformation of mineral crystals in tooth surfaces. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*.
- GIBERT-JOVE, R. 1995. Caractérisation du tissu osseux par spectrométrie d'absorption infrarouge. Phd thesis, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. .
- GIRI, B., ALMER, J.D., DONG, X.N. AND WANG, X. 2012. In situ mechanical behavior of mineral crystals in human cortical bone under compressive load using synchrotron X-ray scattering techniques. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 14, 101–112.
- GIUDICELLI, J. AND SOUBERBIELLE, J.C. 1998. Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose. *Revue de l'ACOMEN* 4, 251–272.
- GOLDSTEIN, S.A. 1987. The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function. *Journal of Biomechanics* 20, 1055–1061.
- GUPTA, H., WAGERMAIER, W., ZICKLER, G. ET AL. 2005. Nanoscale Deformation Mechanisms in Bone. *Nano letters* 5, 10, 2108–2111.
- GUPTA, H.S., SETO, J., WAGERMAIER, W., ZASLANSKY, P., BOESECKE, P. AND FRATZL, P. 2006. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 47, 17741–17746.
- HAFIZ UDDEN, M., MATSUMOTO, T., OKAZAKI, M., NAKAHAIRA, A. AND SOHMURA, T. 2010. Biomimetic fabrication of apatite related biomaterials. *Intech open* 2, 64.
- HE, B.B. 2018. *Two-dimensional X-ray Diffraction, second Edition*.
- HE, F., CHIOU, A.E., CHAE, H. ET AL. 2017. Multiscale characterization of the mineral phase at skeletal sites of breast cancer metastasis. 114, 40.
- HERMANS, P.H. AND WEIDINGER, A. 1948. Quantitative x-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis. *Journal of Applied Physics* 19, 5, 491–506.
- HILLIER, M.L. AND BELL, L.S. 2007. Differentiating Human Bone from Animal Bone : A Review of Histological Methods. *Journal of forensic science* 52, 2.
- HOERTH, R.M., SEIDT, B.M., SHAH, M. ET AL. 2014. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomaterialia* 10, 9, 4009–4019.
- ISHIMOTO, T., NAKANO, T., UMAKOSHI, Y., YAMAMOTO, M. AND TABATA, Y. 2013. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function

- in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *Journal of Bone and Mineral Research* 28, 5, 1170–1179.
- JASLOW, C.R. 1990. Mechanical properties of cranial sutures. *Biomechanics* 23, 4, 313–321.
- JORDANA, F. AND COLAT-RARROS, J. 2010. Les membranes. *Science et Avenir* 353, 659–673.
- JORGENSEN, C. AND DESCHASEAUX, F. 2011. Les cellules souches mésenchymateuses Actualités thérapeutiques dans les maladies dysimmunitaires. *Médecine sciences* 27, 275–84.
- KARUNARATNE, A., BOYDE, A., ESAPA, C.T. ET AL. 2012a. Symmetrically reduced stiffness and increased extensibility in compression and tension at the mineralized fibrillar level in rachitic bone. *Bone* 52, 2, 689–698.
- KARUNARATNE, A., DAVIS, G.R., HILLER, J. ET AL. 2012b. Hypophosphatemic rickets is associated with disruption of mineral orientation at the nanoscale in the flat scapula bones of rachitic mice with development. *Bone* 51, 3, 553–562.
- KAY, M.I., YOUNG, R.A. AND POSNER, A. S. 1964. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* 204, 1050–1052.
- LANDI, E., CELOTTI, G., LOGROSCINO, G. AND TAMPIERI, A. 2003. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society* 23, 15, 2931–2937.
- LEROUXEL, E., WEISS, P., GIUMELLI, B. ET AL. 2006. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas : An experimental study in rats. *Biomaterials* 27, 4566–4572.
- LINDE, F., CHRISTIAN, H. AND SORENSEN, F. 1993. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics* 26, 1249–1252.
- LIU, H., HU, L. AND FENG, W. 2016. Microstructure characterization of the human frontal bone. *Materials Letters* 175, 173–176.
- LIU, Y., MANJUBALA, I., SCHELL, H. ET AL. 2010. Size and habit of mineral particles in bone and mineralized callus during bone healing in sheep. *Journal of Bone and Mineral Research* 25, 9, 2029–2038.
- MA, S., BOUGHTON, O., KARUNARATNE, A., JIN, ANDICOB, J., HANSEN, U. AND ABEL, R. 2016. Synchrotron Imaging Assessment of Bone Quality. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 14, 3, 150–160.
- MANJUBALA, I., LIU, Y., EPARI, D.R. ET AL. 2009. Spatial and temporal variations of mechanical properties and mineral content of the external callus during bone healing. *Bone* 45, 2, 185–192.
- McELHANEY, J., FOGLE, J., BYARS, E. AND WEAVER, G. 2017. Effect of embalming on the mechanical properties of beef bone. *Journal of Applied Physiology* 19, 6, 1234–1236.
- McELHANEY, J.H., FOGLE, J.L., MELVIN, J.W., HAYNES, R.R., ROBERTS, V.L. AND ALEM, N.M. 1970. Mechanical properties on cranial bone. *Journal of biomechanics* 3, 5, 495–511.
- MEEK, K.M. AND BOOTE, C. 2009. The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. *Progress in Retinal and Eye Research* 28, 5, 369–392.

