

Université de Nantes
Faculté de chirurgie dentaire

École Doctorale Biologie-Santé

Année 2012

N°34

Développement de matrices céramiques et composites pour l'ingénierie tissulaire osseuse

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Ingénierie tissulaire osseuse
Spécialité : Biomatériaux

Présentée et soutenue publiquement par

Thomas MIRAMOND

Le 27 Novembre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

M. Ranieri Cancedda Professeur des Universités, Université de Gênes (Gênes, Italie)

M. Franck Jegoux Professeur des Universités, Université de Rennes (Rennes, France)
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes

Examineurs :

Laurence Bordenave Professeur des Universités, Université de Bordeaux (Bordeaux, France)
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux

Pierre Corre Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes (Nantes, France)

Serge Baroth Docteur-Ingénieur R&D, Société BIOMATLANTE (Vigneux-de-Bretagne, France)
Co-encadrant dans le cadre de la convention CIFRE

Membres Invités :

Eric Aguado Maître de Conférences des Universités, École Nationale Vétérinaire de Nantes (Nantes, France)

Pascal Borget Docteur-Ingénieur R&D, Société BIOMATLANTE (Vigneux-de-Bretagne, France)

Directeur de thèse

Guy Daculsi, Directeur de Recherche de Classe Exceptionnelle, INSERM (Nantes, France)

« Les sciences sont des lunettes pour grossir les problèmes. »

Louis Scutenaire

À Luce, ma famille, Cédric et mes ami(e)s

Remerciements

Une grande chance m'a été donnée par Guy Daculsi de me plonger dans ce domaine passionnant de l'ingénierie tissulaire à la frontière de plusieurs territoires si riches, que sont la science des matériaux, la biologie et la médecine, par la diversité des personnes et des enjeux s'y côtoyant. Je ne peux que lui en être le plus humblement reconnaissant. Son savoir-faire et sa détermination à toute épreuve m'ont porté avec une confiance continue durant ces 3 années vers l'accomplissement de ce projet de thèse.

Je remercie grandement Chantal Gobin, de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions pour cette thèse CIFRE avec Biomatlante et de m'avoir permis notamment de participer à des formations professionnelles.

Je remercie chaleureusement Pierre Weiss de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de l'Inserm U791 ainsi que Jérôme Guicheux pour ses conseils scientifiques.

J'exprime toute ma gratitude envers les membres extérieurs du Jury : Ranieri Cancedda, Laurence Bordenave et Franck Jégoux. C'est un plaisir et un honneur que vous m'accordez en venant à Nantes pour ma soutenance.

J'adresse toute ma reconnaissance à Pierre Corre, Eric Aguado et Pascal Borget d'avoir accepté l'invitation à faire partie du jury en tant qu'examineur ou invité intérieur .

Comment ne pas remercier amicalement Serge Baroth qui avec beaucoup de générosité et de bonne humeur m'a formé et a co-encadré ces travaux de thèse. Que les plus belles dentures (et non dentitions) se présentent à toi désormais pour ta formation d'odontologie.

Un grand merci à Pascal Borget et Françoise Moreau, pour leur soutien, leurs qualités humaines, professionnelles et leurs participations essentielles aux travaux réalisés.

J'adresse également tous mes remerciements à Pierre Corre, ainsi que Eric Aguado, Eric Goyenvalle, Franck Jégoux et Borhane Fellah avec qui j'ai eu le plaisir et le privilège de travailler en ce qui concerne les aspects pré-cliniques des études.

La collaboration avec les partenaires des projets européens fut très enrichissante c'est pourquoi je tiens à remercier les équipes des projets REBORNE et GAMBA.

Je remercie tous les membres permanents du laboratoire LIOAD pour leur bonne humeur, leurs aides multiples et leurs expertises indispensables à l'achèvement des études. En particulier, Caroline Colombeix pour la microscopie confocale, Julie Lesoeur et Sophie Sourice pour l'histologie, Paul Pilet pour la microscopie électronique et l'analyse d'image, Thierry Rouillon pour la cristallographie et la microscopie, Martial Masson et Christophe Merceron pour la biologie moléculaire, Mélanie Verron, Maïthé Perré et Carole Gautier pour leur gestion administrative agréable et efficace, Aurore Vanpoucke pour sa gentillesse et sa disponibilité au secrétariat, Bruno Massé pour ses coups de mains en informatique et électronique et Gilles Souhiard pour ces aides diverses et variées.

Je salue avec amitié les autres étudiants de passage ou de long terme du LIOAD pour leur bonne humeur communicative : Amadou, Annabelle, Christophe, Gildas, Greg, Fahd, Jérémy, Johan, Pauline, Pauline (B comme...), Samy, Sophie, Whenzen etc ...

Table des matières

* Les mots accolés à ce symbole dans le texte sont explicités dans le glossaire

Remerciements	
Table des matières	
Introduction générale	
Acronymes et abréviations	
Chapitre 1: Les matrices phosphocalciques biphasées	
1.1. Les besoins cliniques d'une alternative à l'autogreffe	1
1.2. L'approche biomimétique des phosphates de calcium	6
1.3. La bioactivité des phosphates de calcium	18
1.4. Le concept micro-macroporeux des granules MBCP®	22
1.5. Étude comparative de produits commerciaux	25
Chapitre 2: Potentiel d'ostéoinduction des granules phosphocalciques biphasés	36
2.1. La stratégie de l'ingénierie tissulaire osseuse	36
2.2. Étude pré-clinique réalisée chez la souris immunodéficiente	39
2.3. Compléments de l'étude du potentiel d'ostéoinduction	41
2.4. Étude de faisabilité d'un modèle d'ostéonécrose tibiale chez le lapin	46
Perspectives et discussion	49
Chapitre 3: Développement et caractérisations de nouvelles formulations galéniques	51
3.1. Les granules creux	52
3.1.1. Le projet GAMBA : thérapie génique et ingénierie tissulaire	52
3.1.2. Étude comparative granules ronds-denses/ronds-creux	65
3.1.3. Compléments et discussion sur l'étude comparative	67
3.2. État de l'art des formulations composites gels/céramiques	70
3.2.1. Les ciments phosphocalciques	70
3.2.2. Les hydrogels, pâtes et mastics phosphocalciques	72
3.2.3. Étude in vivo comparative entre 2 mastics phosphocalciques	74
3.2.4. Compléments et discussion sur l'étude comparative	77
Perspectives et discussion	80
Chapitre 4: Matrices composites fibreuses synthétisées par électrospinning	81
4.1. Le rôle des membranes fibreuses	82
4.2. Les polymères d'intérêt en ingénierie tissulaire osseuse	83
4.3. Étude de faisabilité sur la mise au point de composites granules creux/fibres de PLDLLA	87
4.4. Compléments et discussions	89
Perspectives et discussion	95
CONCLUSION GENERALE	97
GLOSSAIRE	98
ANNEXES	104
REFERENCES	122

Introduction générale

L'intégration bénéfique aux tissus biologiques hôtes de biomatériaux synthétiques ou naturels et de matériels issus du vivant, constitue le concept clé de l'approche de la médecine régénérative*. En particulier, les enjeux de l'ingénierie tissulaire osseuse sont de promouvoir une biocompatibilité* durable améliorant le confort vital des patients, conjointement à une repousse osseuse efficace, pour des défauts de taille critique*, impliquant la résorption progressive du dispositif médical* en faveur de la formation d'un os de qualité capable de remplir de nouveau les fonctions préalablement perdues.

L'architecture complexe des os implique des caractéristiques bioactives* se situant aussi bien à l'échelle macroscopique dans un rôle principalement mécanique, microscopique dans l'importance de la porosité en ce qui concerne l'invasion cellulaires et des fluides biologiques, que nanoscopique dans le rôle des interactions de surface favorisant l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire. Au regard de cette complexité native de l'os, le frittage de phosphate de calcium, menant à la nucléation de cristaux d'hydroxyapatite (HA) et de bêta-tricalcium phosphate (β -TCP), en présence de porogènes, restent actuellement le moyen le plus fréquemment utilisé pour l'obtention de biomatériaux céramiques synthétiques biomimétiques*. Ces céramiques poreuses obtenues à hautes températures sont les références en ce domaine de par leurs propriétés physico-chimiques proches de celles de l'os favorisant l'ostéoconduction*, évitant les risques de complications liées aux rejets immunitaires inhérents et rassurant quant aux possibles transmissions d'agents pathogènes venant des allogreffes* et xénogreffes* (prions, virus...).

L'utilisation de ces deux phases cristallines spécifiques (HA et β -TCP) depuis plusieurs décennies a permis d'avoir le recul scientifique et clinique nécessaire au développement de biomatériaux biphasés destinés aux dispositifs médicaux implantables. C'est dans cette optique que les matrices de phosphate de calcium biphasées ont été développées et commercialisées, notamment les granules de la gamme MBCP® de la compagnie Biomatlante SA. Ces dernières seront prises comme base d'explications de concept et de comparaison avec d'autres matrices du marché en guise de chapitre d'introduction.

Le thème de l'ostéoinduction des céramiques supplémentées ou non d'agents bioactifs (moelle totale osseuse, cellules souches mésenchymateuses isolées), sera abordé au second chapitre au travers de l'étude préclinique menée sur le modèle de la souris immunodépressive en implantation sous-cutanée, dans le contexte du projet Européen REBORNE d'ingénierie tissulaire osseuse, utilisant les granules MBCP® et MBCP+®. En second lieu sera évoquée la mise en place d'un modèle d'ostéonécrose chez le lapin en site tibial dont seuls les résultats préliminaires de faisabilité seront présentés, l'étude finale étant en cours de réalisation au moment de la rédaction du présent mémoire.

Une nouvelle formulation galénique, les granules creux, a été mise au point durant cette thèse notamment afin de satisfaire le cahier des charges du projet européen GAMBA de thérapie génique*. Les spécificités physico-chimiques de ces nouveaux granules creux, leurs évaluations *in vitro* et *in vivo* seront développées dans le troisième chapitre ainsi que l'analyse des résultats en découlant. L'objectif étant leur intégration finale au projet GAMBA en tant que porteur de plasmides de transfections* et de cellules ostéochondroprogénitrices*. Le développement de ces nouveaux granules rentre également dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse du projet REBORNE. Ce troisième chapitre inclut également un état de l'art sur les formulations composites novatrices, dont le produit In'Oss® développé par

Biomatlante, qui sera caractérisé et comparé à un autre produit existant lors d'une étude pré-clinique réalisée chez le lapin.

Enfin le dernier chapitre du manuscrit sera consacré à la description de la mise en place au sein du laboratoire du LIOAD de l'étude appliquée au développement de matrices composites polymères/céramiques par la méthode de l'électrospinning mené durant ce doctorat. En effet la combinaison des nouveaux granules creux avec une structure fibreuse poreuse permet la création de matrices tridimensionnelles novatrices dans la continuité de l'approche biomimétique.

Les trois derniers chapitres seront agrémentés des articles soumis ou publiés correspondant tout ou partie aux thèmes respectivement concernés.

Financements: Biomatlante SA, ANRT, REBORNE FP7-HEALTH-2009-241879, GAMBA NMP3-SL-2010-245993

Note de lecture : Le terme anglais « scaffold » désignant littéralement « échafaudage » sera remplacé par le terme plus adéquat de « matrice » tout au long de ce manuscrit pour désigner les biomatériaux servant de support à l'adhésion des cellules osseuses et la repousse d'un tissu néo-formé.

Acronymes et abréviations

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ASTM: American Society for Testing and Materials
 α -TCP: alpha-tricalcium phosphate
 β -TCP : bêta-phosphate tricalcique
BCP : phosphate de calcium biphasique
CDA : apatite déficiente en calcium
CSM : cellules souches mésenchymateuses
DM : dispositif médical
DRX: diffraction des rayons X
GAMBA: Gene Activated Matrices for Bone and cartilage regeneration in Arthritis
HA :hydroxyapatite
Insee : Institut National de la Statistique et des Études Économiques
Inserm : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médical
IRTF : Infra-Rouge à Transformé de Fourier
ISO : International Standard Organisation
JCPDS : Joint Committee on Powder Diffraction Standards
LIOAD : Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire
MEB : microscope électronique à balayage
MOT : moelle osseuse totale
ORL : oto-rhino-laryngologie
PCa : phosphate de calcium
PE : polyéthylène
PEG : polyéthylène glycol
PET : polyéthylène téréphtalate
PC : polycarbonate
PMMA : polyméthylméthacrylate
PS : polystyrène
PTFE : polytétrafluoroéthylène
PU : polyuréthane
REBORNE : Regenerating Bone Defects using New biomedical Engineering approaches
SS : surface spécifique

Résumé

Les stratégies de l'ingénierie tissulaire osseuse s'articulent autour du concept du biomatériau servant de matrice à l'invasion et la colonisation cellulaire. Les céramiques biphasées micro-macroporeuses constituées des phases cristalline hydroxyapatite (HA) et bêta-tricalcium phosphate (β -TCP) représentent des candidats parmi les plus pertinents en termes de biomimétisme et de bioactivité. L'utilisation de ces matrices ostéoconductrices dans les 2 projets européens GAMBA et REBORNE, dont les thématiques respectives sont la thérapie génique de l'arthrose et l'ingénierie tissulaire osseuse, est à l'origine des travaux réalisés durant ce doctorat.

Ce manuscrit présente ainsi en premier lieu une étude menée sur l'évaluation du potentiel ostéoinducteur de ces matrices granulaires, supplémentées ou non en agents bioactifs (cellules souches isolées ou moelle osseuse totale), implantées en site ectopique chez la souris nude. Cette étude a été l'occasion de réaliser un comparatif entre caractéristiques et performances de matrices céramiques de ratio HA/TCP 60/40 (MBCP®, Biomatlante SA) ou 20/80 (MBCP+®, Biomatlante SA).

Dans le contexte de la thérapie génique du projet GAMBA, les résultats préliminaires d'analyses d'adsorption des vecteurs de transfection (polymériques ou liposomiques) sur ces mêmes matrices céramiques granulaires, ainsi que la stabilité de ces dernières au cours des processus d'association, ont été également analysés.

Afin de répondre aux nécessités de développement de matrices ostéoconductrices porteuses et protectrices de cellules souches, une nouvelle formulation galénique a été mise au point durant cette thèse: les granules creux. Une étude *in vitro* et *in vivo* a été réalisée afin de comparer les avantages et inconvénients de ces nouveaux granules ronds-creux possédant des parois fines et une concavité interne en comparaison avec des granules classiques ronds-pleins dont seuls les convexités de surface sont accessibles aux cellules.

L'essor des substituts osseux injectables dans le contexte de la chirurgie mini-invasive implique la commercialisation de produit innovants. Une étude *in vivo* réalisée chez le lapin en site orthotopique sur le nouveau mastic In'Oss®, développé par le département R&D de la société Biomatlante, est également présentée afin d'évaluer son potentiel en termes de capacité de résorption et de favorisation de la repousse osseuse.

Enfin, les propriétés mécaniques de l'os étant régies à la fois par celle de la partie minérale (cristaux d'apatites) et celles de la partie organique (fibres de collagène), des membranes composites en fibres d'acide polylactique (PLDLLA) contenant soit des microparticules de HA, soit des granules creux biphasés, ont été synthétisés par la méthode en une étape de l'électrospinning. Une étude de caractérisation physico-chimique et d'adhésion cellulaire sur ces membranes composites est discutée en termes de pertinence vis-à-vis des enjeux de la médecine régénérative de l'os, tout en conservant une optique de valorisation de matières premières industrielles.

Mots Clés : Matrices céramiques phosphocalciques biphasées - ingénierie tissulaire osseuse - granules creux - membranes fibreuses - électrospinning - thérapie génique - ostéoinduction

Abstract

Strategies for bone tissue engineering are conceived around the concept of scaffold for cell invasion and colonization. Biphasic micro-macroporous ceramics made of crystalline phases hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) represent the most relevant candidates in terms of biomimicry and bioactivity. The use of osteoconductive matrices in two European projects GAMBA and REBORNE, whose themes are respectively gene therapy for osteoarthritis and bone tissue engineering, is the origin of the work done during this PhD.

This manuscript presents first a study on the evaluation of the osteoinductive potential of these granular matrices, supplemented or not with bioactive agents (isolated stem cells or total bone marrow), implanted in ectopic site in nude mice model. This study was an opportunity to make a comparison between the performance characteristics of ceramic scaffolds with a ratio of HA/TCP 60/40 (MBCP[®], BIOMATLANTE SA) or 20/80 (MBCP +[®], BIOMATLANTE SA).

In the context of gene therapy GAMBA project, preliminary analysis of adsorption of transfection vectors (polymeric or liposomal) on the same granular ceramic matrices, as well as the stability of the latter in the process of association were also analyzed.

To meet the development needs of osteoconductive cell carriers and protective stem cells, a new pharmaceutical formulation has been developed during this thesis: the hollow granules called hollow shells. An *in vitro* and *in vivo* study was performed to compare the advantages and disadvantages of these new round hollow granules, with thin walls and internal concavity, in comparison with conventional round filled granules which provide only convex surface for cell adhesion.

The market development about injectable bone substitutes in the context of minimally invasive surgery requires innovative products. An *in vivo* study performed in rabbit orthotopic site with the new putty In'Oss[®], developed by the R&D department of Biomatlante Company, is also presented in order to evaluate its potential in terms of bone ingrowth at the expense of the resorbed biomaterial.

Finally, as the mechanical properties of bone are governed by mineral part (apatite crystals) and organic part (collagen fibers), fiber composite membranes of polylactic acid (PLDLLA) containing HA microparticles or hollow granules were synthesized by the one-step electrospinning method. A study of physico-chemical properties and cell adhesion on these composite membranes will be finally discussed in terms of relevance with respect to regenerative medicine stakes, while maintaining an enhancement of industrial raw materials perspective.

Keywords: Biphasic calcium phosphate scaffolds - Bone Tissue Engineering - Hollow granules - fiber-based membranes – electrospinning - gene therapy - osteoinduction

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Principales applications des biomatériaux.....	3
Figure 2 : Nombre de DM mis sur le marché.....	4
Figure 3 : Répartition géographique des DM implantables	5
Figure 4 : Complexité de l'os	7
Figure 5 : Composition moyenne de l'os	8
Figure 6 : Principe général du remaniement osseux.....	9
Figure 7 : Unité de la maille cristalline de l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	12
Figure 8 : β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6$	12
Figure 9 : Les étapes d'obtention du BCP.....	13
Figure 10 : Le diagramme de phase binaire $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$	13
Figure 11 : Maille cristallographique de l'HA, β -TCP et α -TCP.....	14
Figure 12 : Effet du frittage sur la croissance des cristaux d'HA et la diminution de leur surface spécifique.....	15
Figure 13 : Cycle de frittage classique des BCP	16
Figure 14 : Frittage incomplet d'un BCP 6040 réalisé au LIOAD	16
Figure 15 : Frittage complet classique d'un BCP 60/40 réalisé au LIOAD.....	16
Figure 16 : Image de cristaux HA et TCP d'un BCP 6040 par MET et analyse semi-quantitative EDX.....	17
Figure 17 : Exemples de lignes de diffractions EBSD sur un bloc de BCP 6040.....	18
Figure 18 : Recherche bibliographique sur les matériaux de la recherche en ingénierie tissulaire osseuse	22
Figure 19 : Macrostructure poreuse du MBCP® observée au MEB.....	23
Figure 20 : Principe général de formation des micropores des BCP obtenus par frittage	24
Figure 21 : Microstructure poreuse des matrices MBCP® observée au MEB	24
Figure 22 : Ligne de fracture intergranulaire suivant les macropores sur un ciment phosphocalcique (à gauche) et amorce de rupture initiée dans un macropore.....	25
Figure 23 : Rupture intragranulaire observée sur un granule de BCP.....	25
Figure 24 : La stratégie globale de l'ingénierie tissulaire	36
Figure 25 : Nombres de publications sur le thème de l'ingénierie tissulaire	37
Figure 26 : Facteurs de différenciation des CSM en lignée osseuse.....	38
Figure 27 : Stratégie de l'étude de l'ostéoinduction des matrices MBCP® supplémenté d'agents bioactifs.....	39
Figure 28 : Lavage des fûts tibiaux et fémoraux de rat (gauche), MOT obtenue avec un rat (droite).....	42
Figure 29 : Localisation par microscopie optique des zones d'ostéoinduction à 8 semaines en ectopique avant visualisation en microscopie confocale. En vert les zones d'os de novo (flèches bleues).....	42
Figure 30 : Vérification du marquage DIL des cellules de la MOT de rat avant implantation. MOT en lumière transmise (gauche) et laser confocale 543 nm (droite).....	43
Figure 31 : Images confocales à 543 nm laissant apparaître des cellules implantées après 8 semaines participant à la formation de l'os de novo. Les cellules inoculées et marquées au DIL bordent l'os néoformé.....	43
Figure 32 : Macrographie de la souris pendant l'opération en calvaria (gauche) et après euthanasie à 6 semaines (droite).....	44
Figure 33 : Coupes histologiques colorées au trichrome de Goldner des calvarias avec MBCP+® et MOT non-marquée (à gauche) ou marquée au DIL (à droite). Flèches : environnement médullaire.....	44

Figure 34 : Analyses d'images MEB, en rouge le biomatériau et en jaune l'os nouvellement formé sur la calvaria de souris avec MBCP+® et MOT de rat non-marquée (gauche) et marqué au DIL (droite)	45
Figure 35 : Marquage au DIL de la MOT de rat sur matrice MBCP+® (droite) par rapport à la moelle contrôle non-marquée (gauche) en site calvaria à 6 semaines. En rouge les cellules inoculées et marquées au DIL après 6 semaines en site calvaria	45
Figure 36 : Thermocouple pour l'ostéonécrose (à gauche) et perforation de l'épiphyse tibiale (à droite)	47
Figure 37 : Ratio aire de la repousse osseuse par rapport à la surface du défaut calculée par analyse d'images	47
Figure 38 : coefficient de variation de la densité des travées osseuses par analyse d'image... 48	48
Figure 39 : Les différents types de vecteurs de transfection utilisés pour le projet GAMBA . 53	53
Figure 40 : Schéma d'action multiniveaux impliquée dans le projet GAMBA	55
Figure 41 : Vecteurs polymériques sur MBCP (gauche) et MBCP+ (droite)	58
Figure 42 : Vecteurs liposomiques déposés sur MBCP (gauche) et MBCP+ (droite).....	59
Figure 43 : Spectres IRTF. Flèches bleues : renforcement de la présence des groupes OH apatitiques. Flèches rouges : Apparition de pics de carbonate et de groupement alkyls CH-..	60
Figure 44 : Images de MEB des nouveaux granules creux	61
Figure 45 : Microtomographie d'un lot de granules creux.....	62
Figure 46 : Image de MEB des 2 brevets [B] et [C] les plus proches des granules creux développés [A]	63
Figure 47 : Résumé synthétique des stratégies évoquées dans le projet GAMBA	65
Figure 48 : Plan général de l'étude comparative granules ronds-denses/granules ronds-creux	65
Figure 49 : Complément à l'article, cellules MC3T3 dans la concavité d'un granule creux (gauche) et sur les convexités d'un granule rond et dense (droite) après 3 jours de culture....	67
Figure 50 : Concentration de moelle osseuse au centre des granules creux avec cellules adipeuses en blanc	68
Figure 51 : Résorption ostéoclastique sur paroi fine d'un granule creux. La flèche bleue indique un ostéoclaste multinucléé. La flèche noire la lacune de Howship associée. Les traits en pointillés sont de même longueur, égale à celle d'un ostéoclaste.	68
Figure 52 : Principe de l'ostéoclasie (image du site web www.unifr.ch)	69
Figure 53 : Paroi dense d'un granule rond classique (blanc, gauche) et paroi poreuse fine d'un granule creux absorbant les fluides biologiques (gris, droite)	69
Figure 54 : Distribution de porosité relative des ciments MCPC et Norian SRS dans le temps	71
Figure 55 : Plan général de l'étude comparative in vivo de 2 mastics phosphocalciques	75
Figure 56 : Macrographie du pistolet d'injection Actifuse® (gauche) et de la seringue In'Oss® (droite)	77
Figure 57 : Images MEB d'analyses d'images des explants de lapins (épiphyses fémorales) 78	78
Figure 58 : Diagramme de repousse osseuse et de résorption des biomatériaux d'après les calculs réalisés par analyses d'images	78
Figure 59 : Plans d'Ashby de propriétés croisées Module d'Elasticité-Densité (gauche) et Résistance à la fracture-Module d'Elasticité (droite).....	82
Figure 60 : Les 2 énantiomères de l'acide lactique	83
Figure 61 : Procédé industriel d'ouverture de cycle du lactide pour la synthèse de PLA.....	84
Figure 62 : Nombre de publications sur l'ingénierie tissulaire et les polymères, source PubMed, Janvier 2012.....	84
Figure 63 : Principe général de l'électrospinning	85