Références bibliographiques

- MEUNIER, P.J. AND BOIVIN, G. 1997. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: Therapeutic implications. *Bone* 21, 5, 373–377.
- MILLER, Z. AND FUCHS, M.B. 2005. Effect of trabecular curvature on the stiffness of trabecular bone. *Journal of Biomechanics* 38, 9, 1855–1864.
- MIRON, R.J. AND ZHANG, Y.F. 2012. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of Dental Research* 91, 8, 736–744.
- MIRZAALI, M.J., SCHWIEDRZIK, J.J., THAIWICHAI, S. ET AL. 2016. Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone* 93, 196–211.
- NAKANO, T., KAIBARA, K., ISHIMOTO, T., TABATA, Y. AND UMAKOSHI, Y. 2012. Biological apatite (BAP) crystallographic orientation and texture as a new index for assessing the microstructure and function of bone regenerated by tissue engineering. *Bone* 51, 4, 741–747.
- NAKANO, T., KAIBARA, K., TABATA, Y. ET AL. 2002. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam x-ray diffractometer system. *Bone* 31, 4, 479–487.
- NERY, E.B., LEGEROS, R.Z., LYNCH, K.L. AND LEE, K. 2012. Tissue Response to Biphasic Calcium Phosphate Ceramic With Different Ratios of HA/ β TCP in Periodontal Osseous Defects. *Journal of Periodontology* 63, 9, 729–735.
- OLIVER, W.C. AND PHARR, G.M. 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Materials Research Society* 7, 6, 1564–1583.
- OPENSTAX. 2016. *Anatomy & Physiology*. .
- OTT, S. 2016. «CHAPITRE 2 - Bone biology and effects of pharmaceutical intervention on bone quality ». In *Materials and Devices for bone Disorders*, édité par Sumsmitta Bose et Amit Bandyopadhyay. .
- PABISCH, S., WAGERMAIER, W., ZANDER, T., LI, C. AND FRATZL, P. 2013. *Imaging the nanostructure of bone and dentin through small- and wide-angle X-ray scattering*. Elsevier Inc.
- PETITE, H. 2002. La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Medecine/Sciences* 18, 995–1002.
- PONÇOT, M., MARTIN, J., CHAUDEMANCHE, S. ET AL. 2015. Complementarities of high energy WAXS and Raman spectroscopy measurements to study the crystalline phase orientation in polypropylene blends during tensile test. *Polymer* 80, 27–37.
- PUXKANDL, R., ZIZAK, I., PARIS, O. ET AL. 2002. Viscoelastic properties of collagen: Synchrotron radiation investigations and structural model. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357, 1418, 191–197.
- QIU, Z.Y., CUI, Y., TAO, C.S. ET AL. 2015. Mineralized collagen: Rationale, current status, and clinical applications. *Materials* 8, 8, 4733–4750.
- RAHMOUN, J., AUPERRIN, A., DELILLE, R., NACEUR, H. AND DRAZETIC, P. 2014. Characterization and micromechanical modeling of the human cranial bone elastic properties. *Mechanics*