Figure 64 : Plan général de l'étude de faisabilité du développement de composite fibres de PLDLLA et de granules creux	87
Figure 65 : Image MEB des fibres de PLDLLA avant mise en contact avec des cellules mc3t3 (gauche) et image confocale après 3 jours de culture avec cellules filiformes proliférant le long des fibres (droite)	89
Figure 66 : Extensions cellulaires de mc3t3 entre fibres (flèches bleues, gauche) et une cellule adaptant sa morphologie à celle d'une fibre de PLDLLA (droite). Des filopodes sont discernables (flèche jaune)	89
Figure 67 : Intégration réussie d'une microparticule de BCP (gauche), et rupture de continuité provoquée par la présence d'une microparticule de BCP (droite) sur fibres de PLDLLA	90
Figure 68 : Granules creux intégrés aux mailles PLDLLA (flèches et contours bleus), avec temps de projection court provoquant des hétérogénéités (gauche) et temps de projection long impliquant une homogénéité (droite)	90
Figure 69 : Fibres de collagène (gauche) et de PLDLLA obtenues par électrospinning (droite). MEB	91
Figure 70 : Macrographies réalisées à l'explantation des rats à 2 semaines. (a) PLDLLA en sous-cutanée ; (b) chitosane en sous-cutanée ; (c) PLDLLA en épiphyse fémorale ; (d) chitosane en épiphyse fémorale.....	92
Figure 71 : Macrographies réalisées à l'explantation des rats à 4 semaines. (a) PLDLLA en sous-cutanée ; (b) chitosane en sous-cutanée ; (c) PLDLLA en épiphyse fémorale ; (d) chitosane en épiphyse fémorale.....	93
Figure 72 : Coupes histologiques à 4 semaines avec encapsulation (flèches bleues) des membranes de chitosane (filaments rouges, à droite) ainsi que présence abondante de tissu fibreux (flèches orange, à droite).	93
Figure 73 : Les 3 types d'adhésion cellulaire sur matrices	96

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Les différents implants, l'indication +/- révèle la grande dispersité des propriétés des biomatériaux et des conditions d'implantations.	2
Tableau 2 : Classification des dispositifs médicaux implantables. La dangerosité est croissante de I à III	5
Tableau 3 : Liste des 20 principaux fabricants de substituts osseux d'Europe	6
Tableau 4 : Différents calcium orthophosphates	10
Tableau 5 : Composition chimique et structurale des tissus osseux	15
Tableau 6 : Quelques exemples de facteurs impliqués dans la bioactivité des biomatériaux selon les auteurs	19
Tableau 7 : Classification des interactions biomatériaux-tissus hôtes	20
Tableau 8 : Liste du panel d'échantillons commerciaux	26
Tableau 9 : Observations au microscope électronique à balayage en mode électrons secondaires du panel de produits commerciaux	31
Tableau 10 : Tableau des résultats de caractérisations	32
Tableau 11 : Matrice de Pugh à facteurs égaux récapitulative des meilleurs candidats théoriques à l'utilisation en tant que substitut osseux	1
Tableau 12 : Études sur le potentiel d'ostéoinduction de dispositif pour l'ingénierie tissulaire osseuse	38
Tableau 13 : Répartition des publications de l'ingénierie tissulaire osseuse, source PubMed, décembre 2011	39
Tableau 14 : Comparatif qualitatif des ressemblances des modèles animaux avec l'homme..	50
Tableau 15 : Calculs des ratio HA/TCP à partir des diffractogrammes de DRX.....	56
Tableau 16 : Liste des études et brevets similaires ou approchant à la synthèse de granules creux de BCP.....	63
Tableau 17 : Liste des principaux polymères utilisés en ingénierie tissulaire	72
Tableau 18 : Synthèse des caractéristiques des hydrogels, des ciments, mastics et pâtes dans le cadre du cahier des charges du projet GAMBA.....	74
Tableau 19 : Cinétiques et mécanismes de biodégradation des principaux biomatériaux de l'ingénierie tissulaire osseuse.....	85
Tableau 20 : Dissolution du PLDLLA en fonction du solvant et obtention de fibre par electrospinning	86
Tableau 21 : Plan d'implantation pour le test de biocompatibilité des membranes PLDLLA et chitosane.....	91
Tableau 22 : Résultats d'expression génique ALPL et COL1A1 des CSM par RT-PCR en temps réel	95

Formation diplômante acquise

« Expérimentation Animale de niveau 1 » Oniris, École Vétérinaire de Nantes

Participation à la conception d'un projet Européen

FP7-NMP-2012-LARGE-6 « SmartOsseo » : Projet de développement de matrices composites 3D contenant des nanofibres polymériques et des phosphates de calcium biphasique (BCP) pour la régénération ostéo-articulaire et maxillo-faciale. Malgré que l'appel à projet n'ait pas abouti sur la sélection du projet SmartOsseo, ce dernier sera de nouveau soumis ultérieurement.

Liste des articles corrigés en tant que « reviewer »

- “*Visco-elastic and biological performance of low modulus, reactive calcium-phosphate – filled, degradable, polymeric bone adhesives*”, manuscrit réf. AB-11-529, Acta Biomateriala.
- “*Supercritical CO2 fluid foaming of polymers to increase porosity: a method to improve the mechanical and biocompatibility characteristics for use as a potential alternative to allograft in impaction bone grafting?*”, manuscrit réf. AB-11-1579, Acta Biomateriala.

LISTE DES PUBLICATIONS DES TRAVAUX MENÉS DURANT CE DOCTORAT

1. “*Gene activated matrices for bone and cartilage regeneration in arthritis*”
C. Plank, D. Eglin, N. Fahy, C.Sapet, P.Borget, G. Van Osch, C. Gentili,
T. Miramond, K. Zöller, M. Anton
European Journal of Nanomedicine, 4(1): 17-32, 2012
2. “*Calcium phosphate derived biomaterials*”
G. Daculsi, **T. Miramond**
In: Encyclopedia of Biophysics (Roberts, GCK, ed.), 2012
3. “*In vivo Comparative study of two injectable/moldable Calcium phosphate Bioceramics*”
T. Miramond, E. Aguado, E. Goyenvalle, P. Borget, S. Baroth, G. Daculsi
Key Engineering Materials, 529-530: 291-295, 2013
4. “*Composite bioceramics/polymer electrospun scaffolds for regenerative medicine*”
T. Miramond, P. Borget, C.Colombeix, S. Baroth, and G. Daculsi
Key Engineering Materials, 529-530: 441-446, 2013
5. “*Bioceramic properties and choice of biological agents for osteoinduction: a critical preclinical study in a nude mouse model*”
T. Miramond, P. Corre, S.Baroth, F.Moreau, G. Daculsi, P. Weiss
European Journal of Cells and Materials (soumis)
6. “*Hollow Shells Development and Characterisation for cells carrying purpose*”
T. Miramond, S. Baroth, C. Colombeix, P. Borget, F. Moreau, B. Fellah, G. Daculsi
Biomaterials (soumis)
7. “*Calcium Phosphate Bioceramic scaffold for bone tissue engineering*”
G.Daculsi, **T.Miramond**, P.Borget, S.Baroth
Key Engineering Materials, 529-530: 19-23, 2013

LISTE DES PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS

- National (présentation orale): Recherche en Imagerie et Technologies pour la santé (RITS), Rennes, France, 6-8 avril 2011 : *“Développement et caractérisation de matrices biocéramiques pour l’ingénierie tissulaire osseuse”*
- International (présentation orale) : European Society of Biomaterials (ESB), Dublin, Irlande, 4-9 Septembre 2011: *“Smart bioceramic granules development and characterization for bone tissue engineering”*
- International (poster et présentation orale): Bioceramics, Fukuoka, Japon, 21-24 Octobre 2012 :

Présentation orale: *“In vivo Comparative study of two injectable/moldable calcium phosphate bioceramics”*

Poster: *“Composite bioceramics/polymer electrospun scaffolds for regenerative medicine”*

ENCADREMENT

Stage de Master 1 de Jérémy Brugière (Université Lyon 1 Claude Bernard) de 4 mois du 15/04/12 au 05/09/12.

Sujet : « *Synthèse et caractérisation de matrices composites pour substituts osseux* »

Chapitre 1

Les matrices phosphocalciques biphasées

*Développement de matrices céramiques et composites pour
l'ingénierie tissulaire osseuse*

Chapitre 1, les grandes lignes :

Ce premier chapitre constitue un état des connaissances actuelles concernant les biomatériaux en céramiques de phosphate de calcium, agrémenté d'une étude comparative de produits caractéristiques actuellement sur le marché.

1.1. Les besoins cliniques d'une alternative à l'autogreffe

Les défauts osseux d'origine traumatique ou résultants de maladies dégénératives, telle l'ostéoporose* ou encore oncologiques*, comme l'ostéosarcome*, impliquent une réponse clinique appropriée tant en terme chirurgical, de sécurité immunologique et d'indolence post-opératoire pour les patients. Les cas cliniques nécessitant l'implantation de dispositifs médicaux*, dont les biomatériaux* font partis, sont en constante croissance dû à l'augmentation de la prévalence de ces maladies, notamment par l'effet de vieillissement de la population. Les pathologies osseuses sont ainsi les plus prégnantes en milieu de vie (25-60ans) et arrivent en seconde position après 60 ans juste derrière les problèmes cardiovasculaires (Danet 2011). Ainsi les principaux domaines cliniques impliqués sont l'orthopédie, le maxillo-facial, l'ORL et la neurochirurgie.

Lorsque l'autogreffe* ne rencontre pas l'obstacle de la quantité disponible, de la faisabilité chirurgicale et de la morbidité* liée au prélèvement, elle reste toujours aujourd'hui la solution de référence (Stevens *et al.* 2008). L'autogreffe possédant en effet un potentiel ostéogénique grâce à la préservation de cellules vivantes et d'agents bioactifs (enzymes, protéines...) du patient prélevé sans risque pour le système immunitaire (Laurie *et al.* 1984). L'allogreffe* et la xéno greffe* possèdent quant à elles souvent les mêmes avantages que l'autogreffe en termes de sauvegarde des propriétés structurelles natives (architecture poreuse, propriétés mécaniques) mais sans la sauvegarde des caractères biologiquement actifs (cellules, facteurs de croissance) et en ajoutant les problèmes majeurs de rejets immunitaires ainsi que les risques de transmissions virales (prions...) ou bactériennes inhérents à ce type de greffes (Burwell 1985). Cependant les besoins de limiter les interventions chirurgicales invasives parfois longues et douloureuses et d'éviter les risques de contamination ou de rejet prévalent souvent sur l'utilisation de la méthode standard du greffon osseux au profit des greffes alloplastiques* issues de l'ingénierie des biomatériaux (Stevens 2008).

C'est dans cette optique, s'appuyant sur les cahiers des charges imposés par les besoins cliniques, que les scientifiques et ingénieurs ont développé depuis la fin des années 1980, un pan prometteur à la croisée des sciences des matériaux, de la biologie et de la médecine qui portera le nom de médecine régénérative (Petit-Zeman 2001). Cette dernière incluant à la fois le domaine de l'ingénierie tissulaire* et celui de la thérapie génique* dont nous développerons plus avant les principes fondamentaux au travers des études réalisées respectivement au cours de ce premier chapitre et au début du second chapitre à l'occasion de la présentation des deux projets européens ayant partiellement financés ces travaux de thèse, à savoir le projet REBORNE et le projet GAMBA.

Les principales spécificités de ces différentes stratégies d'implantation sont tabulées ci-dessous au regard des enjeux de la régénération osseuse que sont l'ostéoconduction*, l'ostéoinduction* et l'ostéogénèse* (Tableau 1). Ces notions posent les fondements des stratégies de la médecine régénérative. Ainsi le potentiel ostéoconducteur désigne de façon consensuelle la capacité d'un implant, et *a fortiori* d'un biomatériau, à supporter l'adhésion et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices* (Albrektsson et Johansson 2001).

L'ostéoinduction est quant à elle une notion dont la description des effets est largement admise, c'est-à-dire la capacité d'un implant à recruter spécifiquement et promouvoir la différenciation* des cellules ostéoprogénitrices en cellules osseuses, mais dont les causes et les prérequis prêtent encore aujourd'hui à discussions (Lohmann *et al.* 2001). Cette dernière notion fait d'ailleurs l'objet du dernier chapitre de ce manuscrit dans le contexte d'étude *in vivo* et sera l'opportunité d'approfondir le sujet. Enfin le potentiel ostéogénique est en quelque sorte une synergie des deux précédents puisqu'il implique que la régénération osseuse soit initiée et perdue grâce aux cellules adhérentes aux matrices par les mécanismes justement précités de l'ostéoconduction et de l'ostéoinduction (Goshima *et al.* 1991).

	<i>Potentiel Ostéoconducteur</i>	<i>Potentiel Ostéoinducteur</i>	<i>Potentiel Ostéogénique</i>	<i>Potentiel thérapeutique</i>	<i>Risque de contaminations bactériennes ou virales</i>
Autogreffe	+	+	+	-	-
Allogreffe	+	+/-	-	-	+
Xéno greffe	+	-	-	-	+
Greffe alloplastique avec biomatériaux seuls	+	+/-	-	-	+
Greffe alloplastique issue de l'ingénierie tissulaire	+	+/-	+	-	+
Greffe alloplastique issue la thérapie génique	+	+/-	+	+	+

Tableau 1 : Les différents implants, l'indication +/- révèle la grande dispersité des propriétés des biomatériaux et des conditions d'implantations. Adapté d'après (Klokkevold et Jovanovic 2001)

Ces trois mécanismes (ostéoconduction, ostéoinduction, ostéogénèse) régissant finalement la qualité et la durabilité de l'ostéointégration*, concept dont les définitions ont évolué depuis sa première utilisation dans les années 1970 (Hench *et al.* 1971; Jarcho *et al.* 1977) en fonction des influences des différents acteurs du domaine (implantologistes, histologistes, scientifiques) (Boix 2003). Parmi les définitions plus ou moins équivalentes ainsi proposées, celle de Steinemann (Steinemann *et al.* 1985) a le mérite d'être concise : « l'ostéointégration est une connexion os/implant ayant la capacité de résister à des efforts de cisaillement et de traction », soulignant la cohésion mécanique de l'ensemble. Cette notion désigne non plus juste l'implant mais le complexe hybride [implant partiellement résorbé/os néoformé et néo-vascularisé] impliquant une anastomose* entre ce complexe et le tissu natif par le fait de création de liaisons intimes aussi bien au niveau chimique par liaisons atomiques que physique par l'invasion angiogénique* ou l'interpénétration entre tissus natifs et tissus néoformés notamment par l'intermédiaire de la matrice extracellulaire* (MEC) (Albrektsson *et al.* 1986; Zarb 1989).

L'éventail des catégories de matériaux susceptibles d'être exploités à ces fins est large puisqu'il revêt les quatre grandes familles de matériaux que sont les céramiques, les métaux, les polymères et les composites. L'ingénierie des biomatériaux dispose ainsi d'un panel de possibilités pléthoriques pour satisfaire les besoins de la médecine régénérative comme en témoigne la liste des biomatériaux et de formulations galéniques répertoriés de façon non-exhaustive sur la figure ci-dessous en fonction de leurs possibles applications.

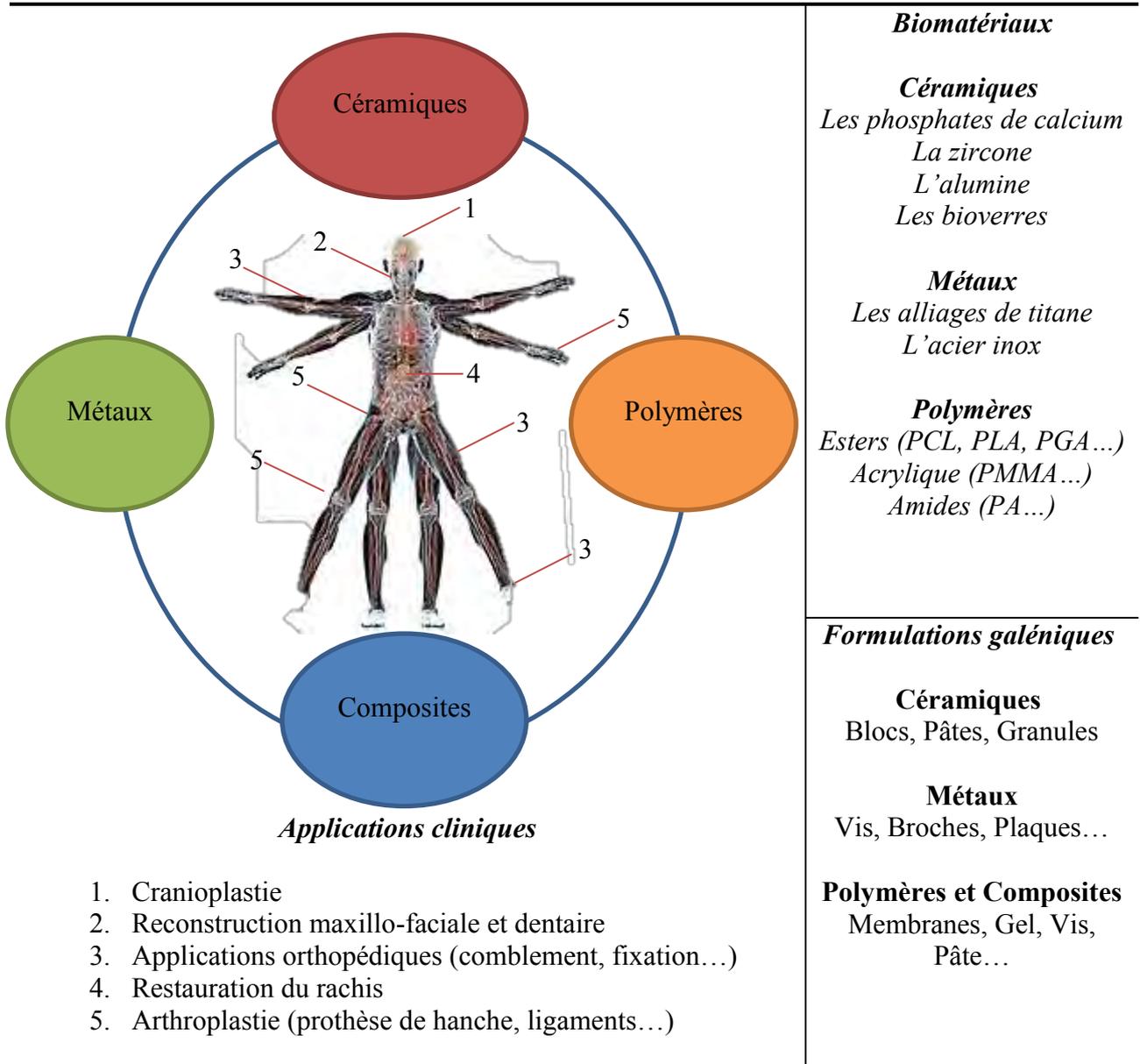


Figure 1 : Principales applications des biomatériaux

Le domaine de la mise au point de ces biomatériaux est en pleine effervescence, de nombreuses voies de synthèse font actuellement l'objet de recherches notamment de plus en plus pour les composites qui en combinant les avantages de chaque type de matériaux parviennent à créer des propriétés innovantes très prometteuses, on peut citer par exemple les méthodes sol-gel, la lithographie, l'électrospinning ou encore le prototypage rapide (Lam *et al.* 2002).

Des exigences spécifiques sont nécessaires pour parvenir à l'ostéointégration, de cette manière les matrices destinées à l'ingénierie tissulaire devraient (Stevens et George 2005) :

- être tridimensionnelle, avec des pores interconnectés pour soutenir la fixation des cellules ainsi que leur prolifération et permettre une néo-vascularisation.
- avoir une intégrité structurelle suffisante correspondant aux propriétés mécaniques du tissu natif.
- posséder une distribution de taille des pores adéquat pour le transport des nutriments et des déchets en profondeur de l'implant.
- Offrir un microenvironnement idéal pour qu'ils puissent fonctionner comme une matrice extra-cellulaire artificielle (mec) sur lequel les cellules se basent pour former de nouveaux tissus.
- ne pas être cytotoxiques*, immunogènes*, cancérogènes ou libérer des résidus toxiques
- être biodégradables avec une cinétique de résorption appropriée de manière à permettre le remplacement progressif par un nouveau tissu. En outre la biodégradabilité des biomatériaux permet d'éviter une deuxième intervention chirurgicale pour le retirer après plusieurs années comme cela peut-être le cas par exemple avec les prothèses totales de hanche.

Les besoins en biomatériaux de substitutions vont ainsi croissant comme les données nationales de l'INSEE le montrent (Figure 2).

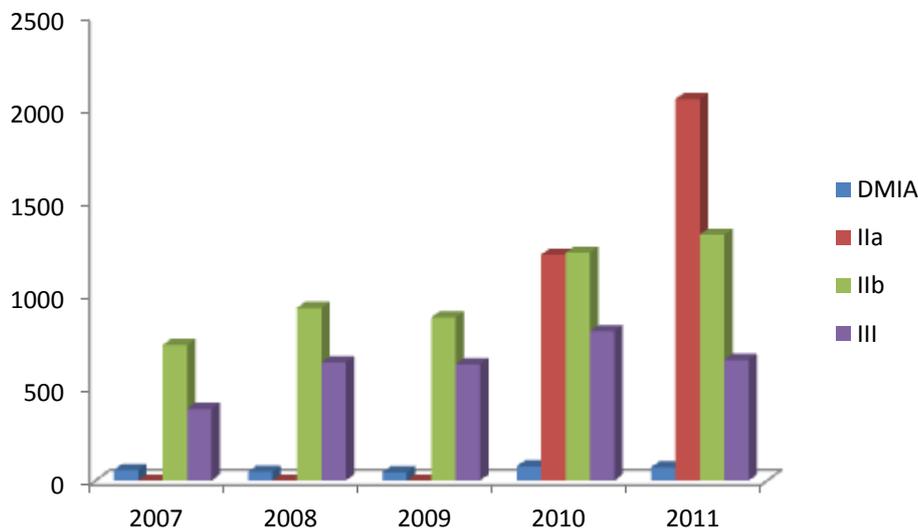


Figure 2 : Nombre de DM mis sur le marché, adapté de (MedMarket_Diligence 2006)

Cependant les législations étant régulièrement mises à jour concernant ce domaine récemment introduit en clinique, imposent une réactivité des entreprises pour s'adapter aux nouvelles réglementations en faveur de la sécurité des patients afin d'obtenir les autorisations de mise sur le marché (dont le marquage CE). Notamment les nomenclatures françaises accordées aux dispositions européennes établissent que ces dispositifs médicaux implantables soient

considérés de classe III, c'est-à-dire de plus haut niveau de risque potentiel (Tableau 2) afin d'assurer un optimum de garantie aux patients.

<i>Classe I</i>	<i>dispositifs médicaux non invasifs ou invasifs mais à usage temporaire</i>
<i>Classe IIa</i>	<i>dispositifs médicaux invasifs à court terme et ceux à long terme de la sphère oro-pharyngée</i>
<i>Classe IIb</i>	<i>dispositifs médicaux invasifs à long terme autres que la sphère oropharyngée</i>
Classe III (biomatériaux)	dispositifs médicaux invasifs à long terme en contact avec le cœur, le système circulatoire et nerveux

Tableau 2 : Classification des dispositifs médicaux implantables. La dangerosité est croissante de I à III

Ceci explique partiellement le nombre stagnant de déclaration de mise sur le marché de dispositifs médicaux de classe III en France (Figure 2) contrairement aux dispositifs de classe IIa et IIb qui voient leur croissance en forte augmentation car les coûts de développement vis-à-vis de ces réglementations sont moins contraignants. L'essentiel des implantations des dispositifs médicaux invasifs se font aux États-Unis (50%) et en Europe (25%), c'est-à-dire les pays dits occidentaux (Figure 3), les produits proposés ayant une forte valeur ajoutée et des coûts cliniques conséquents. La norme internationale ISO concernant l'évaluation biologique des dispositifs médicaux est la norme 10-993 tandis que celle régissant l'utilisation combinée de dispositifs médicaux implantables et de cellules vivantes pour l'ingénierie tissulaire ou la thérapie génique correspond à la norme 13-022 (annexe 1).

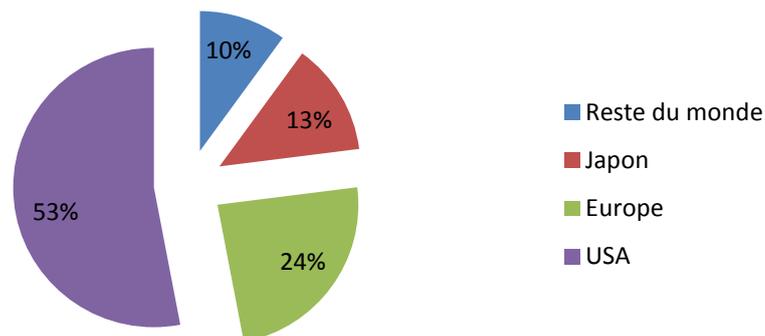


Figure 3 : Répartition géographique des DM implantables, adapté de (MedMarket_Diligence 2006)

Les nombreuses avancées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, et spécialement de la peau, l'os et le cartilage ces dernières années impliquent la création de nombreuses entreprises et de produits novateurs. Il existe ainsi plus de 250 entreprises aux États-Unis, en Europe et en Asie de l'Est dédiées à la médecine régénérative répondant aux besoins d'un marché grandissant dont les perspectives à 2014 sont estimées à plus de 65 milliards de dollars contre 25 milliards en 2008 (Markets and Markets 2011).

Les 20 principaux fabricants d'Europe spécialisés dans les substituts osseux apparaissent dans le tableau ci-dessous dans l'ordre alphabétique :

<p>ApaTech, Ltd Argomedical AG Artoss GmbH Biocomposites Ltd Biomatlante SA Bonesupport AB Cam biocéramiques bv Curasan AG Dot GmbH Graftys JRI Limitée Kasios Kuros Biosurgery AG Mathys AG Bettlach PAA Implantate AG Progentix Orthobiologie BV Scientx Groupe SAS Scil Technology GmbH Signus Medizintechnik GmbH Teknimed</p>
--

Tableau 3 : Liste des 20 principaux fabricants de substituts osseux d'Europe (Research_Facts_Ltd 2010)

Tous ces facteurs réunis (large panel de matériaux disponibles, avancées technologiques, investissements industriels) permettent à la science des biomatériaux de se rapprocher le plus possible du biomatériau idéal, qui ne consiste pas en une simple substitution mais réside bien dans le biomimétisme (Pilliar *et al.* 2001) dans notre cas vis-à-vis de l'os.

1.2. L'approche biomimétique des phosphates de calcium

Les organes vivants, dont l'os, sont des systèmes complexes et l'approche biomimétique doit prendre en compte les multiples dimensions qu'ils évoquent afin de développer des matrices synthétiques intelligentes, c'est-à-dire adaptées spécifiquement à l'application à laquelle elles sont vouées.

Tout d'abord il y a la dimension relative à la science des matériaux incluant la proximité avec la composition chimique de l'os et ses propriétés physiques de surfaces ou mécaniques. Il y a également l'architecture tridimensionnelle de l'os qui est fortement poreuse avec des travées anastomosées en ce qui concerne l'os trabéculaire par exemple. Ces critères relèvent de l'ingénierie des biomatériaux.

Ensuite la dimension relative à la biologie, qui se focalise sur l'interaction dans le temps entre le biomatériau et l'environnement hôte tant au niveau local que systémique.

Enfin la dimension médicale et chirurgicale bien sûr qui doit considérer l'objectif finale à accomplir et faciliter sa mise en œuvre tout en diminuant les risques pour les patients.

Un biomatériau répondant favorablement aux interrogations préalablement soulevées par ces trois dimensions factuelles, peut alors être candidat pour devenir une matrice dite alors intelligente dédiée à la médecine régénérative (Furth *et al.* 2007).

Le tissu osseux

La connaissance des propriétés physico-chimique de l'os est donc primordiale pour la pertinence de l'approche biomimétique. La composition chimique de l'os est ainsi partagée entre la partie minérale (~70%) et la partie organique (~30%) (Figure 4). La principale phase inorganique est apatitique*, constituée de nanocristaux d'hydroxyapatite de morphologie plaquettaire, de longueur 50 à 70nm, de largeur 25nm et d'épaisseur de 1 à 4nm (Bocciarelli 1970; Eppell *et al.* 2001; Rey *et al.* 2009) dispersés au sein de la matrice extracellulaire collagénique (Barrere *et al.* 2008).

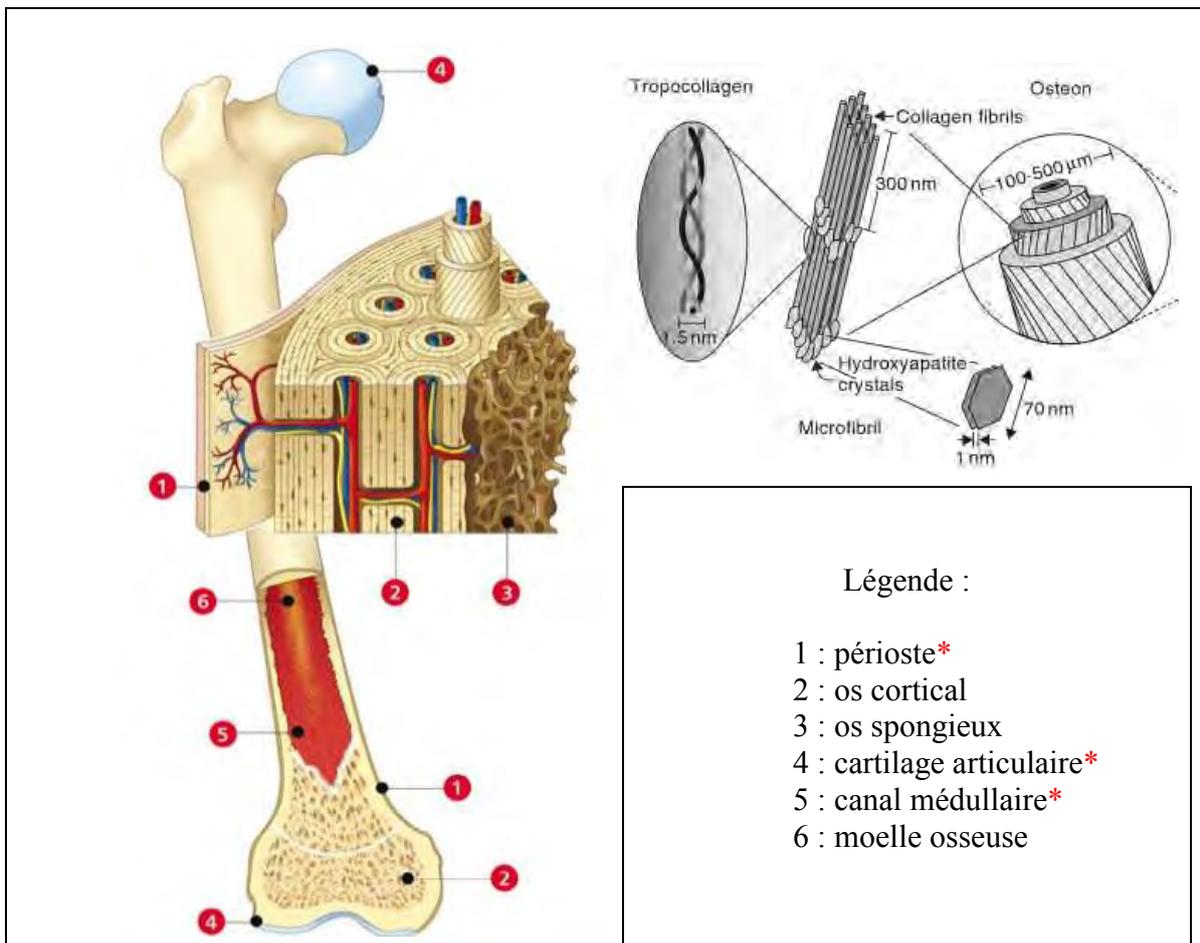


Figure 4 : Complexité de l'os (Brittberg *et al.* 1997) (site web www.lecorpshumain.fr)

Le tissu osseux naturel est ainsi assimilable à un matériau composite constitué d'une matrice organique de biopolymères* (le collagène essentiellement) et d'une matrice minérale (apatitique essentiellement) comme indiqué sur la figure ci-dessous.

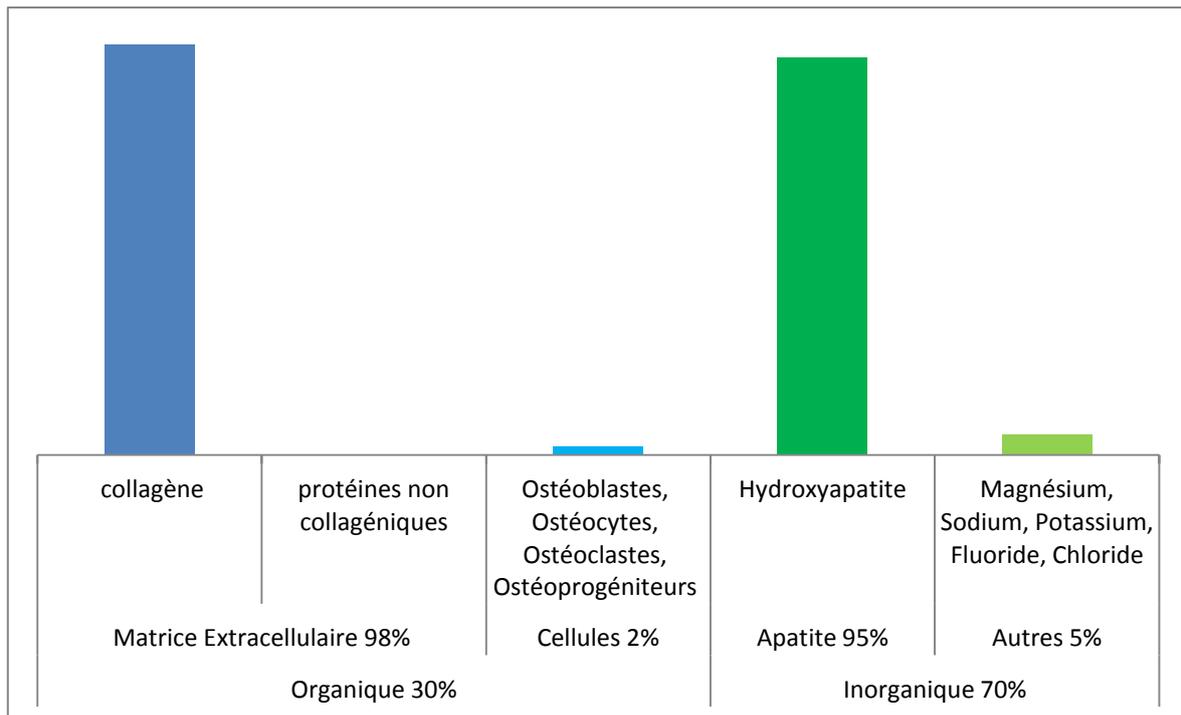


Figure 5 : Composition moyenne de l'os (Glimcher 2006)

Les tissus osseux ont des fonctions à la fois (Burger et Klein-Nulend 1999):

- mécaniques de soutien et de protection
- métaboliques de participation à la régulation de la calcémie*
- hématopoïétiques : les espaces médullaires* des os contiennent la moelle osseuse à l'origine des lignées de cellules sanguines.

La composante cellulaire des os (~2%) est responsable de la dynamique de création et de résorption des os appelé remodelage osseux (Manolagas et Jilka 1995), elle comprend :

- les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice ostéoïde collagénique et de sa minéralisation. Ils délimitent le tissu osseux en association avec les cellules bordantes et sont destinés à se différencier en ostéocytes.
- les ostéocytes sont les cellules osseuses matures, entièrement entourées par une matrice osseuse minéralisée, ils conservent des fonctions métaboliques dans les phénomènes d'échange calcique mais ils ne synthétisent plus de collagène.
- les cellules bordantes tapissent la surface de l'os et ne rentrent pas directement dans l'activité du remodelage osseux mais peuvent être redifférenciées en ostéoblastes sous stimuli.
- les ostéoclastes sont les cellules en charge de la résorption de l'os dans le cadre du processus du remodelage osseux

Les 3 premières dérivent de la même cellule ostéoprogénitrice : les pré-ostéoblastes. Les ostéoclastes dérivent quant à eux de progéniteurs hématopoïétiques (Mikuni-Takagaki 1999). Ce mécanisme de remodelage se déroule suivant 5 étapes de remaniement (Figure 6):

- une phase d'activation
- une phase de résorption du tissu osseux

- une phase d'inversion*
- une phase de formation du tissu osseux
- une phase de quiescence*

Il s'agit donc d'un équilibre entre ostéoclasie et synthèse ostéoblastique qui ne perdure pas avec le temps, l'âge engendrant des dysfonctionnements induisant des pathologies comme l'ostéoporose. Les enjeux ne seront pas les mêmes en fonction du site osseux à réparer, chaque site ayant une dynamique de remodelage spécifique, on sait par exemple que le renouvellement intervient à hauteur de 25% par an du tissu trabéculaire alors qu'il est inférieur à 5% par an pour le tissu osseux cortical (Weiner et Wagner 1998).

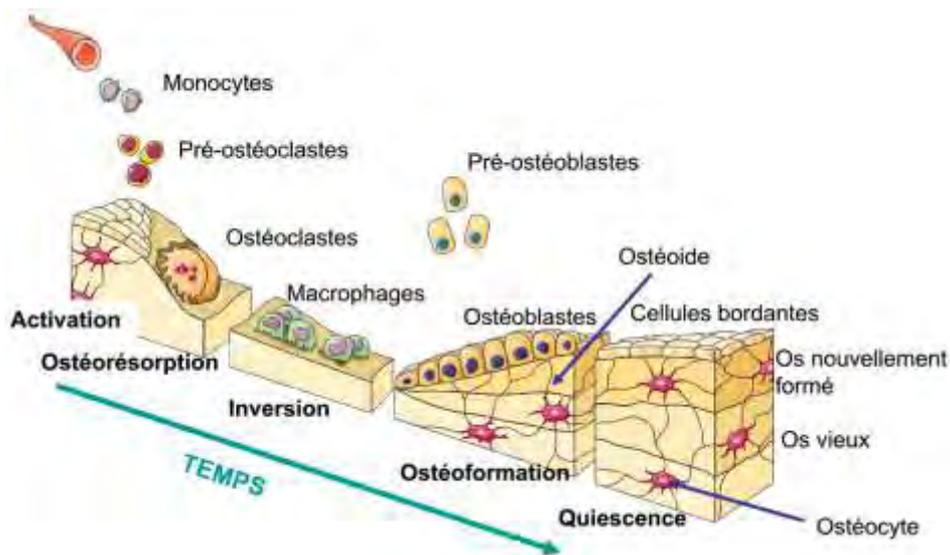


Figure 6 : Principe général du remaniement osseux (Baron 1977)

Les phosphates de calcium biphasés

Dès les années 1920, la mise au point de la technologie de la diffraction X a permis de démontrer la proximité de la nature cristallographique des éléments inorganiques de l'os avec les minerais de phosphates de calcium (Albee 1920; De Jong 1926).

Parmi la grande famille des phosphates de calcium (Tableau 4), les phases cristallines d'intérêt pour la repousse osseuse sont naturellement l'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, dont nous avons vu l'importance ci-dessus dans la composition de l'os, mais également le bêta-tricalcium phosphate (β -TCP), appelé à l'état naturel whitlockite, de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6$.

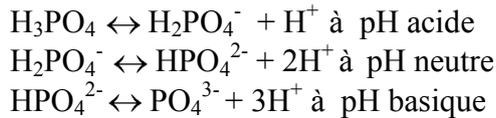
Ca/P ratio	Dénomination chimique	Acronyme	Formule	Solubilité à 25°C, Ks	Température de stabilité * ²
0.5	Monocalcium phosphate anhydre	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	~10 ⁻¹	Basse
	Monocalcium phosphate monohydrate	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O	~10 ⁻¹	Basse
1.0	Dicalcium phosphate anhydre (monetite)	DCPA	CaHPO ₄	~10 ⁻⁷	Moyenne
	Dicalcium phosphate dihydrate (brushite)	DCPD	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	~10 ⁻⁷	Basse
1.33	Triclinic octacalcium phosphate	OCPt	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , 5H ₂ O	~10 ⁻¹⁰⁰	Basse
	Octacalcium phosphate amorphe	OCPam	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , nH ₂ O	* ¹	Basse
1.5	α or α' tricalcium phosphate	α-TCP	Ca ₃ (PO ₄) ₂	~10 ⁻²⁵	Haute
	β tricalcium phosphate	β-TCP	Ca₃(PO₄)₂	~10⁻³⁰	Moyenne
	Tricalcium phosphate amorphe	TCPam	Ca ₃ (PO ₄) ₂ , nH ₂ O	* ¹	Basse
1.5-1.67	Calcium Deficient Hydroxyapatite	CDA ou CDHA	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0<x<1)	~10 ⁻⁸⁵	Basse
1.67	Hydroxyapatite or Hydroxylapatite	HA ou HAp ou OHAp	Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂	~10⁻¹²⁰	Haute
	Oxyapatite	OA ou OAp	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	~10 ⁻⁷⁰	Haute
	Fluoroapatite	FA ou FAp	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	~10 ⁻¹²⁰	Haute
2.0	Tetracalcium phosphate (Hilgenstockite)	TTCP Or TetCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	~10 ⁻⁴⁰	Haute

Tableau 4 : Différents calcium orthophosphates, adapté et modifié de (Dorozhkin 2010) *¹ Solubilité du phosphate de calcium amorphe ne peut être déterminée mais sa constante de solubilité Ks est comprise entre ~10⁻²⁵ et 10⁻³⁵ / *² Haute > 1100°; Moyenne jusqu'à 1100°C; Basse < 800°C

Dès le début des années 1980, des biomatériaux de substitution à base soit de HA soit de β-TCP ont été mis à disposition pour application cliniques (De Groot 1983).

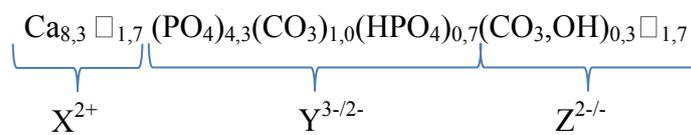
L'approche biomimétique visant à reproduire à la fois l'architecture poreuse de l'os spongieux et se rapprocher de ses propriétés physico-chimique par frittage à haute température de phosphates de calcium biphasiques (BCP), contenant à la fois du HA et β-TCP, constitue le point d'ancrage des travaux menés par Guy Daculsi au sein du LIOAD depuis la fin des années 1980 en corrélation avec les travaux d'autres laboratoires internationaux dont celui de Racquel Legeros (*Department of biomaterials and biomimetics, New York University*) (LeGeros *et al.* 2003; Daculsi *et al.* 2009)

Ces deux phases font plus précisément partie des orthophosphates de calcium, c'est-à-dire des sels de l'acide phosphorique (H₃PO₄), dont voici les équations d'équilibre ci-dessous :



Équation 1 : Équilibre chimique des sels d'acide phosphorique

Le facteur discriminant la formation des molécules minérales ioniques (PO_4^{3-}) tétraédriques, où les sommets sont occupés par des atomes d'oxygène et le centre par un atome de phosphore, est donc le pH (Dorozhkin 2002). Le pH des environnements des os et des dents étant soit neutre soit légèrement basique (Arnett 2008), les ions en présence des os sont soit HPO_4^{2-} soit PO_4^{3-} . Les os ne sont en effet pas constitués d'HA stœchiométrique mais plutôt d'apatite déficiente en calcium comprenant de nombreuses solutions solides (Driessens 1980) dont une représentation possible est proposée ci-dessous (Legros 1984):



X : cation divalent

Y : anion trivalent ou divalent

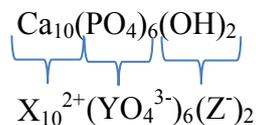
Z : anion monovalent ou divalent

□ correspond aux lacunes cationiques et anioniques dues aux substitutions ioniques

Cependant la composition de l'os change en fonction de chaque individu et est dépendant de l'âge (Renier et Audran 1989), les données présentées pour l'os ne peuvent en aucun cas être des valeurs absolues.

L'apatite biologique a ainsi une habilité connue (Rangavittal *et al.* 2000) à incorporer des ions dans ses mailles, tels $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-/\text{F}^-$, influençant ses propriétés de solubilité, de réactivité de surface et même de morphologie par contraction ou expansion des paramètres de mailles (Pietak *et al.* 2007).

En comparaison avec l'apatite biologique voici la formule de l'hydroxyapatite stœchiométrique :



Il apparait ainsi ci-dessus la formule générale des apatites, $\text{X}_{10}(\text{YO}_4)_6\text{Z}_2$, à laquelle appartient l'hydroxyapatite. Pour l'anecdote c'est en 1804 que fut donné le nom apatite à ce type de minéral car sa signification en grec est « tromper » indiquant le fait que ces minerais peuvent facilement être confondus visuellement avec des pierres précieuses telles que l'aigue-marine ou la tourmaline. L'hydroxyapatite (HA), est aujourd'hui la référence reconnue en termes de support d'ostéoconduction dû aux similitudes exposées ci-dessus avec la partie minéralisée des os (Kannan *et al.* 2007).

Les apatites et en particulier l'hydroxyapatite cristallisent dans le système hexagonale (groupe d'espace $\text{P6}_{3/m}$) tandis que le β -TCP dans le système rhomboédrique (groupe d'espace

R3_c) mais ses paramètres de maille peuvent être décrits dans le système hexagonal (Figure 7 et Figure 8) (Dickens *et al.* 1974).

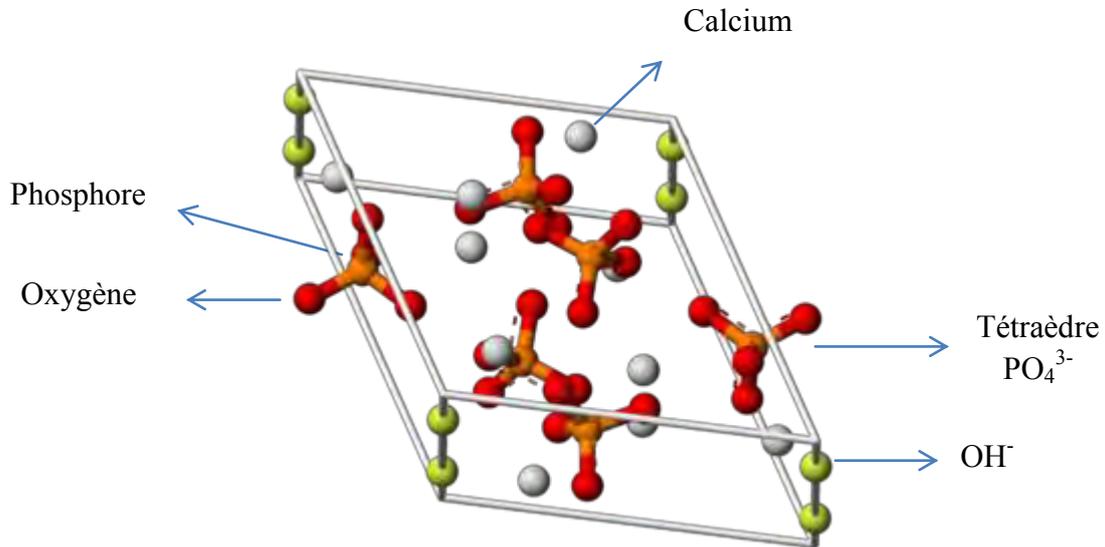


Figure 7 : Unité de la maille cristalline de l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

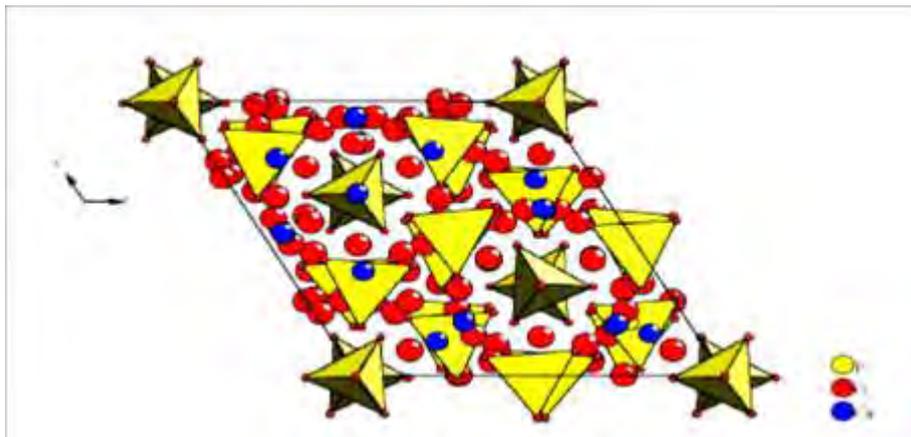
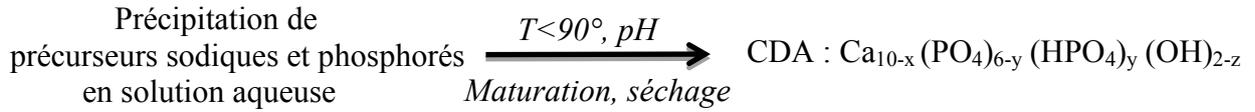


Figure 8 : β -TCP, $Ca_3(PO_4)_2$ (Schmitt 2000)

L'HA et le β -TCP étant des minerais très rares à l'état naturel, les méthodes de synthèses chimiques de ces derniers ont donc été privilégiées. Elles sont divisées en deux catégories, la voie sèche et la voie humide (Dorozhkin 2010).