- Research Communications* 60, 7–14.
- REILLY, D.T. AND BURSTEIN, A.H. 1975. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *Journal of Biomechanics* 8, 6, 393–405.
- REILLY, D.T., BURSTEIN, A.H. AND FRANKEL, V.H. 1974. The elastic modulus for bone. *Journal of Biomechanics* 7, 3.
- REZNIKOV, N., SHAHAR, R. AND WEINER, S. 2014a. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomaterialia* 10, 9, 3815–3826.
- REZNIKOV, N., SHAHAR, R. AND WEINER, S. 2014b. Three-dimensional structure of human lamellar bone: The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. *Bone* 59, 93–104.
- RHO, J., KUHN-SPEARING, L. AND ZIOUPOS, P. 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering and physics* 11.
- RHO, J.Y., ASHMAN, R.B. AND TURNER, C.H. 1993. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: Ultrasonic and microtensile measurements. *Journal of Biomechanics* 26, 2, 111–119.
- RHO, J.Y., FAN, Z., HO BA THO, M.-C., BRICE, I. AND BENSAMOUN, S. 2008. Assessment of Mechanical Properties of Human Osteon Lamellae Exhibiting Various Degrees of Mineralization By Nanoindentation. *Journal of Musculoskeletal Research* 11, 03, 135–143.
- RHO, J.Y., TSUI, T.Y. AND PHARR, G.M. 1997. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* 18, 20, 1325–1330.
- RHO, J.Y., ZIOUPOS, P., CURREY, J.D. AND PHARR, G.M. 2002. Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *Journal of Biomechanics* 35, 2, 189–198.
- RIGGS, B.L. AND PARFITT, A.M. 2005. Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 20, 2, 177–184.
- RINNERTHALER, S., ROSCHGER, P., JAKOB, H.F., NADER, A., KLAUSHOFER, K. AND FRATZL, P. 1999. Scanning Small Angle X-ray Scattering Analysis of Human Bone Sections. *Calcified Tissue International* 64, 5, 422–429.
- ROSSI, A.L., BARRETO, I.C., MACIEL, W.Q. ET AL. 2012. Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite–alginate composite and sintered hydroxyapatite. *Bone* 50, 1, 301–310.
- RUSESKA, G. AND FIDANCHEVSKA, E. 2006. Mechanical and Thermal-Expansion Characteristics of. *Science of sintering* 10, 38, 245–253.
- SABER-SAMANDARI, S. AND GROSS, K.A. 2009. Micromechanical properties of single crystal hydroxyapatite by nanoindentation. *Acta Biomaterialia* 5, 6, 2206–2212.
- SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M.T., DINPANAH-KHOSHDARGI, E. AND JAMSHIDI, A. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia* 9, 8, 7591–7621.

Références bibliographiques

- SAFADI, F., BARBE, M., ABDELMAGID, S. ET AL. 2009. Bone structure, development and pathology. In: J.S. Khurana, ed., *Bone pathology*. Humana Press, 1–50.
- SASAKI, N. AND ODAJIMA, S. 1996. Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. *Journal of Biomechanics* 29, 5, 655–658.
- SASAKI, N., SHUKUNAMI, N., MATSUSHIMA, N. AND IZUMI, Y. 1999. Time-resolved X-ray diffraction from tendon collagen during creep using synchrotron radiation. *Journal of Biomechanics* 32, 3, 285–292.
- SCHNEIDER, P., MÜLLER, R., CARNELLI, D., BALMELLI, A., COURTY, D. AND CASANOVA, M. 2017. Nanoindentation analysis of the micromechanical anisotropy in mouse cortical bone. *Royal Society Open Science* 4, 2, 160971.
- SETO, J., GUPTA, H.S., ZASLANSKY, P., WAGNER, H.D. AND FRATZL, P. 2008. Tough Lessons From Bone: Extreme Mechanical Anisotropy at the Mesoscale. *Advanced Functional Materials* 18, 13, 1905–1911.
- SUN, Y.L., LUO, Z.P., FERTALA, A. AND AN, K.N. 2004. Stretching type II collagen with optical tweezers. *Journal of Biomechanics* 37, 11, 1665–1669.
- TADANO, S. AND GIRI, B. 2012. X-ray diffraction as a promising tool to characterize bone nanocomposites. *Science and technology of advanced materials* 12, 2011.
- THERY, A., BLÉRY, P., MALARD, O. ET AL. 2015. Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone regeneration in an irradiated area. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 43, 7, 1169–1176.
- TOLLEMAR, V., COLLIER, Z.J., MOHAMMED, M.K., LEE, M.J., AMEER, G.A. AND REID, R.R. 2016. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes and Diseases* 3, 1, 56–71.
- TROJANI, C., BOUKHECHBA, F., SCIMECA, J. ET AL. 2006. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27, 17, 3256–3264.
- TURUNEN, M.J., KASPERSEN, J.D., OLSSON, U. ET AL. 2016. Bone mineral crystal size and organization vary across mature rat bone cortex. *Journal of Structural Biology* 195, 3, 337–344.
- UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T. ET AL. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 18, 7260–4.
- DE VERNEJOL, M.C. AND MARIE, P. 1993. Cellules Osseuses Et Remodelage Osseux. *Medecine/Sciences* 9, 11, 1192–1203.
- WAGERMAIER, W., GOURRIER, A. AND AICHMAYER, B. 2016. Understanding Hierarchy and Functions of Bone Using Scanning X-ray Scattering Methods. 4, 46–73.
- WANG, Q. AND DECHOW, P.C. 2006. Elastic properties of external cortical bone in craniofacial skeleton of the rhesus monkey. *The Canadian Historical Review* 68, 4, 576–586.

- WANG, W. AND YEUNG, K.W.K. 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* 2, 4, 224–247.
- WANG, X.J., CHEN, X.B., HODGSON, P.D. AND WEN, C.E. 2006. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* 16, SUPPL.
- WOOD, J.. 1970. Dynamic response of human cranial bone. *Journal of Biomechanics* 4, 1–12.
- WOODWARD, J.C. AND RISER, W.H. 1991. Morphology of fracture nonunion and osteomyelitis, in fractures complications. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 21, 4, 813–844.
- YAMADA, S., TADANO, S., FUJISAKI, K. AND KODAKI, Y. 2013. Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur. *Journal of Biomechanics* 46, 1, 31–35.
- YUAN, F., STOCK, S.R., HAEFFNER, D.R., ALMER, J.D., DUNAND, D.C. AND BRINSON, L.C. 2011. A new model to simulate the elastic properties of mineralized collagen fibril. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 10, 2, 147–160.
- ZAMIRI, A. AND DE, S. 2011a. Mechanical properties of hydroxyapatite single crystals from nanoindentation data. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 2, 146–152.
- ZAMIRI, A.R. AND DE, S. 2011b. Modeling the anisotropic deformation response of β -HMX molecular crystals. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* 36, 3, 247–251.
- ZIZAK, I., ROSCHGER, P., PARIS, O. ET AL. 2003. Characteristics of mineral particles in the human bone/cartilage interface. *Journal of Structural Biology* 141, 3, 208–217.
- ZYSSET, P.K., EDWARD GUO, X., EDWARD HOFFLER, C., MOORE, K.E. AND GOLDSTEIN, S.A. 1999. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of Biomechanics* 32, 10, 1005–1012.

Titre : Caractérisation multiéchelle par rayonnement synchrotron des hétérogénéités mécaniques et microstructurales de l'os au cours de la régénération en lien avec les processus biologiques

Mots clés : Régénération osseuse / Comportement mécanique / Synchrotron / Microstructure

Résumé : La compréhension du comportement mécano-biologique du tissu régénéré à ses différentes échelles structurales est primordiale dans le but de proposer des outils d'aide au traitement des fractures osseuses. L'ambition de cette étude est de corrélérer le comportement mécanique de l'os régénéré par implantation, résolu dans le temps et dans l'espace, avec les processus biologiques associés. La taille et l'orientation des particules minérales osseuses (hydroxyapatite) ainsi que la distribution de la déformation des cristaux, mesurées *in situ* lors de chargement en traction par diffusion des rayons X aux grands (WAXS) et aux petits (SAXS) angles, ont été étudiées à différents stades de régénération. L'analyse a été complétée par une quantification des propriétés élastiques de l'os à l'échelle des lamelles grâce à des mesures par nanoindentation.

Nos méthodes de caractérisation mécanique (essais de traction et nanoindentation) et biologique (mesures par microtomographie X et observations histologiques) multiéchelles ont été appliquées sur des défauts crâniens comblés par trois types d'implants : 1) une greffe osseuse (Bone Graft - BG) ; 2) des grains de phosphate de calcium biphasé (Biphasic Calcium Phosphate - BCP) et 3) un mélange de BCP avec de la moelle osseuse (Total Bone Marrow - TBM). Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation du BCP comme matériau d'implant permet une récupération des propriétés structurales et mécaniques de l'os régénéré comparables à celles obtenues avec la greffe osseuse. Néanmoins, l'efficacité du BCP reste limitée malgré l'amélioration apportée par l'ajout de moelle osseuse totale.

Title: Multi-scale characterization by synchrotron radiation of mechanical and microstructural heterogeneities of bone during regeneration in relation to biological processes

Keywords: Bone regeneration / Mechanical behavior / Synchrotron / Microstructure

Abstract: Understanding the mecano-biological behavior of regenerated tissue is crucial in order to provide relevant tools in the treatment of bone fractures. The major challenge of this work is to correlate time- and space- resolved mechanical behavior of bone regenerated by implantation to the related biological processes. Size and orientation of bone mineral particles (hydroxyapatite) as well as crystal strain distribution under macroscopic tensile load through *in situ* WAXS and SAXS (Wide- Small-Angle X-ray Scattering) measurements have been investigated in various regeneration stages. This analysis has been completed quantifying bone elastic properties at the lamellar scale thanks to nanoindentation measurements.

Our multi-scale mechanical (tensile and nanoindentation tests) and biological (microtomography X measurements and histological observations) characterization methods have been applied to cranial defects filled with three types of implants: 1) Bone Graft (BG); 2) Biphasic Calcium Phosphate (BCP) grains and 3) a mixture of BCP with Total Bone Marrow (TBM). The major result of this study shows that the use of BCP, as an implant material, is suitable for a structural and mechanical property recovery of the regenerated bone as compared to that obtained with bone grafting. Nevertheless, the efficiency of BCP remains limited despite the improvement due to the addition of total bone marrow.