La méthode de synthèse chimique par voie humide de phosphate de calcium est la méthode la plus commune avec comme avantage un faible coût matériel et des matières premières mais avec le désavantage d'un rendement faible (inférieur à 40 %). Celle-ci consiste à précipiter des précurseurs de calcium et de phosphate en milieu aqueux sous des conditions de pH et de température bien précise afin d'obtenir comme précurseur une apatite déficiente en calcium (CDA) sous forme pulvérulente qui sera par la suite frittée au-dessus de 800°C.

Etape de 1 : synthèse chimique par voie humide :



Etape de 2 : frittage

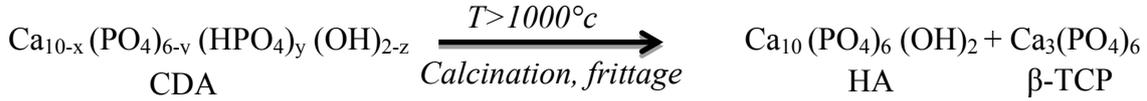


Figure 9 : Les étapes d'obtention du BCP

Cette méthode de réaction en phase aqueuse permet un mélange intime des phases cristallines parvenant à de meilleures propriétés mécaniques par rapport à la voie sèche. Cette dernière consiste à provoquer la cristallisation en phase solide à hautes températures de poudres mélangées d'HA et de β -TCP (Dorozhkin 2010).

Afin d'obtenir conjointement ces deux phases cristallines lors du processus de frittage il est primordial de se maintenir dans la fenêtre de stabilité thermique de ces deux phases et de contrôler le ratio Calcium (Ca)/Phosphore (P), comme le montre le diagramme de phase ci-dessous. L'utilisation de CDA de ratio Ca/P compris entre 1,5 (correspondant à celui du β -TCP) et 1,67 (correspondant à celui du HA).

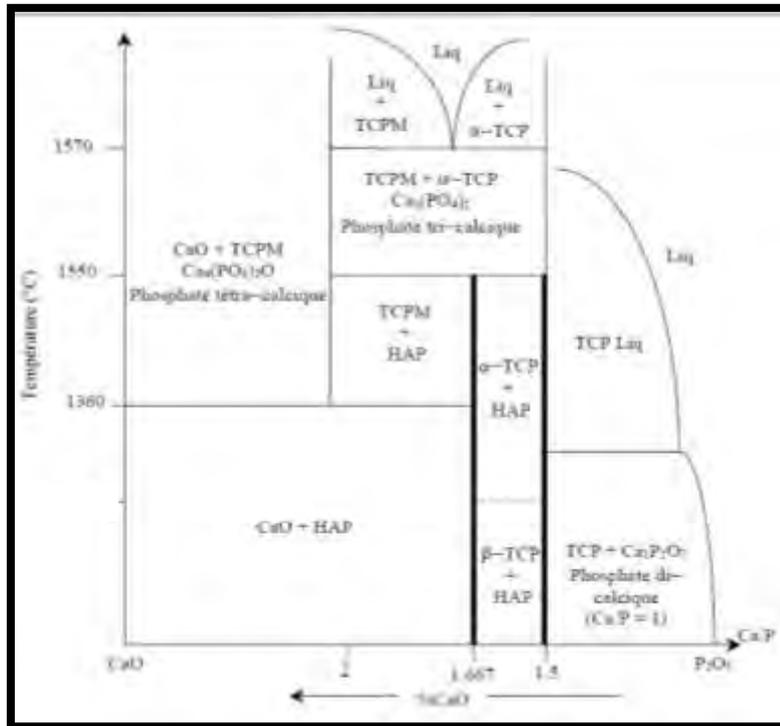


Figure 10 : Le diagramme de phase binaire CaO-P₂O₅

Dans ce diagramme de phase binaire apparaît la nécessité de maîtriser la température de frittage afin de ne pas engendrer la transformation allotropique* du β -TCP en α -TCP qui ne change pas la nature ni la composition mais l'arrangement cristallographique. Lors du frittage des BCP, il est donc important d'avoir une homogénéité de température afin de ne pas

favoriser des sites de nucléations en surface plutôt qu'au cœur des matériaux par exemple et favoriser l'apparition de phases indésirées. Le contrôle de la température est en effet primordial notamment à l'approche du transus Beta (Figure 11) car même une très légère fraction d'alpha-TCP au milieu des mailles B-TCP et HA engendre un risque de microfissuration et donc d'amorce de rupture par effet de propagation à cause notamment de la différence de densité importante entre le alpha-TCP (2,86) et le bêta-TCP (3,07) (Perera *et al.* 2010). Cette phase α -TCP est stable au-delà de 1125°C, et bien qu'elle se situe dans la gamme de ratio Ca/P entre 1,5 et 1,67 (Figure 10), elle cristallise selon un système cristallographique qui s'éloigne de plus en plus de l'hydroxyapatite, le système monoclinique, qui lui ne peut pas être décrit dans le système hexagonal comme le β -TCP et le HA. L' α -TCP n'est ainsi que très peu utilisé car il est considéré cristallographiquement plus éloigné de l'os, qu'il nécessite des températures d'obtention plus élevées et un procédé de trempe* (Merten *et al.* 2001). Bien qu'il existe des substituts osseux et quelques études *in vivo* à la faveur de l' α -TCP (Grandi *et al.* 2011), son utilisation reste minoritaire, peut-être à tort vu l'intérêt grandissant pour cette phase malgré des études contradictoires (Carrodegus et De Aza 2011).

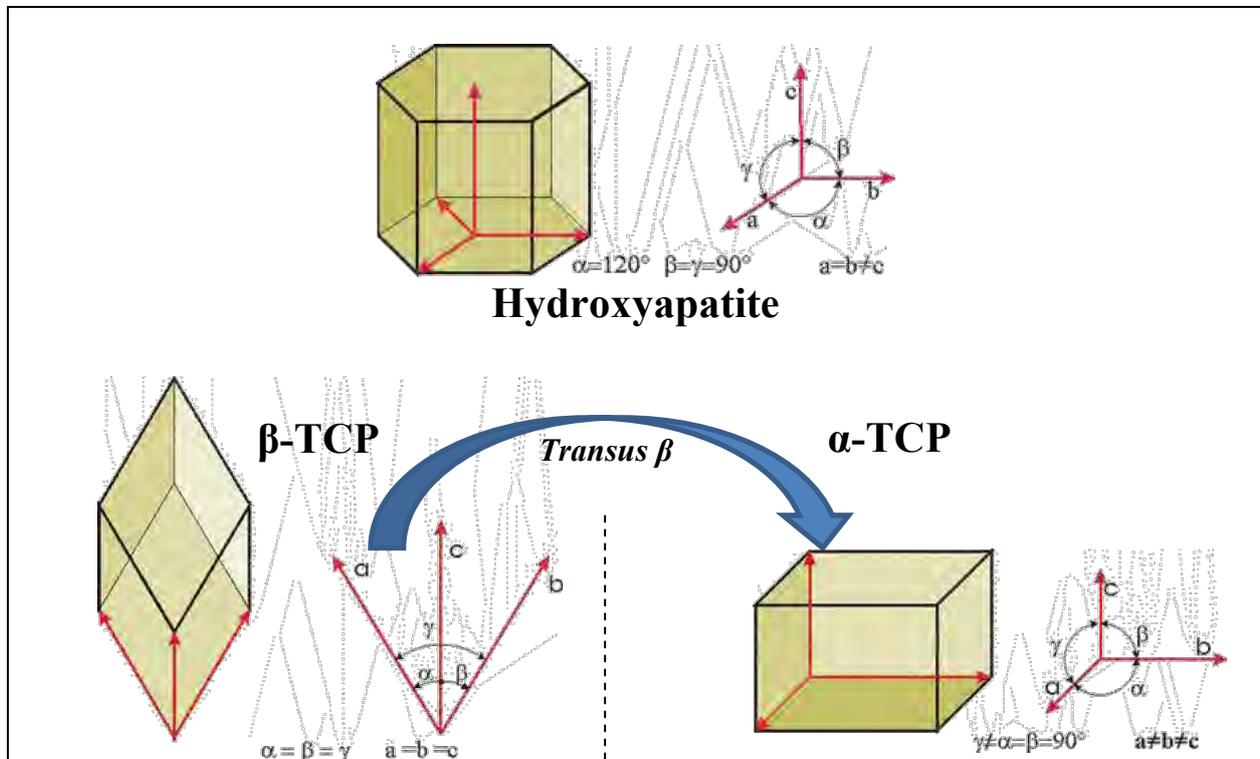


Figure 11 : Maille cristallographique de l'HA, β -TCP et α -TCP (Basu *et al.* 2009)

Finalement le tableau suivant (Tableau 5) synthétise le biomimétisme chimique et cristallographique des composants osseux du corps humain comparé avec l'hydroxyapatite stœchiométrique et le β -TCP (Montel 1977; LeGeros 1981). En effet en ne comparant que la partie minérale de la dentine, de l'émail ou de l'os, il ressort que ces derniers possèdent des paramètres de maille quasi-identique à l'HA et un ratio Ca/P situé entre celui du β -TCP et celui du HA.

Composition, %massique	Email	Dentine	Os	HA	-TCP
Calcium	36.5	35.1	34.8	39.6	29,6
Phosphorous	17.1	16.9	15.2	18.5	22,9
Ca/P ratio	1.63	1.61	1.71	1.67	1,5
Total inorganic	97	70	65	100	100
Total organic	1.5	20	25	--	--
Water	1.5	10	10	--	--
Propriétés cristallographique: paramètres de maille					
<i>a</i> -axis (Å)	9.441	9.421	9.41	9.430	10,439
<i>c</i> -axis (Å)	6.880	6.887	6.89	6.891	37, 375
crystallinité (HA=100)	70-75	33-37	33-37	100	100

Tableau 5 : Composition chimique et structurale des tissus osseux, adapté de (Dorozhkin 2002)

La nucléation des cristaux d'hydroxyapatite et de β -TCP des BCP lors du frittage menant à la croissance des cristaux apatitiques s'effectue selon un mécanisme de diffusion résultant à la formation de joints séparant des cristaux en épitaxie* dont le volume est alors démultiplié ce qui engendre une diminution de la surface spécifique des matériaux frittés à haute température (Figure 12). La morphologie globale à l'échelle nanométrique des cristaux hexagonaux d'apatites est alors transformée en morphologie sphéroïdale microscopique bien que les atomes des mailles cristallines, donc à l'échelle de l'Angström, soient toujours distribués selon le système hexagonal.

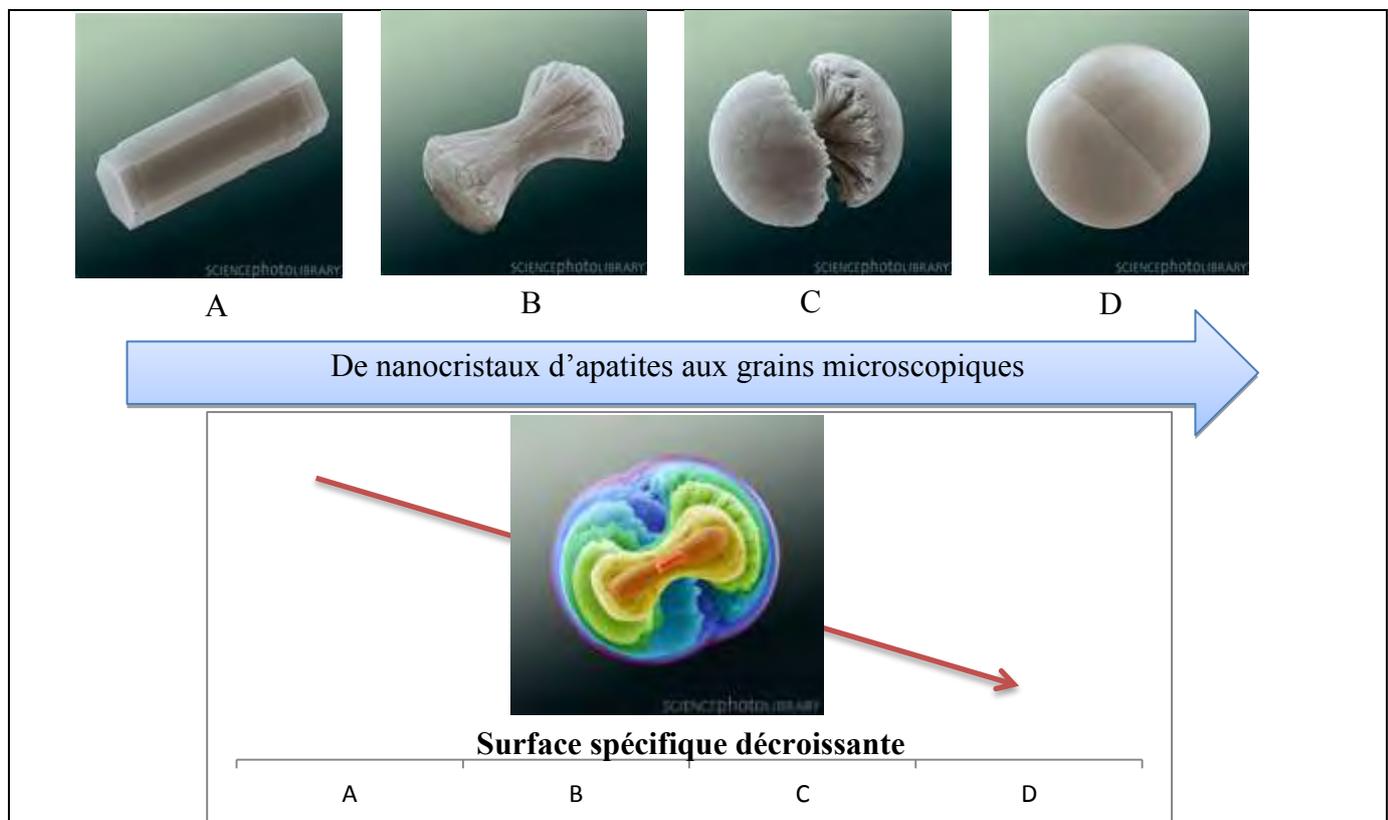


Figure 12 : Effet du frittage sur la croissance des cristaux d'HA et la diminution de leur surface spécifique, images de la base « eye of science/science photo library »

La figure ci-dessus montre le phénomène pour l'HA mais le principe reste le même avec le β -TCP, seul la morphologie initiale change (Figure 12A) mais les grains frittés ont une morphologie pseudo-sphérique équivalente à celle du HA (Figure 12D).

Ainsi lors de nos expériences nous avons pu observer la présence de cristaux d'hydroxyapatite au cœur de BCP dont la montée en température rapide ($> 10^\circ/\text{min}$), le plateau isothermique court (< 2 heures) et une descente en température rapide ($> 10^\circ/\text{min}$) n'a pas suscité la croissance de tous les cristaux (Figure 14), restant ainsi au niveau A de la figure ci-dessus. En comparaison, la morphologie de BCP frittés de façon contrôlée avec une montée en température lente de $5^\circ/\text{min}$, un plateau isotherme d'au moins 5 heures et une descente en température lente de l'ordre de $1^\circ/\text{min}$ permet l'obtention de matrices homogènes (Figure 15). Nous décrivons les propriétés de ces BCP au chapitre suivant au travers des caractérisations des produits MBCP® et MBCP+®, développés par Biomatlante SA en coopération avec l'Inserm U791 (respectivement à la fin des années 1990 et au début des années 2000) se basant sur cette méthode de frittage de CDA à haute température (Figure 13).

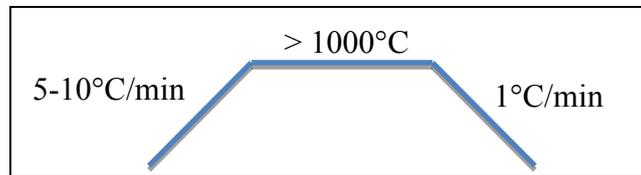


Figure 13 : Cycle de frittage classique des BCP



Figure 14 : Frittage incomplet d'un BCP 6040 réalisé au LIOAD

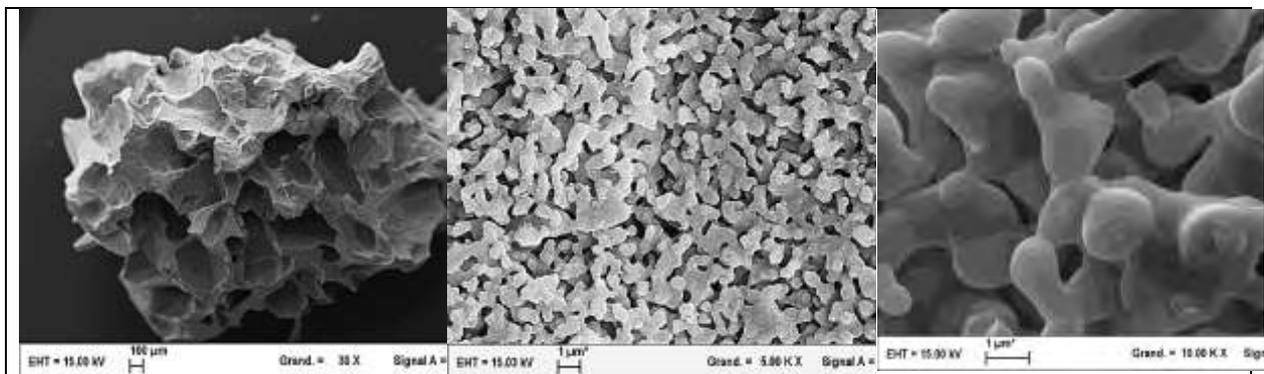


Figure 15 : Frittage complet classique d'un BCP 60/40 réalisé au LIOAD

Les cristaux d'HA et de β -TCP ainsi obtenus après frittage ne sont pas discernables au microscope électronique à balayage. C'est pourquoi nous avons utilisé deux méthodes complémentaires afin de visualiser et d'identifier chaque phase.

Étude de faisabilité sur l'identification des phases cristallines de HA et β -TCP

Matériels et Méthodes

Des granules de BCP de ratio HA/TCP 60/40 ont été synthétisés par frittage à 1050°C pendant 5heures. Des granules ont été inclut en résine époxy (Epon) avant d'être coupés en ultramicrotomie pour obtenir des lamelles de 70 nm d'épaisseur. Ces lamelles ont été déposées sur des grilles de cuivre spécifiquement adapté pour la microscopie électronique à transmission (MET) (JEM1010, JEOL). L'identification des cristaux HA et β -TCP s'est faite au moyen de la mesure du ratio calcium/phosphate (Ca/P) par spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX) (Link Isis, Oxford Instruments) couplée au MET avec une tension d'accélération de 100kV.

D'autre part, des blocs de BCP de ratio HA/TCP 60/40 ont été synthétisés par compression isostatique* et frittage à 1050°C pendant 5 heures. Ces blocs ont été inclut en résine époxy (Epon), polis sur papier abrasif à l'eau jusqu'au grade 4000, puis poli sur papier feutré avec une suspension de silice colloïdale. Les échantillons ont été métallisés au carbone avant leur analyse avec un angle de 70° par la méthode de diffusion des électrons rétrodiffusés (EBSD) couplé au MEB (Merlin, Zeiss) à 20kV.

Résultats

L'analyse par EDX des coupes d'ultra-microtomie d'un granule de BCP 6040 a permis de distinguer entre 2 cristaux leur ratio Ca/P et de les différencier. La phase HA ayant un ratio Ca/P égale à 1,67 et la phase β -TCP un ratio Ca/P égal à 1,5 (Figure 16).

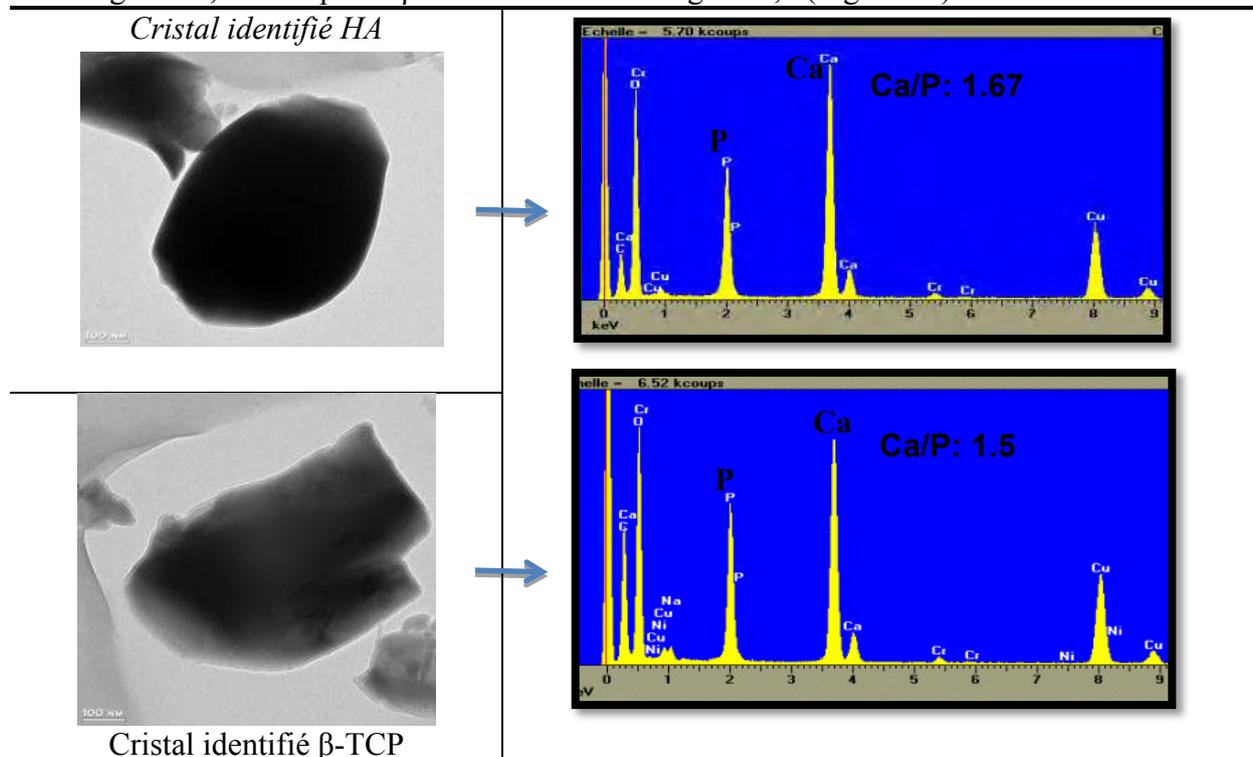


Figure 16 : Image de cristaux HA et TCP d'un BCP 6040 par MET et analyse semi-quantitative EDX

En revanche l'observation par EBSD de blocs de BCP 6040 préalablement poli à la silice colloïdale n'a pas permis d'établir de diffraction stable et continue dans l'espace afin d'établir une cartographie spatiale de distribution des cristaux de HA et de β -TCP. Seules quelques lignes de diffraction ont pu être repérées et ont permis très localement d'identifier ces phases cristallines (Figure 17). Chaque ligne représentant une direction cristallographique de plans atomiques denses correspondant soit aux arrangements de maille HA ou β -TCP (Schwartz and Kumar 2009).

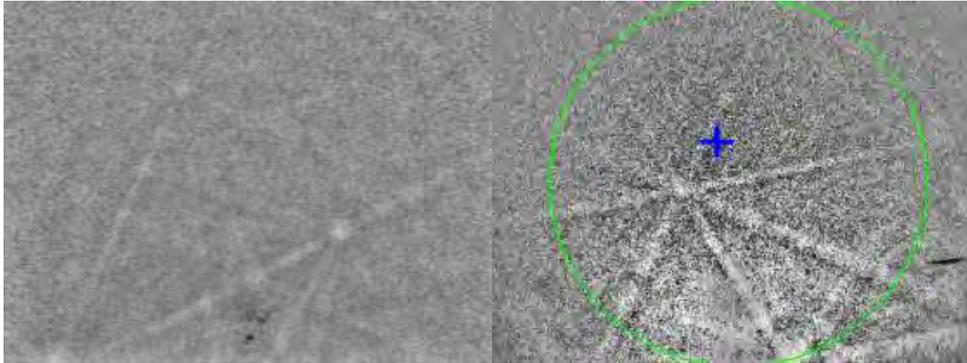


Figure 17 : Exemples de lignes de diffractions EBSD sur un bloc de BCP 6040

Discussion et conclusion sur l'étude de faisabilité

L'étude de faisabilité sur l'identification et le différenciation des phases cristallines au sein d'un même matériaux biphasé HA/TCP a permis d'une part de constater la présence de cristaux séparés HA et β -TCP par MET-EDX, dont la précision de la mesure permet de valider cette authentification. D'autre part les résultats obtenus par EBSD sont insatisfaisants mais prometteurs car bien qu'ils soulèvent la difficulté d'utiliser cette méthode de diffraction des électrons rétrodiffusés avec des céramiques non-conductrices et fortement rugueuses dû à la forte porosité de volume, les premiers clichés de diffraction obtenus démontrent qu'il est possible de visualiser les lignes de diffractions. En améliorant la préparation de la surface par un polissage plus long, en incluant des nanoparticules métalliques conductrices lors de l'inclusion en résine époxy ou encore en diminuant la porosité (et donc la rugosité) de l'échantillon. De nouveaux tests devraient permettre d'établir une cartographie de distribution spatiale et de la taille des cristaux de chaque phase HA et β -TCP au sein des mailles de BCP par cette technique de l'EBSD.

Ces propriétés physico-chimiques générales des BCP présentées dans ce paragraphe sont prises en compte dans la propriété majeure de ces derniers vis-à-vis de l'environnement osseux qui est la bioactivité.

1.3. La bioactivité des phosphates de calcium

Un biomatériau implantable en site osseux se doit d'être biocompatible*, c'est-à-dire n'induisant aucune réaction nuisible grave pour la santé. En revanche leurs effets sur les tissus hôtes permettent de les différencier en trois catégories. Certains sont ainsi biotolérés*, ce qui signifie encapsulés par un tissu fibreux les isolant du reste du tissu hôte, d'autres bioinertes*, ne provoquant aucune réaction de l'environnement biologique mais ne permettant pas une intrication chimique avec les tissus alentours, tandis que d'autres sont dits bioactifs*, c'est-à-

dire dans le cas de l'os qui nous concerne, favorisant l'ostéointégration et participant aux mécanismes de la repousse osseuse. (Osborn et Newesely 1980; Hench et Wilson 1984; Legeros et Craig 1993)

Parmi les biomatériaux classiquement décrits comme inertes, on peut citer les aciers inoxydables ainsi que le titane et ses alliages, mais également les polymères et dans la catégorie des céramiques l'alumine (Al_2O_3) et la zircone ($ZrSiO_4$). Tous ces matériaux ont une couche d'oxydation de grande stabilité à leur surface impliquant une cinétique de relargage ionique très lente, les mécanismes de diffusion étant fortement réduits au travers de cette couche de passivation* (Metikoš-Huković *et al.* 2003). Cependant de nombreuses études stipulent que modifier la surface de certains matériaux bioinertes peut les rendre bioactifs soulignant ainsi le rôle prédominant de l'interface biomatériaux-tissu biologique (Wen *et al.* 1998; Vallet-Regí et González-Calbet 2004).

En effet la notion de bioactivité est complexe et n'est pas seulement liée à la nature chimique du biomatériau, en effet les propriétés de surface, telles la topographie, l'énergie de surface* (reliée à la notion d'hydrophilicité) ou le potentiel zêta*, et les propriétés de volumes, telle la porosité, sont souvent considérés comme prédominants dans la bioactivité d'un biomatériau (Tableau 6) (Hubbell 1999; Stevens et George 2005; Dalby *et al.* 2006). L'interface cellules-biomatériau pouvant même être à lui seul un facteur de différenciation des cellules souches (Dalby *et al.* 2007).

Auteurs	Matériaux	Facteurs provoquant une bioactivité
(Ducheyne et Qiu 1999)	Couche fine de HA sur titane	Rugosité, Énergie de surface
(Brauker <i>et al.</i> 1995)	PTFE	Microtopographie
(Picha et Drake 1996) (Lossdörfer <i>et al.</i> 2004)	Titane	Micro et nanotopographie
(Sharkawy <i>et al.</i> 1997)	PVA, Acier inox	Rugosité
(Salzmann <i>et al.</i> 1997) (Bezuidenhout <i>et al.</i> 2002)	PTFE, PU	Porosité
(Van Wachem <i>et al.</i> 1987)	PMMA	Potentiel Zêta, Énergie de surface
(Lu <i>et al.</i> 2000)	Bioverres	Potentiel zêta
(Curtis <i>et al.</i> 2004)	PCL, PMMA	Nanotopographie
(Zhao <i>et al.</i> 2005)	Titane	Énergie de surface
(Hansen <i>et al.</i> 2007)	PS	Nanotopographie
(O. Gauthier 1998)	BCP	Porosité
(Biggs <i>et al.</i> 2009)	PC	Nanotopographie
(John <i>et al.</i> 2003)	BCP	Énergie de surface
(Smeets <i>et al.</i> 2009)	β -TCP	Potentiel Zêta

Tableau 6 : Quelques exemples de facteurs impliqués dans la bioactivité des biomatériaux selon les auteurs

Cette notion d'interface entre le biomatériau et l'environnement biologique hôte apparaît donc cruciale pour l'adhésion, la prolifération et la différenciation de ces cellules (LeGeros *et al.* 2008).

Les biomatériaux admis comme étant chimiquement bioactifs, c'est-à-dire n'ayant pas besoin des modifications de surfaces, sont l'hydroxyapatite, le bêta-tricalcium phosphate et les bioverres (Daculsi *et al.* 1990; Chai et Ben-Nissan 1999; Gomez-Vega *et al.* 2000; Yan *et al.* 2006). L'ostéoconduction fait partie intégrante de la bioactivité et en cela le pouvoir ostéoconducteur des BCP est largement démontré (Ellinger *et al.* 1986; Moore *et al.* 1987; Daculsi *et al.* 1989; Nery *et al.* 1990).

A ces 3 notions décrites (bioinertie, biotolérance et bioactivité), associées aux effets des biomatériaux sur l'environnement natif, viennent compléter les effets cette fois-ci du milieu hôte sur ces biomatériaux implantés. En effet le milieu hôte possède un environnement dynamique aqueux aux propriétés thermiques, chimiques et biologiques propices à la dégradation des biomatériaux (Malard *et al.* 1999). De la propension de ces derniers à résister ou non à la fois aux processus de dégradation chimiques en milieu aqueux et aux mécanismes de résorption propres aux moyens de la défense immunitaire et du remodelage osseux, que sont notamment l'action des macrophages* et des ostéoclastes*, émerge une classification complémentaire à la précédente (Tableau 7). Ainsi les biomatériaux dont l'intégrité *in vivo* ne varie pas (ou de façon négligeable) au court du temps sont dits biorésistants, tandis que ceux ayant une dégradation ionique lente et incomplète sont dits biodégradables. Enfin ceux étant après plusieurs mois ou quelques années totalement résorbés sont dits biorésorbables. Par résorption, il faut entendre assimilation totale par le métabolisme de l'organisme et/ou dispersion par les voies d'évacuation naturelles (Hollister 2005). Le tableau ci-dessous synthétise ces classifications en fonction des types de biomatériaux dont il est question (métaux, polymères ou céramiques).

Classification des biomatériaux biocompatibles basée sur leurs effets sur les tissus hôtes	
Biotolérant.	Métaux et alliages, Polymères
Bioinerte.	Alumine, Zircon
Bioactif.	Phosphate de calcium, Bioverres
Classification des biomatériaux biocompatibles basés sur l'effet des tissus hôtes sur eux	
Biodégradable.	Métaux et alliages, Polymères
Biorésistant.	Hydroxyapatite
Biorésorbable.	Phosphate tricalcique, Bioverres

Tableau 7 : Classification des interactions biomatériaux-tissus hôtes (Putlyaev et Safronova 2006)

Un facteur important concernant la bioactivité qui nous intéresse est le ratio calcium/phosphate (Ca/P) initialement mis en œuvre dans le processus de synthèse des matrices en PCa. Ce rapport détermine les phases cristallines qui seront obtenues lors du frittage à haute température comme le montre le diagramme de phase (Figure 10). Seules les phases obtenues dans l'intervalle de ratio Ca/P compris entre 1,5 et 1,67 sont considérées comme bioactives (Ducheyne et Qiu 1999; Kokubo *et al.* 2003).

L'association intime de cristaux de HA et de β -TCP au sein d'une même matrice céramique, dès lors biphasée, est considéré aujourd'hui comme une référence en terme de bioactivité car ces deux phases ont des cinétiques de relargages ioniques et de résorption complémentaire *in vivo*. L'HA étant beaucoup moins soluble que le β -TCP il favorise l'ostéoconduction tandis que la dissolution du β -TCP avec relargage ionique de Ca^{2+} et PO_4^{3-} permet la re-précipitation en surface d'apatites biologiques bioactifs (LeGeros 2008). Le frittage à haute température des BCP consolide en effet la microstructure, la dissolution *in vivo* se fait par diffusion atomique, moléculaire et non microparticulaire.

La formation bioactive des cristaux biologiques s'effectue par nucléation hétéro-épitaxiale* sur les cristaux résiduels de la surface des BCP (Daculsi *et al.* 1997; Daculsi *et al.* 2009). C'est le contrôle des proportions de HA et de β -TCP qui induit la cinétique de résorption du matériau qui se fait au profit de la repousse osseuse (Daculsi *et al.* 1990), on parle alors de résorption chimique (Delanian et Lefaix 2002). À cela vient s'ajouter la résorption biologique par les macrophages et ostéoclastes due au biomimétisme chimique et cristallin vis-à-vis des BCP démontré précédemment impliquant une reconnaissance de ces derniers par les ostéoclastes comme faisant partie du tissu osseux et rentrant ainsi dans le cycle du remodelage osseux (Eggl *et al.* 1987; Galois *et al.* 1996). Ces phénomènes concomitants de résorption-reprécipitation simultanée à la repousse osseuse permettent d'éviter toute perte de volume au sein du défaut osseux au cours du temps évitant ainsi des risques de détérioration des propriétés mécaniques lors de comblement osseux (Neo *et al.* 1993). Certains auteurs parlent d'ostéotransductivité pour décrire ce phénomène d'apposition* osseuse (Driessens *et al.* 1998; Blom *et al.* 2001; Rajesh *et al.* 2009).

Les cinétiques de dissolutions chimiques des principaux phosphates de calcium ont été largement analysés dans la littérature, il en ressort que l'hydroxyapatite est la moins prompte à se dégrader, ce qui en fait bien un matériau biorésistant au contraire du β -TCP qui est biorésorbable ainsi que l' α -TCP avec une cinétique de dissolution encore plus rapide (Équation 2). Ce dernier se résorbe ainsi très vite *in vivo* au bout de quelques semaines alors que les granules de BCP (HA/ β -TCP) se dissolvent plus lentement grâce à la proportionnalité des phases, ce qui permet de prolonger sur plusieurs mois leur effet bioactif (Daculsi *et al.* 1992; Ratner 2004).



Équation 2 : Vitesse de dissolution chimique des principaux phosphates de calcium

Un autre paramètre important dans la bioactivité des BCP serait leur capacité à adsorber les protéines sériques* adhérant à leur surface et favorisant le recrutement des cellules ostéoprogénitrices (Kilpadi *et al.* 2001).

De plus les phosphates de calcium ne sont pas soumis au phénomène de corrosion typique des métaux (Manivasagam *et al.* 2003). Il est intéressant de noter à ce titre que dans les applications telles que les prothèses totales de hanches, une couche d'hydroxyapatite est souvent ajoutée en surface de l'implant en titane ou en acier inoxydable à la fois pour augmenter la rugosité et améliorer l'ostéointégration grâce aux propriétés bioactives des phosphates de calciums (Li 2003).

Les BCP sont ainsi largement employés en clinique orthopédique mais également en chirurgie maxillo-faciale, crânienne, dentaire (Daculsi *et al.* 2009) et dans une moindre mesure en chirurgie vétérinaire sur les animaux domestiques ou d'élevage (Goyenvalle *et al.* 2000).

Cependant la bioactivité n'est pas le seul paramètre à rentrer en compte dans les applications de l'ingénierie tissulaire osseuse. En effet en termes de quantité de publications, ce sont les matrices polymériques seules puis les composites polymères-céramiques et enfin les céramiques seules (loin devant les métaux) qui attirent le plus les laboratoires de recherches travaillant sur la réparation des sites osseux (Figure 18). Ceci s'explique d'une part par le très grand nombre de polymères disponibles contre le panel réduit des phosphates de calcium d'intérêt biologique. D'autre part, cela s'explique par le besoin d'avoir des matrices

malléables ou souples ou fibreuses, ce que ne permettent pas les céramiques aux propriétés mécaniques fragiles. Nous reviendrons sur ces propriétés mécaniques dans le prochain paragraphe.

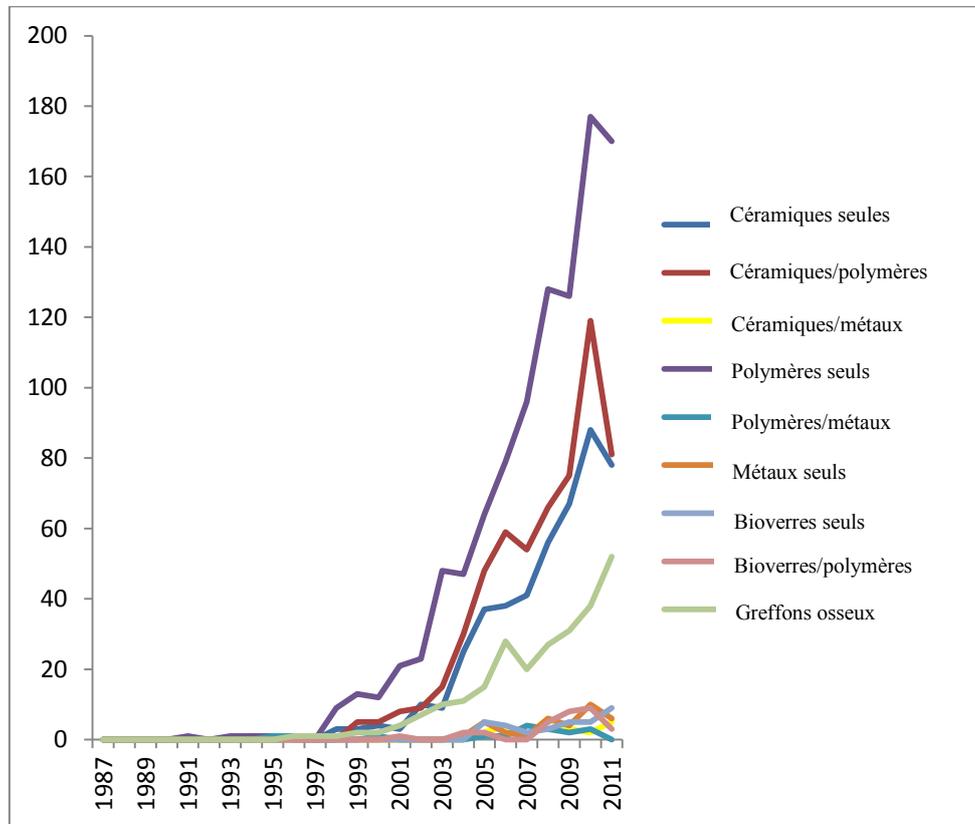


Figure 18 : Recherche bibliographique sur les matériaux de la recherche en ingénierie tissulaire osseuse, source PubMed, effectuée en novembre 2011

Les greffons osseux (autologues ou xéno greffes) sont toujours très étudiés en laboratoire de recherche comme le montre le graphique ci-dessus, très largement devant la recherche sur les bioverres ou les métaux, ce qui traduit l'utilisation encore massive de ces greffons en cliniques et qui démontre que l'approche biomimétique des biomatériaux synthétiques a encore besoin de davantage de connaissance des mécanismes régissant le vivant pour innover en matière d'ingénierie des biomatériaux.

1.4. Le concept micro-macroporeux des granules MBCP®

Le domaine de l'ingénierie des biomatériaux définit ses gammes de porosités, qui lui sont propres, et même si des variations apparaissent selon les auteurs, un consensus semble se trouver dans les définitions suivantes (Uchida *et al.* 1985; Daculsi *et al.* 2009):

- Les micropores sont de taille inférieure à 10 μm
- Les mésopores sont compris entre 10 μm et 100 μm
- Les macropores sont compris entre 100 μm et 500 μm

Alors que les mésopores ne suscitent que peu d'intérêt, les rôles complémentaires des micropores et des macropores ont fait l'objet de nombreuses publications démontrant leurs caractères discriminants au regard de l'efficacité escomptée en termes de repousse osseuse (Daculsi et Layrolle 2004).

Nous allons présenter leurs influences respectives au travers de l'exemple pertinent des matrices MBCP® de Biomatlante SA, comprenant 60% d'hydroxyapatite et 40% de β -tricalcium phosphate.

Les macropores

L'introduction pré-frittage de porogènes, comme le naphthalène, le saccharose, l'urée ou l'acrylamide dans les phases pulvérulentes de CDA induit après leur sublimation* l'apparition de macropores dont la taille et la forme sont contrôlées en fonction du diamètre initial des porogènes.

Ces macropores permettent la colonisation des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoclastes et des macrophages dont l'adhésion est améliorée grâce à l'adsorption des protéines sériques intervenant dans les points focaux* des cellules aux biomatériaux, telles que l'intégrine ou la fibronectine (Gilbert *et al.* 2003), rendue possible notamment grâce à l'énergie de surface compatible des phases HA et β -TCP (dos Santos *et al.* 2008).

La figure ci-dessous montre la morphologie globale d'un granule de MBCP®.

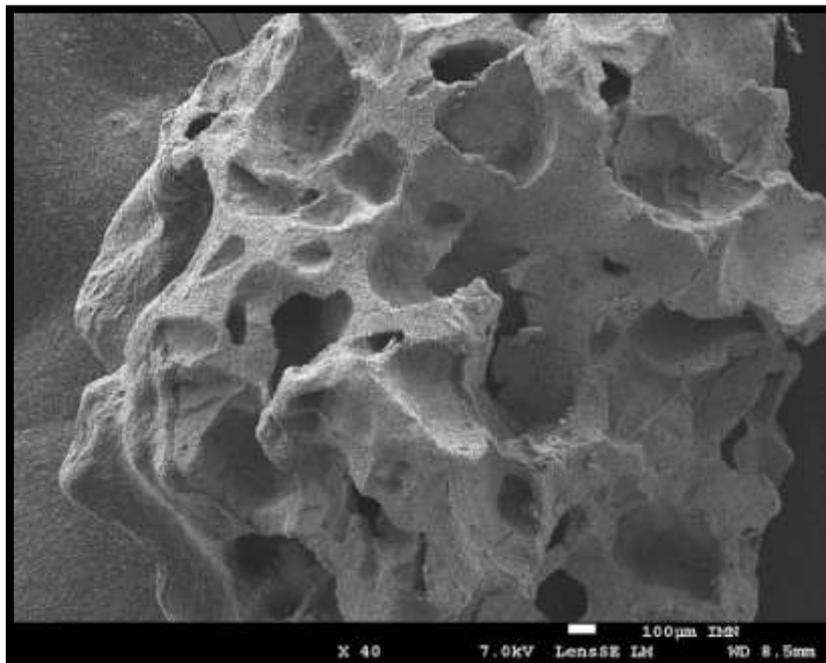


Figure 19 : Macrostructure poreuse du MBCP® observée au MEB

Les micropores

Contrairement aux macropores, les micropores se forment spontanément lors du cycle de frittage et ne sont en fait que les interstices entre grains frittés qui ne se combrent pas du fait des contraintes d'espace résultant de la croissance simultanée de cristaux contigus (LeGeros *et al.* 2003) comme l'illustre la figure ci-dessous.

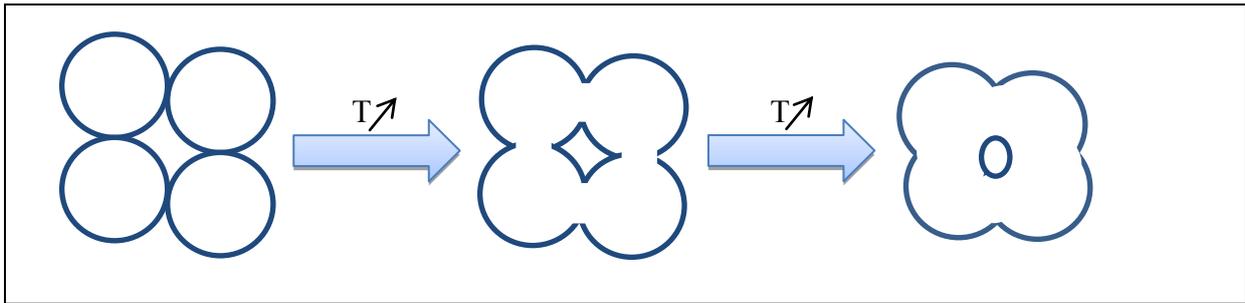


Figure 20 : Principe général de formation des micropores des BCP obtenus par frittage

L'interconnectivité de ces micropores a été démontrée de façon détaillée notamment par microtomographie* (microscanner ou synchrotron*) et porosimétrie mercure ou plus simplement par phénomène d'absorption volumique complète de solution aqueuse fluide déposée à la surface des BCP (afin d'imager ces propos il suffit de visualiser l'absorption de gouttes de café sur un morceau de sucre) (Weiss *et al.* 2003; Lecomte *et al.* 2008; Fellah et Layrolle 2009).

Cette microporosité, en complément des macropores, est quant à elle garante des échanges ioniques nécessaires aux phénomènes de dissolution-précipitation *in vivo* décrite au paragraphe précédent, mais elle est aussi responsable de l'invasion des fluides biologiques favorisant l'apport nutritionnel aux cellules adhérentes et donc leur prolifération (Hutmacher 2000).

Le cliché suivant d'un granule de MBCP® est représentatif de la microporosité désirée en ingénierie tissulaire osseuse pour les raisons déjà énoncées.

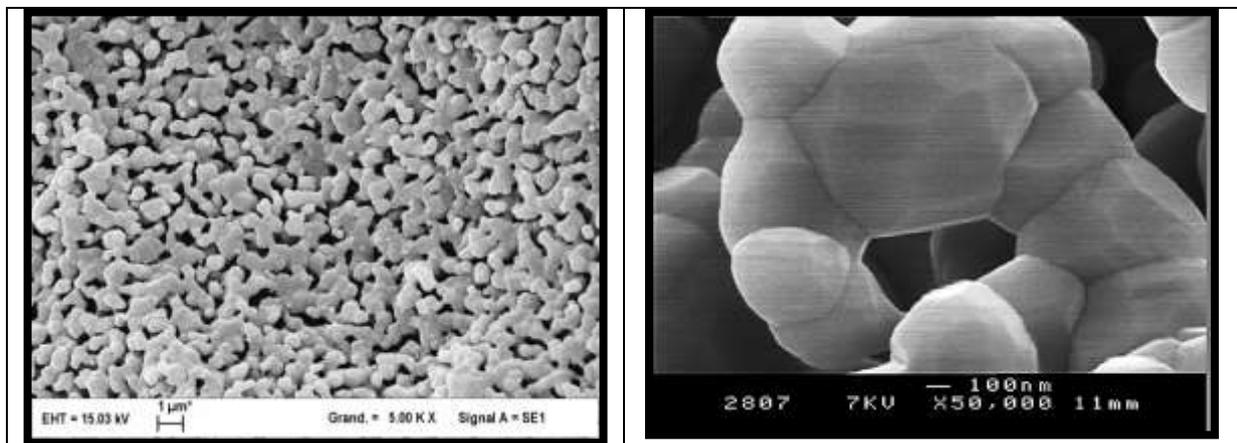


Figure 21 : Microstructure poreuse des matrices MBCP® observée au MEB (x5000 et x50 000)

Effets de la micro-macro porosité

Pour autant que la taille et la distribution des pores soient en adéquation avec celles décrites ci-dessus (Gauthier *et al.* 1998), cette simple multi-dimensionnalité de la porosité des matrices telles que les MBCP® est ainsi décrite comme favorisant l'ostéoconduction (Passuti *et al.* 1989; Woodard *et al.* 2007), l'ostéoinduction (Gosain *et al.* 2002; LeGeros 2008), et *in fine* l'ostéointégration (Karageorgiou et Kaplan 2005), faisant de ces matrices un modèle de bioactivité (Daculsi *et al.* 2009).

Cependant les vertus de cette porosité bimodale sont contrebalancées par les faiblesses mécaniques ainsi induites par leur présence. En effet une large présence d'espace vides de distribution aléatoire implique une anisotropie* des propriétés mécaniques propices à des phénomènes d'effritements ou d'effondrement sous contraintes (Liu 1996).

Les macropores initient en effet les lignes de fractures (Tancret *et al.* 2006) qui s'expriment au niveau microscopique par des brisures intergranulaires et intragranulaires comme on peut le voir sur des clichés pris sur un ciment phosphocalcique ci-dessous.

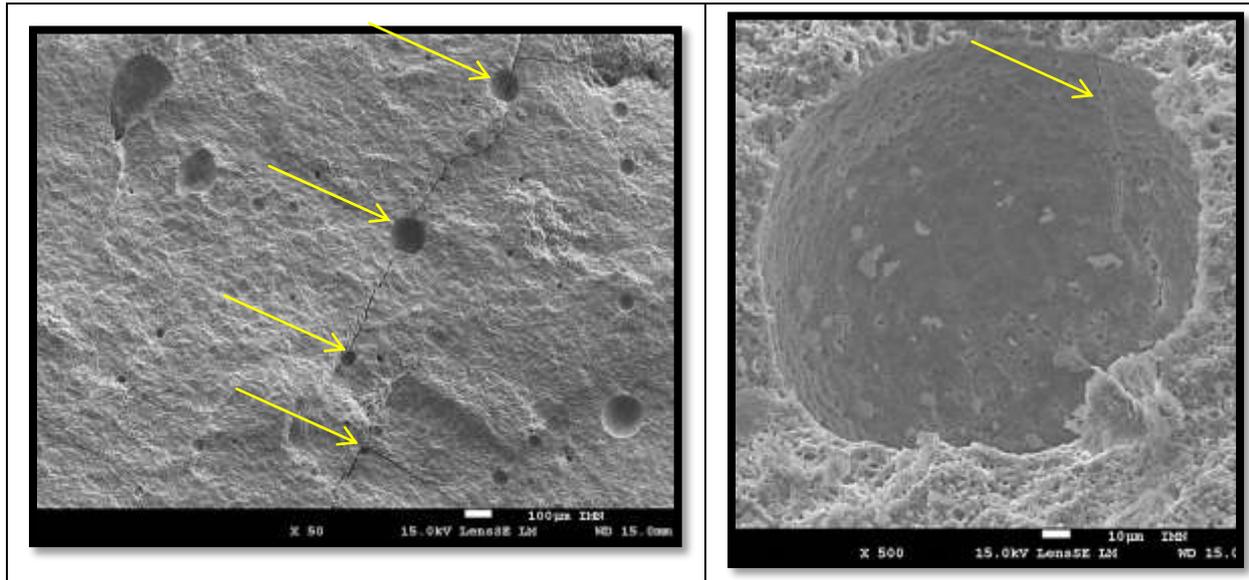


Figure 22 : Ligne de fracture intergranulaire suivant les macropores sur un ciment phosphocalcique (à gauche) et amorce de rupture initiée dans un macropore (x50 et x500)

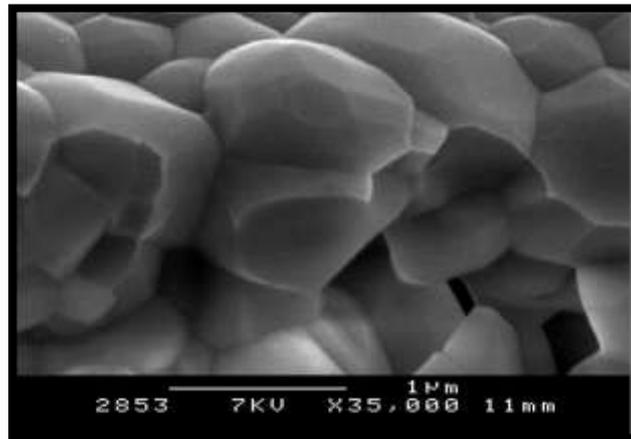


Figure 23 : Rupture intragranulaire observée sur un granule de BCP

1.5. Étude comparative de produits commerciaux

Afin d'avoir un aperçu de l'étendue des morphologies possibles des matrices phosphocalciques destinées à la repousse osseuse, et de faire apparaître les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles, un panel de 14 produits synthétiques du marché a été analysé.

Matériels et Méthodes

Les matériaux étaient conditionnés dans leurs emballages commerciaux d'origine. Le tableau ci-dessous donne la liste des matériaux, le nom des fabricants, de leurs morphologies macroscopiques annoncées, leurs dimensions et leurs natures chimiques annoncées.

Nom commercial	Numéro d'analyse	Fabricant	Dimensions annoncées	Compositions annoncées
Bonit matrix	1	DOT	0.6 * 4 mm	HA-Si/TCP
Syncera	2	Oscotec	0.4-1 mm	TCP
Ostenon	3	BioA	1-2 mm	HA /TCP
Bongros HA	4	BioA	2-3 mm	HA
Interpore200	5	InterPore	0,425-1mm	HA
RTP	6	Septodont	6*10 mm	TCP + collagène bovin
Calciresorb 35	7	Ceraver osteal	2-3 mm	HA/TCP 65/35
BCP Bicalphos	8	Medtronic	1.6-3.2 mm	HA/TCP 60/40
Granulado Keramedic	9	Keramat	0.5-1.4 mm	TCP
Ceraform	10	Teknimed	3*3*3 mm	HA/TCP 65/35
SinboneHT (Coree)	11	Purzer	0.25-1 mm	HA/TCP 60/40
Bone Medik-DM	12	Meta Biomed	0.5-1 mm	Si-HA/TCP 60/40
MBCP	13	Biomatlante SA	0,5-1 mm	HA/TCP 60/40
MBCP+	14	Biomatlante SA	0,5-1 mm	HA/TCP 20/80

Tableau 8 : Liste du panel d'échantillons commerciaux

Tous les échantillons ont été broyés manuellement dans un mortier en agate à l'aide d'un pilon en agate avant leur passage aux analyses DRX et FTIR.

La diffraction des rayons X (PW 1830, Philips) a été réalisée en utilisant la radiation $K\alpha$ du cuivre (longueur d'onde $\lambda=1.5418$ Angström) avec un pas $0,03^\circ$ (2θ) et un temps d'acquisition par pas de 2 secondes. La mesure de la proportion des phases en présence s'est effectuée par la mesure du ratio de l'intensité des pics principaux de l'hydroxyapatite ($31,75^\circ$) et du β -TCP ($31,05^\circ$).

Des pastilles de bromure de potassium contenant entre 1 et 2% massique de chaque échantillon broyé ont permis l'identification des groupements chimiques en présence par spectroscopie infra-rouge à transformé de Fourier (IRTF). Les spectres ont été acquis entre 400 et 4000 cm^{-1} (Magna IR 550, Nicolet Instruments).

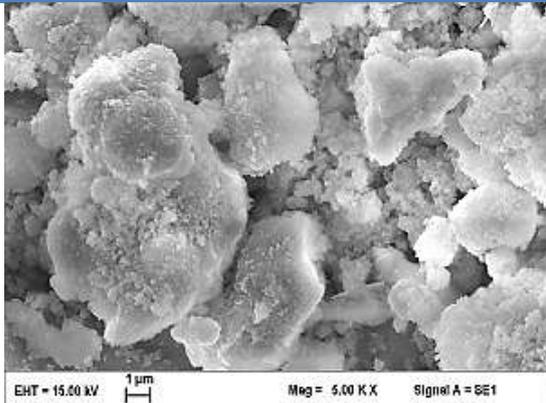
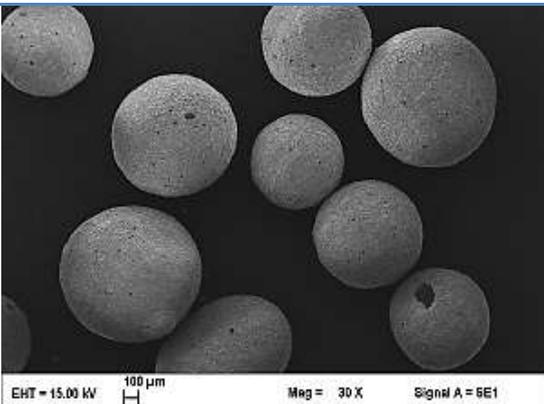
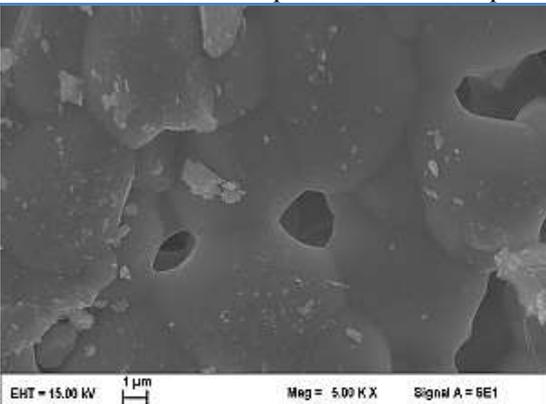
Les échantillons intacts (non-broyés) ont été recouverts d'une couche d'or-palladium (Au-Pd) afin d'être observés en microscopie électronique à balayage (LEO 1450VP) afin de vérifier leur granulométrie et de caractériser leur microstructure.

La surface spécifique des échantillons a été mesurée par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) d'adsorption d'azote à 77 Kelvin (Asap2010, Micromeritics)

Enfin un indice de perméabilité-hydrophilicité a été donné à chaque produit par évaluation qualitative de l'absorption d'une solution de bleu de méthylène dilué à 1% dans de l'eau distillée déposé à leur surface.

Résultats

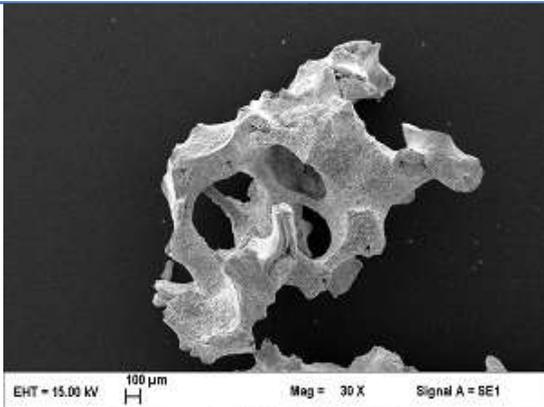
Dans un souci de clarté et de concision, les diffractogrammes DRX ainsi que les spectres IRTF obtenues seront montrés en annexes (Annexe 2). Seulement quelques anomalies ou présences de phases étrangères (cristallines ou amorphes) à ce que les fabricants ont annoncées ont été décelées. En revanche les images de microscopies, réunies avec commentaires dans le tableau 8, montrent les grandes différences de morphologie et de microstructure entre chaque produit. Enfin le tableau 9 récapitule les caractérisations obtenues en indiquant lorsque les données fabricants concernant la composition chimique ne correspondent pas avec les analyses effectuées.

	MACROSTRUCTURE x30-50	MICROSTRUCTURE x5000
1		
	La macrostructure se présente sous la forme de batonnet cylindrique.	La microstructure est très fine similaire à l'apatite peu cristallisée (CDA), avec des agglomérats de grains de taille très hétérogènes allant du nanométrique au micrométrique
2		
	Billes micrométriques correspondant à la	La microstructure montre des grains frittés à

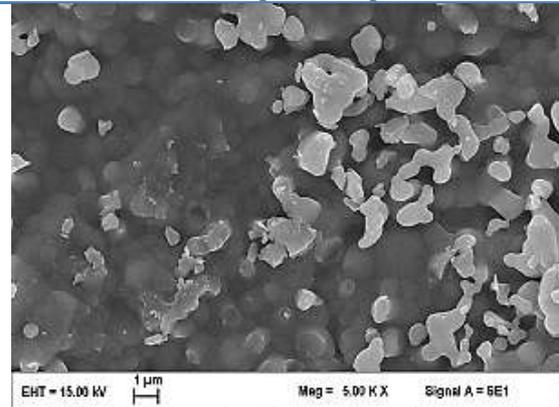
granulométrie annoncée (0,4 à 1 mm).

haute température suffisamment longtemps pour atteindre des tailles de grains de 1 à 5 microns environ. Microporosité quasi-nulle

3

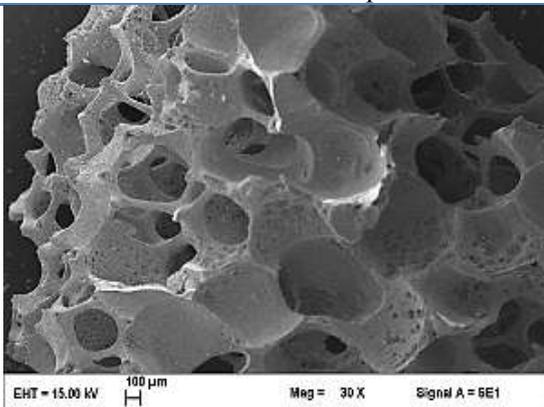


La macrostructure des granules présente une surface fortement macroporeuse.

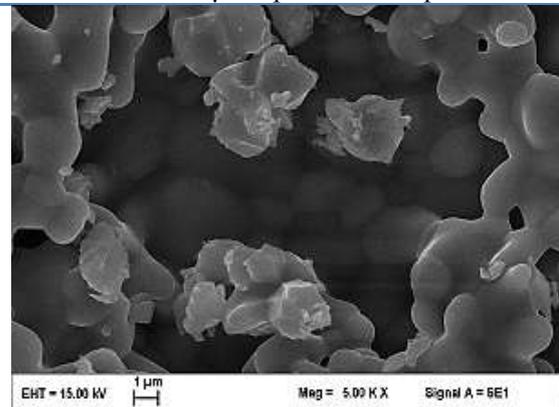


La microstructure est fine avec des grains frittés inférieurs à 1 µm / pas de microporosité.

4

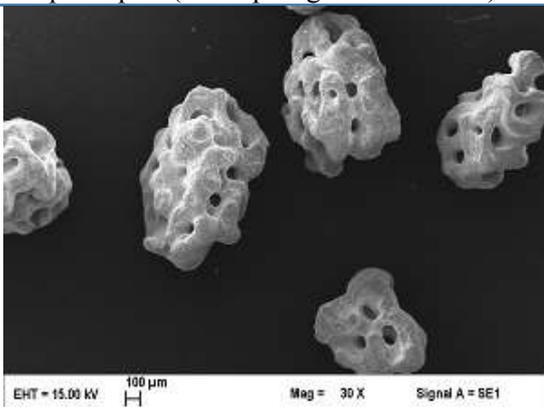


La macrostructure des granules est constituée de nombreux macropores de type sphériques (billes porogène sublimées).

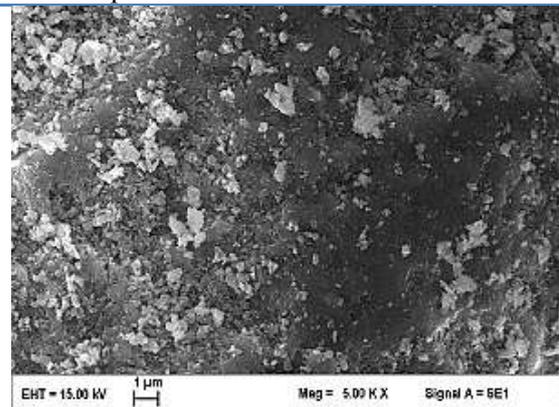


La microstructure correspond à des grains frittés sans microporosité. La taille des grains est comprise entre 1 et 2 microns environ.

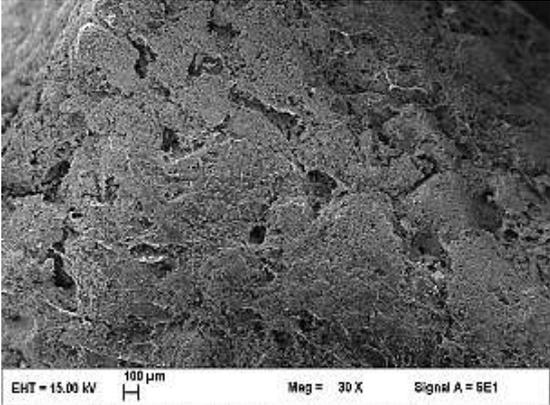
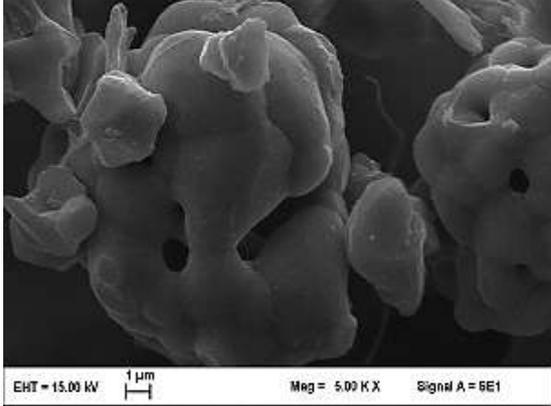
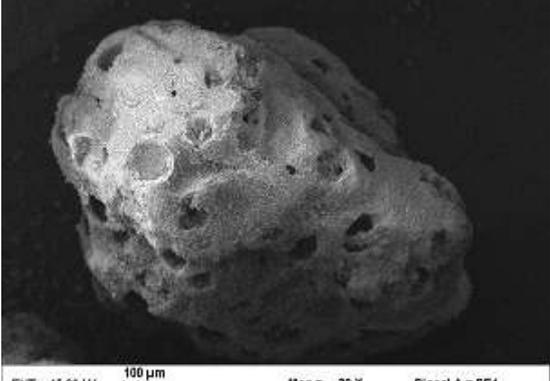
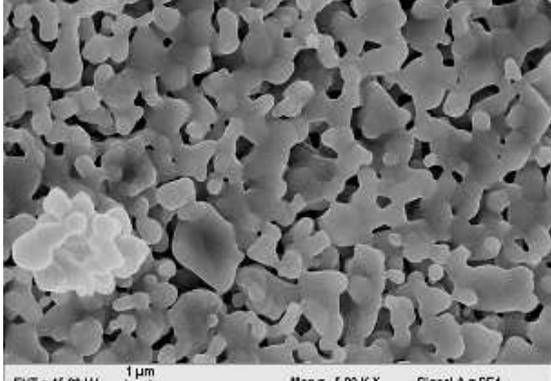
5

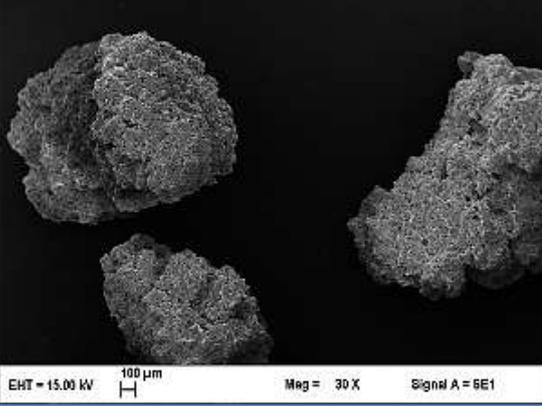
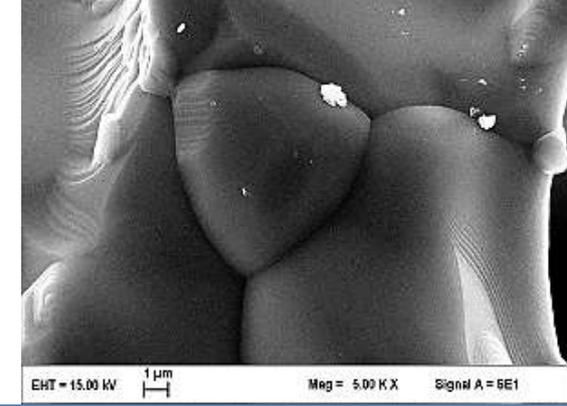
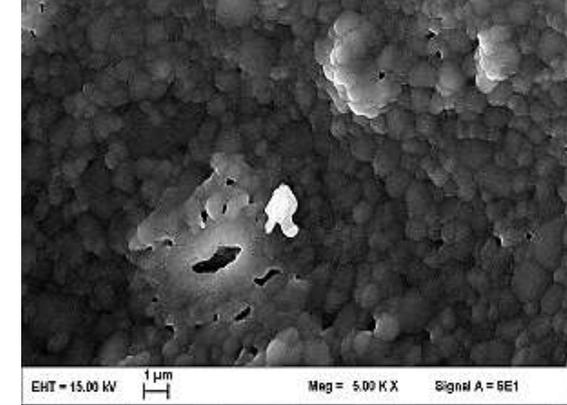
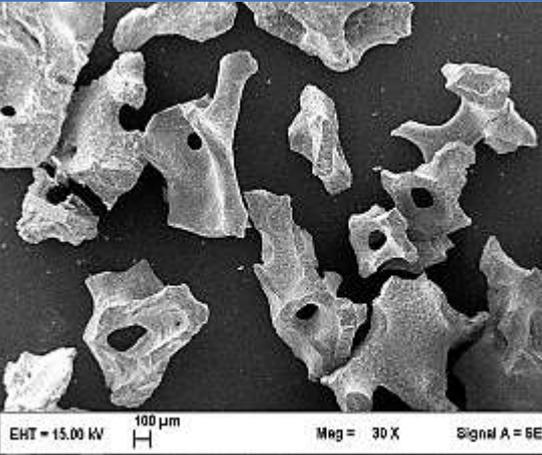
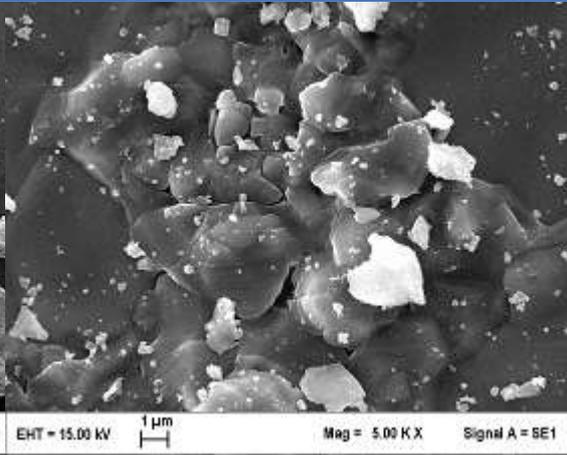


Les granules présentent une macroporosité sphérique homogène



La microstructure très fine présente une distribution hétérogène de la taille des grains, allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de nanomètres.

<p>6</p>  <p>EHT = 15.00 kV 100 µm Mag = 30 X Signal A = SE1</p>	 <p>EHT = 15.00 kV 1 µm Mag = 5.00 K X Signal A = SE1</p>
<p>La macrostructure montre une surface faiblement macroporeuse avec des pores inférieur à 100 microns.</p>	<p>La microstructure présente des grains frittés de taille de 1 à 5 microns environ. Forte microporosité.</p>
<p>7</p>  <p>EHT = 15.00 kV 100 µm Mag = 30 X Signal A = SE1</p>	 <p>EHT = 15.00 kV 1 µm Mag = 5.00 K X Signal A = SE1</p>
<p>La macrostructure des granules présente des macropores de taille homogène > 100 microns.</p>	<p>La microstructure fine présente des grains de taille homogène < 1 micron. Microporosité faible.</p>
<p>8</p>  <p>EHT = 15.00 kV 100 µm Mag = 30 X Signal A = SE1</p>	 <p>EHT = 15.00 kV 1 µm Mag = 5.00 K X Signal A = SE1</p>
<p>La macrostructure des granules montre une surface fortement macroporeuse avec des concavités de type sphérique de diamètre > 500 microns.</p>	<p>La microstructure fine présente des cristaux frittés de taille homogène < 1 micron. Forte microporosité.</p>

<p>9</p>		
	<p>La macrostructure des granules présente une surface dépourvue de macropores.</p>	<p>La microstructure montre des cristaux frittés de taille entre 5 et 10 micron sans microporosité.</p>
<p>10</p>		
	<p>La macrostructure cubique présente une surface constituée d'une succession contiguë de macropores concaves > 100 micron.</p>	<p>La microstructure fine montre des cristaux frittés de taille homogène inférieur à 1 micron. La microporosité est très réduite et hétérogène.</p>
<p>11</p>		
	<p>La macrostructure montre une dispersité de taille et de forme des granules, troués ou non.</p>	<p>La microstructure est hétérogène avec des cristaux frittés de taille très variable allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs microns. Pas de microporosité</p>

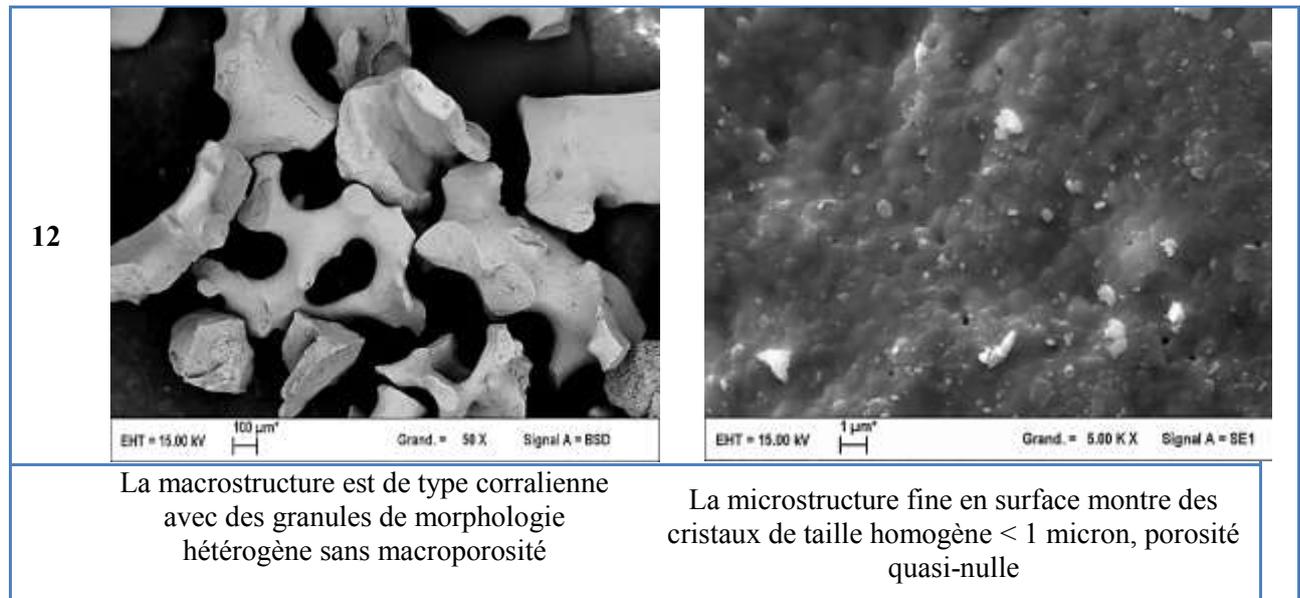


Tableau 9 : Observations au microscope électronique à balayage en mode électrons secondaires du panel de produits commerciaux

Produit	Compositions mesurées et cristallinité	Morphologies et granulométries observées	Porosité et taille des grains observés	Surface Spécifique (SS)	Indice de perméabilité
MBCP	Annoncée: 60/40 Mesurée: 60/40 Cristallinité élevée	Granules 0,5-1mm	Fortement Macroporeux et Microporeux Grains 0,2 - 0,8µm	5m ² /g	4
MBCP+	Annoncée: 60/40 Mesurée: 60/40 Cristallinité élevée	Granules 0,5-1mm	Fortement Macroporeux et Microporeux Grains 0,1 - 0,7µm	6m ² /g	5
Bonit matrix	Annoncée: - Mesurée: 30/70 Cristallinité faible	Bâtonnets 0.6 x 4 mm	Pas de macroporosité Pas de microporosité Agglomérat dense et compact de cristaux nanométriques	64m ² /g	3
Syncera	Annoncée: 0/100 Mesurée: 0/100 Cristallinité élevée	Granules 0.4-1 mm	Pas de macroporosité Pas de microporosité Grains 3 à 6µm	3m ² /g	0
Ostenon	Annoncée: - Mesurée: 70/30 Cristallinité élevée Carbonates et matières organiques observées équivalent à os bovin	Granules 1-2 mm	Macroporeux Pas de microporosité Grains 0,7 à 1,5µm	6m ² /g	0
Bongros HA	Annoncée: 100/0 Mesurée: 100/0 Cristallinité élevée Carbonates et matières organiques	Granules 2-3mm	Macropores Pas de microporosité Grains 1,5 - 3µm	2m ² /g	3
Interpore 200	Annoncée: 100/0 Mesurée: 100/0 Cristallinité élevée Présence de carbonates	Granules 0,4-1mm	Mésopores Pas de microporosité Agglomérat dense mesure taille difficile	4m ² /g	4

RTP	Annoncée: 0/100 Mesurée: 0/100 Cristallinité élevée	Cône 6 x 10mm	Grains 0,1 – 0,6µm Pas de macropore Pas de micropore	5m ² /g	5
Calciisorb 35	Annoncée: 65/35 Mesurée: 90/10 Cristallinité élevée	Granules 2-3mm	Grains 3 – 6µm Faible macroporosité non interconnectée Microporosité	2,5m ² /g	4
BCP Bicalphos	Annoncée: 60/40 Mesurée: 60/40 Cristallinité élevée	Granules 1,6 – 3,2mm	Grains 0,6 – 2,5µm Forte macroporosité partiellement interconnectée Microporosité	4m ² /g	3
Granulado Keramedic	Annoncée:0/100 Mesurée: 0/100 Cristallinité élevée Matières organiques	Granules 0.5-1.4 mm	Grains 8µm – 20µm Pas de macroporosité Pas de microporosité	< 1m ² /g	0
Ceraform	Annoncée: 65/35 Mesurée: 65/35 Cristallinité élevée	Cubes 3 x 3 x 3mm	Grains 0.6-1µm Forte Macroporosité Pas de microporosité	6m ² /g	2
Sinbone HT (Coree)	Annoncée: 60/40 Mesurée: 65/35 Cristallinité élevée Présence de carbonates	Granules 0.25-1 mm Densité 1,4	Grains 1 – 5µm hétérogène sans macropores peu de microporosité	4m ² /g	0
Bone Medik- DM	Annoncée: 60/40 Mesurée: 40/60 Cristallinité élevée Présence de carbonates et résidus organique	Granules 0.5-1 mm	Grains 0,5 – 1µm Hétérogène sans macropores et sans micropores	< 1m ² /g	0

Tableau 10 : Tableau des résultats de caractérisations. Dans ce tableau sont compilés les résultats d’analyses par XRD et IRTF dans la colonne « Compositions mesurées et cristallinité » et les observations au MEB dans les colonnes « Morphologie et granulométries observées » ainsi que « Porosité et taille des grains observés ». Les autres colonnes étant suffisamment explicites

Conclusion sur l’étude comparative

On remarquera la diversité des caractéristiques des produits pour la substitution osseuse. La variabilité des formes proposées tout d’abord, les formes sont pour la plupart granulaires (ronds, coralliens ou irréguliers) ce qui offre une large possibilité de comblement de sites, les granules de faible granulométrie pouvant être déposés dans des cavités de toutes tailles et morphologies. On peut s’attendre à une plus grande difficulté d’utilisation en ce qui concerne les morphologies cubiques ou en bâtonnets de plus grande tailles car moins pratiques à implanter (Hollister 2005). La caractéristique la plus importante restant la porosité qui une fois encore est très hétérogène entre les produits. Les granules à la fois microporeux et macroporeux, et respectant les gammes de pores que nous avons décrits comme bioactifs précédemment, représentent seulement moins d’un tiers des échantillons (4 sur 14). Ce manque de porosité engendre alors une surface spécifique parfois inférieure à 2m²/g contre environ 4 à 6 m² pour les matrices respectant cette distribution bimodale de porosité. Or cette surface mesurée est celle accessible à l’adsorption des protéines d’adhésion cellulaires et des facteurs de croissance favorables au remodelage osseux (Hutmacher 2000). L’hétérogénéité de microstructure est également un problème souvent rencontré ne pouvant ainsi permettre de prédire ou de garantir l’homogénéité des réactions *in vivo*. Les données sur l’indice de

perméabilité, qui représente qualitativement la capacité des matrices à être pénétrées par les fluides biologiques nutritionnels reflètent encore la grande dispersité des propriétés des matrices commerciales avec seulement un tiers des produits ayant un indice élevé (5 sur 14). Enfin les quelques incohérences entre les compositions annoncées et celles analysées par DRX et IRTF, allant jusqu'à inverser le ratio HA/TCP, sont surprenantes et indiquent soit un problème de lot, soit un manque flagrant de contrôle des procédés de synthèse. Le bilan de cette étude comparative, selon les 7 critères de forme pratique pour l'usage clinique, de surface spécifique, de présence de micro-macroporosité, d'homogénéité de microstructure, de cristallinité, de composition contrôlée et de perméabilité, est résumé sous forme de matrice de Pugh dans le tableau 11 avec comme conclusion sans ambivalence la meilleure correspondance au regard des enjeux du biomimétisme et de la bioactivité en site osseux, décrits dans ce chapitre, des matrices MBCP® et MBCP+®. Ces deux dernières obtiennent en effet le score maximum (7), suivies par les matrices Calciresorb35 (score 5), BCP Bicalphos et Interpore 200 (score 4), les autres étant loin derrière avec notamment un score négatif pour Bonit Matrix (-2) et Bone-Medik (-1) ne répondant quasiment à aucun des critères énoncés.

	MBCP	MBCP+	Bonit matrix	Syncera	Ostenon	Bongros HA	Interpore 200	RTP	Calciresorb 35	BCP Bicalphos	Granulado Keramedic	Ceraform	Synbone HT	Bone-Medik DM
Forme pratique	+1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
Surface spécifique (+1 si $> 2 \text{ m}^2/\text{g}$, 0 si $=2 \text{ m}^2/\text{g}$, -1 si $<2 \text{ m}^2/\text{g}$)	+1	+1	+1	+1	+1	0	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
Micro-macroporeux +1 si oui, 0 si un des deux, -1 si aucun	+1	+1	-1	-1	0	0	0*	-1	+1	+1	-1	0	0	-1
Microstructure homogène	+1	+1	-1	0	+1	+1	0	0	+1	+1	0	-1	-1	+1
Composition contrôlée	+1	+1	0	+1	-1	0	0	+1	-1	+1	0	+1	0	-1
Cristallinité élevée	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Perméabilité élevée (+1 si indice >3 , 0 si $=3$, -1 si inférieur à 3)	+1	+1	0	-1	-1	0	+1	+1	+1	0	-1	-1	-1	-1
Score Total	+7	+7	-2	+2	+2	+3	+4	+3	+5	+4	+1	0	+1	-1

Tableau 11 : Matrice de Pugh à facteurs égaux récapitulative des meilleurs candidats théoriques à l'utilisation en tant que substitut osseux

*Interpore 200 est noté 0 ici car sa macroporosité s'apparente plus à une mésoporosité

Chapitre 2

Potentiel d'ostéoinduction des granules phosphocalciques biphasés

*Développement de matrices céramiques et composites pour
l'ingénierie tissulaire osseuse*

Chapitre 2, les grandes lignes:

Les critères d'ostéoinduction sont aujourd'hui encore discutés. La mise en place d'expérimentations pré-cliniques pour démontrer l'ostéoinduction de granules de phosphate de calcium soulève quelques obstacles de faisabilité et de pertinence qui seront évoqués au travers d'une étude pré-clinique réalisée chez la souris immunodéficiente. Pour répondre au besoin de disposer de modèles fiables réduisant au maximum les biais consécutifs à la difficulté de contrôler et de prévoir la réaction des tissus vivants, un modèle d'ostéonécrose testé chez le lapin sera proposé en fin de chapitre.

2.1. La stratégie de l'ingénierie tissulaire osseuse

Après avoir détaillé l'ingénierie des biomatériaux phosphocalciques au premier chapitre et en particulier les céramiques biphasés HA-TCP, nous allons décrire la stratégie, et les enjeux, de l'ingénierie tissulaire osseuse que nous avons appliquée lors d'une étude *in vivo* chez la souris dans le contexte du projet Européen REBORNE (pour « Regenerating Bone Defects using New biomedical Engineering approaches ») coordonné par P. Layrolle (Inserm U957) ayant pour finalité de valider des protocoles cliniques utilisant les cellules souches humaines (www.reborne.org). La liste des partenaires du projet se trouve en Annexe 3.

L'ingénierie tissulaire se définit communément, depuis la fin des années 1980, comme un domaine interdisciplinaire dont la finalité a pour vocation de maintenir, réparer, ou améliorer les propriétés de tous les tissus ou organes à l'aide de matrices synthétiques, issues de l'ingénierie des biomatériaux, supplémentées d'agents bioactifs issus du vivant. Ce domaine se situe donc à la croisée de l'ingénierie et de la biologie (Zelman 1987; Langer et Vacanti 1993).

Le schéma ci-dessous représente les principales étapes de l'ingénierie tissulaire que sont le prélèvement de cellules vivantes sur le patient, leurs mise en contact avec les matrices synthétiques en milieu aqueux propices à leur adhésion et leur survie (milieu de culture cellulaire par exemple), puis l'incubation du système hybride ainsi créé favorable à l'invasion dans le volume des matrices porteuses, et enfin l'implantation en site osseux (Cancedda *et al.* 2003; Lanza et Vacanti 2007).

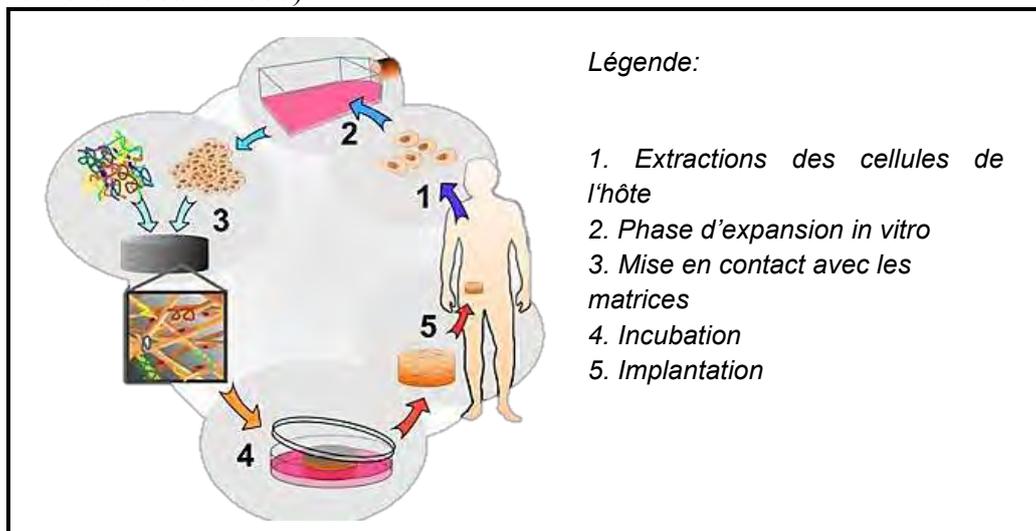


Figure 24 : La stratégie globale de l'ingénierie tissulaire (Griffith et Naughton 2002)

Une recherche bibliographique réalisée en novembre 2011 montre la croissance exponentielle des publications du domaine de l'ingénierie tissulaire en général depuis 20 ans, celles concernant spécifiquement les tissus osseux représentant un pan important puisque presque 30% de la totalité des publications que nous avons répertoriées traitaient de l'ingénierie tissulaire osseuse (Figure 25).

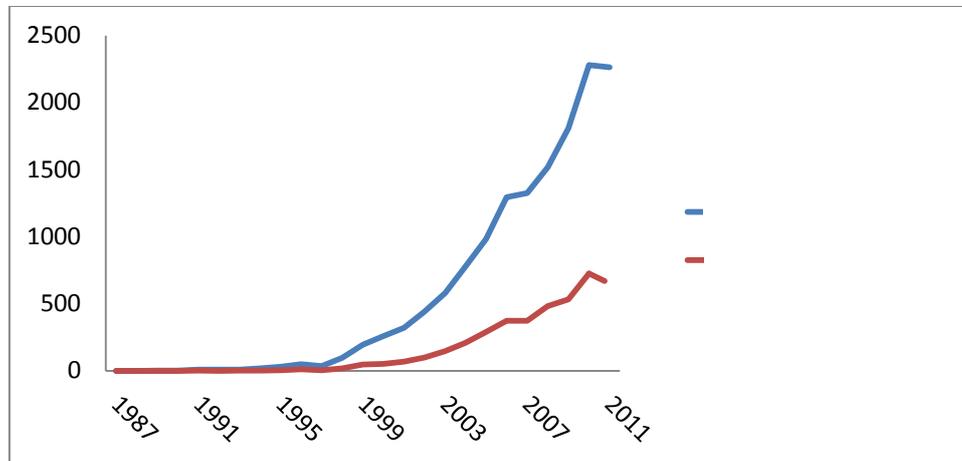


Figure 25 : Nombres de publications sur le thème de l'ingénierie tissulaire, source PubMed, novembre 2011

Le premier chapitre ayant déjà développé les caractéristiques nécessaires aux matrices destinées à l'implantation en site osseux, nous nous attarderons ici davantage sur l'importance des cellules souches et des facteurs de croissance dans l'ingénierie tissulaire osseuses.

Les cellules souches et les facteurs de croissance de la moelle osseuse

La découverte dans les années 1950 des cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses chez la souris par L. Stevens et B. Pierce a conduit dès 1958 à la première greffe de moelle osseuse clinique par G. Mathé. Ces travaux pionniers ont ouvert ainsi la voie à la recherche sur ces cellules souches dont l'intérêt majeur réside à la fois dans la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules composant les tissus et organes vivants mais également de s'auto-renouveler sans limite ce qui n'est pas le cas des autres types de cellules différenciées (Pittenger *et al.* 1999). C'est en 1998 que seront isolées la première fois les cellules souches embryonnaires humaines, ce qui souligne le caractère très récent de ce domaine de la biologie.

Les CSM sont accessibles plus facilement contrairement par exemple aux cellules souches embryonnaires car ces dernières sont mêmes interdites d'utilisation dans de nombreux pays dont la France aujourd'hui et les États-Unis entre 2003 et 2008 pour des raisons de bioéthiques (Halme et Kessler 2006).

En ce qui concerne l'ingénierie tissulaire osseuse, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse totale (MOT) attirent particulièrement le regard des chercheurs depuis plus de 50 ans (Harrison 1962) car elles sont les précurseurs des ostéoblastes et donc des ostéocytes que nous avons évoqués précédemment. Les études de la biologie moléculaire ainsi en pleine effervescence ont permises une meilleure connaissance des facteurs de croissance impliquant la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes et ostéocytes. Les principaux facteurs de croissance identifiés participant à la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes se trouvent être les BMP-2 (pour « Bone Morphogenetic Proteins »), les TGF- β (pour « Transforming Growth Factor »), les IGF-1 (pour « Insulin-like Growth

Factor ») et les FGF (pour « Fibroblasts Growth Factor », par exemple le FGF-2) et les VEGF (pour « Vascular Endothelial Growth Factor ») (Whitfield 2003; Mohan et Baylink 1991).

Les hormones* parathyroïdiennes (PTH) quant à elles stimulent les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes à synthétiser dans la matrice extracellulaire des facteurs de croissance qui engendrent la prolifération par mitose des CSM. Ces communications interactives entre pré-ostéoblastes, ostéoblastes et CSM constituent les mécanismes, illustrés en Figure 26, que tente de promouvoir l'ingénierie tissulaire osseuse (Caplan 1991).

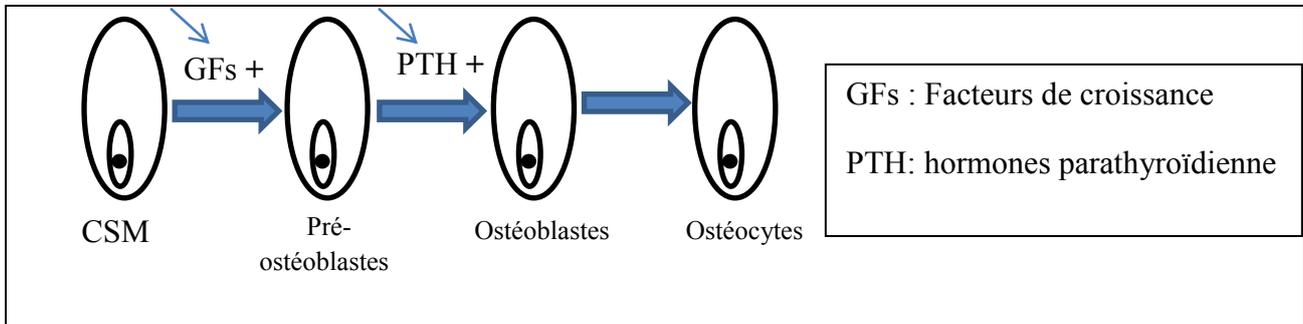


Figure 26 : Facteurs de différenciation des CSM en lignée osseuse

La culture de ces cellules souches isolées ou diluées dans la moelle osseuse contenant des protéines d'adhésions et des facteurs de croissance (Augello *et al.* 2007) sur les matrices phosphocalciques avant leur implantation a fait l'objet de nombreuses études concluant le plus souvent à l'apport ostéoinducteurs que ces agents biologiques procurent aux matrices *in vivo* (Maitra *et al.* 2004). Mais les études de l'ostéoinduction induite par la délivrance ou le greffage en surface de facteurs de croissances isolés (sans ajout de cellules) apparaissent également comme efficaces (Burg *et al.* 2000). Les phases de plasma, riche en plaquette (PRF) ou riche en fibrine (PRF) isolés par centrifugation du sang semblent également avoir un rôle ostéoinducteur (Arpornmaeklong *et al.* 2004). Enfin, quelques études soulignent que même en l'absence de tous ces agents bioactifs, les matrices en PCa, dont les BCP micro-macroporeux sont en première ligne, possèdent un potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules ostéogéniques grâce notamment au rôle des concavités des macropores (Ripamonti et Roden 2010) et des microporosités (Habibovic *et al.* 2005). Le tableau de revue ci-dessous montre quelques exemples représentatifs de ces différentes stratégies de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Auteurs	Matériaux	Contexte d'étude	Agents bioactifs provoquant une ostéoinduction
(Patel <i>et al.</i> 2008)	Polypropylène fumarate	In vivo, calvaria, taille critique, rat	Facteurs de croissances seuls
(Hanada <i>et al.</i> 1997)	BCP	In vivo, sous-cutanée, rat	CSM + facteur de croissance
(Martin <i>et al.</i> 1997)	HA	In vivo, sous-cutanée, souris	CSM + facteur de croissance
(Zellin et Linde 2000)	PTFE et collagène	In vivo, mandibule, taille critique, rat	Ostéoblastes + facteur de croissance
(Cordonnier <i>et al.</i> 2012)	BCP	Sous-cutanée, souris	CSM
(Müller <i>et al.</i> 2008)	HA, matrice seule	In vitro	- (matrice seule)
(Vogel <i>et al.</i> 2006)	β -TCP	Sous-cutanée, souris	CSM + PRP
(Spadaccio <i>et al.</i> 2009)	Fibres PLA + HA	In vitro	CSM
(Petite <i>et al.</i> 2000)	Corail	In vivo, métatarse, taille critique, chèvres	CSM

Tableau 12 : Études sur le potentiel d'ostéoinduction de dispositifs pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Le nombre de publications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse portant sur ces associations biologiques aux matrices synthétiques surpasse de loin le nombre de publications uniquement attachées à décrire les caractéristiques physico-chimiques des matrices. Les études sur les systèmes d'implantation hybrides cellules-matrices représentant la moitié des publications du domaine (*Tableau 13*).

Thèmes recherchés (titre/résumé)	Ingénierie tissulaire	Ingénierie tissulaire osseuse	Physico-Chimie				Biologie	
			Relargage Ionique	Rugosité	Porosité	Influence sur le pH	Cellules	Facteurs de croissance
Nombre de publications de 1987 à 2012	14309	4098	44	29	327	77	2635	334

Tableau 13 : Répartition des publications de l'ingénierie tissulaire osseuse, source PubMed, décembre 2011

2.2. Étude pré-clinique réalisée chez la souris immunodéficiente

Dans ce contexte du projet REBORNE, afin d'étudier le potentiel osté inducteur et ostéogénique des matrices de la gamme MBCP® supplémentées ou non de différents agents bioactifs d'origine humaine et murine, des souris immunodéficientes ont été implantées en site ectopique. L'immunodéficience permettant d'utiliser les cellules humaines sur les souris sans risque de complication dû au rejet des xénogreffes (Cancedda *et al.* 2003).

L'intérêt majeur du potentiel d'osté induction est de permettre de réparer des défauts osseux de taille critique, c'est-à-dire impossibles à réparer par le seul mécanisme de remodelage osseux biologique (Assouline-Dayan *et al.* 2002).

Cette étude sur le potentiel d'osté induction utilise les matrices MBCP® et MBCP+® dont nous avons succinctement évoqué la structure micro-macroporeuse au précédent chapitre mais dont nous allons ici détailler profondément les caractéristiques physico-chimiques au travers de l'article annexé ci-après. La figure 25 représente la stratégie globale de l'étude. Des compléments seront présentés et discutés au paragraphe suivant.

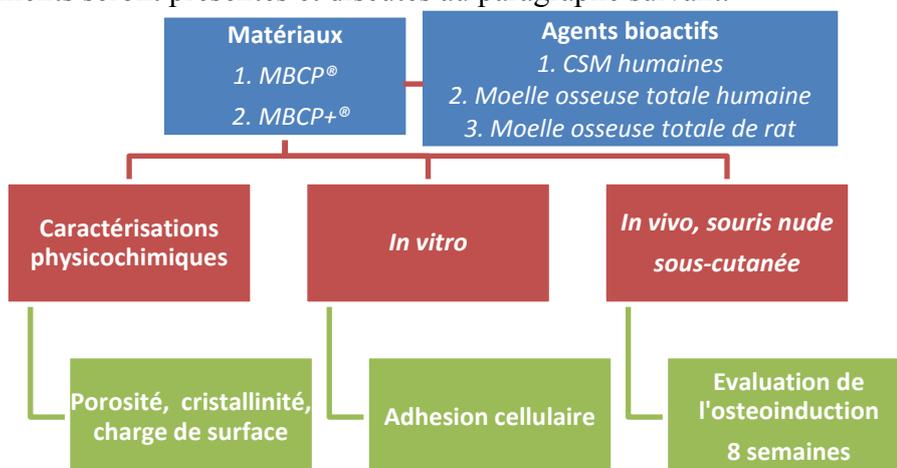


Figure 27 : Stratégie de l'étude de l'osté induction des matrices MBCP® supplémenté d'agents bioactifs

“Bioceramic properties and choice of biological agents for osteoinduction: a critical preclinical study in a nude mouse model”
European Cells and Materials Journal (soumis)

Bioceramic properties and choice of biological agents for osteoinduction: a critical preclinical study in a nude mouse model

T. Miramond^{1,2}, P. Corre^{1,3*}, S. Baroth², F. Moreau², P. Borget², J. Guicheux¹, G. Daculsi¹, P. Weiss¹*

** These authors contributed equally to this work*

¹ INSERM U791, Nantes University, Nantes, France, thomas.miramond@etu.univ-nantes.fr

² Biomatlante SA, Nantes, France

³ Departments of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Nantes University Hospital, Nantes, France

ABSTRACT

Bioceramics combined with isolated stem cells, or with total bone marrow, constitute the main strategies under consideration in the field of bone tissue engineering. In the present preclinical study, we tested these methods in a nude mouse model implanted in an ectopic site. The two biphasic calcium phosphate scaffolds (0.5-1 mm) currently on the market, MBCP® (60/40 ratio) and MBCP+® (20/80 ratio), present different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. These scaffolds were analyzed in terms of differences in their physicochemical properties. Biomaterials alone were found to have potentially low osteoinductive properties, while biomaterials associated with total bone marrow consistently improved osteoconduction in comparison with high concentrations of isolated human stromal cells. Greater ectopic bone presence and quantity were found with MBCP+®, regardless of the condition used, but no highly significant difference was found when compared with MBCP®.

Keywords: osteoinduction – calcium phosphate – biomaterials – stem cells – bone tissue engineering

1. INTRODUCTION

Bone tissue engineering studies focus on deciphering the roles of the different agents involved in bone regeneration. Biomaterial scaffolds, which support cell invasion and tissue formation, constitute the cornerstone of this concept, particularly osteoinductive materials (Barradas *et al.*, 2011). Thus, stem-cell specific properties that enable differentiation into osteogenic cells after recruitment by osteoinductive scaffolds constitute the main bone tissue engineering strategy (Khlusov *et al.*, 2005). The benefits of osteoinductive biomaterials lie in their ability to enable the repair of large bone defects (Habibovic *et al.*, 2006; Kruyt *et al.*, 2004; Quarto *et al.*, 2001). Biphasic calcium phosphate (BCP), which was used in the present work, is a ceramic material coupling hydroxyapatite (HA) with beta-tricalcium phosphate (β -TCP), the osteoconductive properties of which have been well-known for decades (Daculsi *et al.*, 1989; Ellinger *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1987; Nery *et al.*, 1990). The different resorption kinetics of the HA and TCP phases play a critical role in the efficacy of BCP: the lower the HA/TCP ratio, the higher the resorbability (Daculsi, 1998). The resorption-precipitation processes that occur on the surface of these types of scaffolds are regarded as major factors implicated in their osteoinductive properties (El-Ghannam and Ning, 2006; Kokubo *et al.*, 2003; LeGeros, 2008). Moreover, porosity, which constitutes one of the main bone-mimetic characteristics, also provides efficiency in osteoconduction and osteoinduction (Habibovic and de Groot,

2007; LeGeros, 2002; Passuti *et al.*, 1989). A macroporosity of 100 μ m to 500 μ m is necessary for cell invasion (Gauthier *et al.*, 1998; Richart *et al.*, 2000; Ripamonti, 1996), while microporosity, defined as interconnected pores of 10 μ m or less, enhances body fluid invasion and protein adsorption via a higher surface area (Daculsi and Layrolle, 2004; Habibovic *et al.*, 2005; Malard *et al.*, 2007). The osteoinductive potential of these specific crystalline phases has already been demonstrated (Le Nihouannen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2002), although some studies reported contradictory results, i.e., a lack of osteoinduction, even in orthotopic sites (Damien and Parsons, 1991; Fellah *et al.*, 2008; Hollinger *et al.*, 1996; Mankani *et al.*, 2007; Nakamura, 1996). Some studies also showed that the shape of a CaP biomaterial had a significant effect on its osteoinductive properties (Ripamonti, 1996; van Eeden and Ripamonti, 1994). However, the combination of such bioactive ceramics with growth factors like BMP-2 achieves much better results in terms of the quantity of newly formed bone (Alam *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1998). The strategy selected in this study consisted of adding either isolated human mesenchymal stem cells (h-MSCs) or human total bone marrow (h-TBM) to the scaffold without a long incubation period, in order to set up an animal model that would be easily transferable to clinical applications. The positive control consisted of the corresponding scaffold, supplemented by rat total bone marrow (rat-TBM).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Granules

Micromacroporous biphasic calcium phosphate (MBCP[®]) and MBCP+[®] granule-shaped scaffolds were provided by Biomatlante SA (Vigneux-de-Bretagne, France). The first had a HA/ β -TCP ratio of 60/40 and the second a ratio of 20/80. One size of granule was tested: 0.5 to 1 mm for both granule types. Granule sterilization was performed at a β -radiation of 25 kGrey.

2.2 Physico-chemical characterizations

The granules were characterized using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, zeta potential measurements, the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method for specific surface area (SSA) measurements, and mercury porosimetry. They were visualized using scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) in order to perform elemental analysis. Granule morphology, grain and crystallite size, pore distribution and SSA were the main parameters studied.

X-ray diffraction was performed using Copper K α radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) with a scan rate of 2s per step and a step size of 0.02° (2θ) on a PW 1830 X-ray generator (Philips). Phase proportions were assessed using the Rietveld method (Maud software package) and crystallite sizes were assessed using the Scherrer formula (Patterson, 1939): $D(hkl) = K \cdot \lambda / [(W_{hkl} - W_0) \cdot \cos\theta]$, where λ is the wavelength of X-ray radiation, K is a constant approximated at 0.89 (Langford and Wilson, 1978), θ is the diffraction angle, W_{hkl} is the experimental full width at half maximum (FWHM) and W_0 is the instrumental FWHM measured according to the widely used LaB₆ standard reference material (NIST SRM 660). Rietveld refinement was performed using HA and β -TCP models from the inorganic crystal structure database (ICSD No. 151414 and No. 6191, respectively).

FTIR spectra were recorded in the range between 4,000 and 400 cm^{-1} on pellets containing 1.5% of samples (Magna IR 550, Nicolet Instruments) in order to study the chemical bonds in the scaffolds. The resolution was 0.1 cm^{-1} .

The samples were sputter coated with gold-palladium before being visualized using SEM (LEO 1450VP) to assess granule and grain size and morphology. An SEM apparatus equipped with an energy dispersive X-ray microanalysis system (EDX Inca x-sight, Oxford Instruments) was used on all samples to determine trace elements and ascertain purity.

Zeta potential was measured using a He-Ne laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$; Zetasizer Nano ZS, Malvern) on BCP particles previously milled and dispersed in deionized water at pH 7.5 with a concentration of $10^{-3} \text{ g.ml}^{-1}$ (1/1000 w/v). BCP particles were also incubated for 24 hours in fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech) in order to assess the changes in zeta potential after proteins had been adsorbed to the scaffolds.

SSA was measured using the BET method by nitrogen adsorption at 77 K (ASAP 2010, Micromeritics).

Pore distributions were assessed by mercury intrusion porosimetry (Autopore IV 9500, Micromeritics). Prior to analysis, the samples were degassed to remove physisorbed gases. A low pressure test was first performed, followed by a high pressure test (varying from 0 to 30000 psi).

2.3 Cell isolation and bone marrow harvesting

Human bone marrow harvesting

H-TBM was harvested from the proximal tibial epiphysis of a young female patient undergoing alveolar bone grafting for cleft palate reconstruction, as approved by the local ethics committee. A total of 8 mL of bone marrow aspirate was collected in heparin tubes.

Rat bone marrow harvesting

Rat-TBM was harvested from the femurs and tibias of two Wistar rats that had been anesthetized by the inhalation of isoflurane (Forene®, Abott, Rungis, France) and sacrificed by an intracardiac overdose of sodium thiopental (Nesdonal®, Rhône-Merieux, France). Each bone was cut open at both ends and 1 mL of TBM was eluted in saline using a small needle attached to a syringe. TBM was immediately transferred to heparin tubes under sterile conditions (Venoject II, Terumo Europe, Louvain, Belgium). BM was harvested to be grafted at a later point in time.

2.4 In vitro tests

h-MSCs were isolated from h-TBM by allowing the cells to adhere to the culture-treated surface of a T75 flask (Corning) for 24 hours. The supernatant was then removed and the remaining cells were cultured in nonosteogenic media in a 5% CO_2 incubator at 37 °C in α -MEM supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin.

After the expansion phase and three passages, confluent cells were detached from the flask using trypsin/EDTA, counted using trypan blue with an hemocytometer, and seeded on MBCP and MBCP+ scaffolds in ultra-low adhesion 24-well plates (1.9cm² per well). The initial inoculum contained 20.10⁶ cells per g of granule.

After 30 minutes, cells were fixed with paraformaldehyde (4% in PBS), dehydrated using a gradually concentrated alcohol bath, and finally immersed in gradually concentrated trichlorotrifluoroethane solutions. The samples were sputter coated with gold-palladium before being visualized using SEM.

2.5 In vivo implantations

Twelve six-week-old female S/SOPF SWISS nude mice were obtained from a certified breeding center (C. River, l'Arbresle, France) and allowed to acclimatize for two weeks to local vivarium conditions (24°C and a 12h/12h light-dark cycle). All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE) and approved by the local ethics committee. Experiments were performed according to Good Laboratory Practice standards at the Faculty of Medicine (Experimental Therapeutics Unit) of Nantes University. All surgical procedures were performed under general anesthesia with 4% isoflurane inhalation for induction and 2% for preservation. A 1-cm transverse incision was made bilaterally on the dorsum of the back. The skin was separated by blunt dissection from the subcutaneous connective tissues and form several pockets under the skin into which the implants were inserted. Each mouse randomly received four implants (n = 6): 50 mg of MBCP and MBCP+ granule-shaped scaffolds (n = 6) either alone, or combined with h-TBM or rat-TBM, or stem cells isolated from h-TBM as described above. The incubation time of h-MS-C or TBM with scaffolds was limited to 30 min to allow cell adhesion with a high density of 20.10⁶ cells/g. Scaffolds alone served as negative controls.

Eight weeks later, the implants were removed immediately after sacrifice and placed in GMMA resin to enable histological analysis and SEM observation. Five histological sections were obtained at 50-µm intervals to make sure to capture all osteoinduced bone. Goldner's staining was used to distinguish newly formed from native bone and biomaterials. An optical microscope (Axioplan 2, Zeiss, Switzerland) was used to evaluate osteoinduction for each histological section. Mice with osteoinduced bone were counted, and this data was used as a first qualitative criterion.

SEM images from the remaining explants embedded in GMMA resin were analyzed using Qwin software (Leica Microsystems, Germany) to obtain a second quantitative criterion based on the area ratio of osteoinduced bone/biomaterial (%). Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed based on these results with post-hoc comparisons using Fisher's LSD.

Specific notation was chosen to distinguish and classify each condition. This qualitative notation included two criteria. The first was the total number of mice in which osteoinduction was observed; the second was the assessment of bone quantity obtained by image analysis. Finally, three classes of osteoinduction quality were differentiated. The first class was defined

as the “presence of a small amount of induced bone in few mice”, the second as “presence of a small amount of induced bone in all mice”, underlining the systematic osteoinductive effect, and the third as “presence of a large amount of induced bone in all mice”.

3. RESULTS

3.1 SEM

A high level of similarity was observed between MBCP and MBCP+. The morphology and size of granules, as well as grain size, macro- and microporosity, were confirmed to be homogeneous among each group. Macropores covered most of the surface of the granules, with trays interposed between them (Fig. 1a). The concavity of the macropores is very pronounced, thereby increasing the surface area. Grains had a diameter of less than 1 μm (Fig. 1b) for both MBCP and MBCP+. Micropore diameter was evaluated at less than 1 μm for both granule types.

3.2 Infra-red spectroscopy

Infrared spectra (Fig. 2) were used to confirm purity and chemical composition by comparing with reference materials. Briefly, phosphate (PO_4^{3-}) ν_1 and ν_3 stretching bands appeared between 1,100-900 cm^{-1} (peaks group I) and ν_4 stretching bands between 600-550 cm^{-1} (peaks group II), while apatitic hydroxyl peaks were visible at 3,572 and 630 cm^{-1} only for HA-containing compounds.

The profiles of the BCP 60/40 and 20/80 spectra were very similar to the profiles of the pure HA and TCP phases, respectively, but nevertheless presented distinct hybrid characteristics. The group I profile of phosphate 60/40 peaks appeared larger, as is also the case for pure TCP, although the general profile (group of peaks I and II) was more similar to the pure HA spectrum. The same observation could be made for the group II profile of 20/80 peaks, which appeared broader towards higher binding energies, as is the case for pure HA, while the profile was more symmetric with pure TCP.

3.3 X-Ray diffraction

Diffraction patterns of manually grinded granules showed that only the HA and β -TCP phases were present, as expected for both types of granule. Because the sintering temperature was below 1,200°C, the possibility of obtaining the α -TCP phase was excluded (Brown *et al.*, 2010), which was confirmed by the absence of its specific peaks. The main peaks of β -TCP and HA were at 2θ values of 31.03° and 31.75°, respectively, and were correlated to [0;2;10] and [1;2;1] preferential crystallographic axis directions, respectively (Fig. 3).

Crystallite size assessment using Scherrer equations indicated that crystal diameters were in the range of 250 to 300 nm. No difference was found between MBCP and MBCP+ (Table 1).

3.4 Zeta Potential

The zeta potential of BCP particles in water (pH 7.5) can be classified into two categories (-20mV and -30mV), both of which were negatively charged according the HA/TCP ratio (Table 2). The adsorption of proteins after incubation in serum stabilized the charge around -19mV.

3.5 Specific surface area

MBCP and MBCP+ have SSAs of the same order of magnitude, between 3 and 6 g/m², but the SSA of MBCP+ was found to be 20% larger (Fig. 4).

3.6 Mercury porosimetry

MBCP and MBCP+ had similar pore distribution profiles (Fig. 5), with 30% of macropores between 50 μm and 500 μm, 10% of mesopores between 10 μm and 50 μm, and 60% of micropores smaller than 10 μm.

3.7 In vitro study

Isolated h-MSCs mostly adhered to the inside of the macropore concavities, as observed in Fig. 6a and 7a. An interesting finding was that an already-present extracellular matrix was actually inoculated instead of only isolated cells, because of the very large amount of confluent cells previously detached from the flask (Fig. 6b and 7b). Cell extensions (pseudopodia and filopodia) were observed after only 30 min (Fig. 8), which indicated that surface rugosity and chemistry were favorable.

The association of H-TBM with granules was revealed by a large coating of their surface by white and red rounded blood cells (Fig. 9a and 10a). Medullary matrices from bone marrow were also observed on the surface of granules (Fig. 9b and 10b). Sporadically, adhering spread cells were observed, which could have been mesenchymal bone marrow cells (Fig. 9c). Platelets were also found at the surface of granules (Fig. 10c).

3.8 In vivo explantation analysis

Newly formed bone was clearly apparent around granules (Fig. 11 and 12). The least efficient osteoinduction was observed in scaffolds alone, followed closely by scaffolds with human bone marrow. Not a single mouse exhibited any osteoinduction in the presence of seeded human mesenchymal stromal cells on any type of scaffold, while rat bone marrow with scaffolds acted as a positive control, with very large amounts of osteoinduced bone. Slightly better osteoinduced bone results were systematically detected with MBCP+ (Fig. 13a). MBCP and MBCP+ scaffolds alone provided minimal osteoinduced bone (0.15% and 1.3% of biomaterial surface, respectively). No induced bone was found after eight weeks for MBCP or MBCP+ in the presence of isolated h-MSCs. Rat-TBM acted as a positive control, as large amounts of osteoinduced bone were noted for both granule types (up to 35% of biomaterial surface). h-TBM provided very little induced bone, approximately the same amount as scaffolds alone, although MBCP+ scaffolds generally increased the number of mice where bone was detected in comparison with MBCP (six vs. two mice). The quantity of induced bonewas also slightly higher for MBCP+ supplemented with h-TBM compared with MBCP

(1.8% and 0.3% of biomaterial surface, respectively), although it but remained at the same low level as scaffolds alone.

It was noticed that some histological sections did not reveal any induced bone, whereas SEM images of embedded explants did, and *vice versa*. Thus, it seems that a total of five histological sections with a 50- μ m interval was insufficient to ensure accurate targeting of the region of interest (the osteoinduction area). For this reason, the number of mice presenting bone formation was determined here by combining SEM and histological results (Fig. 13b).

The statistical analysis of image results using two-way ANOVA did not reveal any significant difference between MBCP and MBCP+ (Fisher LSD post-hoc: $p=0.69$), whether between scaffolds alone and scaffolds with h-TBM conditions, although the results were slightly better with MBCP+ (Fig. 13a) (Fisher LSD post-hoc: $p=0.95$). However, highly significant differences were found between the interaction groups [rat-TBM/MBCP, rat-TBM/MBCP+] and all others interactions considering h-TBM and scaffolds alone conditions (Fisher LSD post-hoc: $p<0.05$).

Finally, the results of this study can be summarized as follows (Fig. 13c):

Rat-TBM >> h-TBM > scaffolds only > isolated h-MSCs and MBCP+ > MBCP.

DISCUSSION

In the present study, a similarity in granule morphology and pore distribution was found when comparing MBCP and MBCP+, but no visual difference was noticed in macro- or microstructure. Non-bioactive phases (Best *et al.*, 2008), such as calcium oxide (CaO) and tetracalcium phosphate (TTCP) were absent from the XRD diffractograms. Both scaffold types revealed a controlled chemical composition on FTIR analysis, without any undesirable lattice substitutions, such as with carbonates, involving several changes in main BCP characteristics (Shi, 2006). Micropores were found to be interconnected in the inner volume of granules, as only surface micropores could not reach such a volume level, as shown by mercury porosimetry. Only differences in HA/TCP ratio, zeta potential and a slight difference in SSA were observed. Indeed, the higher absolute zeta potential of MBCP+, combined with its 20% greater SSA may explain the slightly better results obtained with MBCP+ when using h-TBM. It was also noted that the 20/80 ratio showed a higher negative charge, which is correlated with higher β -TCP phase presence (Kinnari *et al.*, 2009). The adsorption of proteins after incubation in serum stabilized the zeta charge around -19mV, which is still a domain of instability; this is likely to lead to flocculation and to contribute to the known phenomena of reprecipitation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions (LeGeros, 2002). SSA measurements conformed to expected values (Fellah *et al.*, 2008). These SSAs are available for protein and body fluid absorption (Habibovic *et al.*, 2005).

No difference was found in the way cells attached and spread with each type of granule *in vitro*. The main difference was detected *in vivo*, when BCP scaffolds were combined with h-TBM. The amount of osteoinduced bone obtained with human bone was much smaller than that obtained with rat bone marrow; this raises the problem of homology between human and murine metabolisms. Although nude mice constitute a good model to evaluate the bony potential of xenografts like human or rat TBM, the host probably reacts differently to each type of graft. Because bone metabolism is faster in rats and mice than in humans, we can assume that new bone formation after eight weeks was probably delayed in h-TBM compared with rat-TBM implants. Therefore, a second hypothesis must be considered. As has previously been observed, bone heals faster if the number of MSCs in the bone marrow is higher (Hernigou *et al.*, 2005). Moreover, it has been observed that the number of MSCs obtained from TBM was higher in rats than humans (Cuomo *et al.*, 2009). In the present study, the protocol used for h-TBM harvesting was not the gold standard. First, TBM was harvested from the tibial epiphysis. This site is not as rich in hematopoietic bone marrow as the iliac crest. Second, TBM was collected during a bone harvesting procedure, immediately after curettage of cancellous bone, leading to the dilution of TBM in blood. This might explain the poor results observed with h-TBM. In addition, the huge standard deviation observed with rat-TBM highlights the difficulty in reproducing a biological phenomenon. Rat-TBM works well as a positive control for osteoinduction in subcutaneous sites (Miron and Zhang, 2012).

The result obtained in the present study, i.e., the absence of any bone growth with a high quantity of MSC mixed with BCP (20 million cells / g of material), is unexpected. Moreover, when compared with the material alone, MSCs seemed to have inhibited osteoinduction. These findings contradict those described in the recent literature (Arinzeh *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2002; Kadiyala *et al.*, 1997; Rath *et al.*, 2012). The main specificity of our study was the much higher cell concentration combined with scaffolds. These cells need nutrients and oxygen to survive. Therefore, we can hypothesize that very confluent cells embedded in a dense extracellular matrix formed a coherent-cell gel. In such conditions, this gel could have prevented nutrients from reaching the cells. Massive cell death a few days after subcutaneous implantation has been observed (Boukhechba *et al.*, 2011; Deschepper *et al.*, 2011). Similarly, this gel could have reduced protein or growth factor adsorption in the micropores, preventing the recruitment of host stem cells. This mechanical barrier could explain the lack of bone formation observed with MSCs. This result leads to the hypothesis of an efficacy range of cell concentration for bone tissue engineering, beyond which seeded cells have a counterproductive effect.

If MSC death occurs in the early phase of osteogenesis, the efficacy of using of high doses of MSCs as the single source of progenitor cells in tissue engineering might therefore be uncertain. In contrast, TBM naturally contains a large number of chemotactic and osteogenic factors that can act synergistically with mesenchymal and hematopoietic progenitor cells in a homeostatic environment, in a process consistent with the role of osteogenesis in normal bone, even at heterotopic sites.

The HA/TCP ratio had a minor but observable effect on osteoinductive performance, although results were slightly better with MBCP+ 0.5-1mm, as described above and in accordance with the literature (Habibovic *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006). Unexpected discrepancies between TBM and h-MSC results indicate that TBM present inherent specific bioactive properties that are favorable to bone formation in ectopic sites (Barradas *et al.*, 2011).

Our results reveal minimal formation of osteoinduced bone after eight weeks by scaffolds alone, which is in contradiction with what is commonly accepted, and highlights the range of options for adjusting key parameters such as the initial amount of isolated stem cells, or the quality of the TBM harvest. The role of macropores concavities has already been demonstrated as a relevant factor to promote osteoinduction (Ripamonti and Roden, 2010).

The source of bone-forming cells in ectopic sites, whether native cells recruited from the host or cells provided from tissue engineering, warrants further investigation with MBCP and MBCP+ scaffolds. Other biological agents, such as human platelet-rich plasma (h-PRP) and human total blood are currently being tested in combination with these granules, in order to compare the effects of each independent factor (platelets, stem cells, growth factors, proteins, enzymes, etc.) (Djouad *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

The subcutaneous implantation in nude mice of MBCP® and MBCP+® CaP granules revealed the osteoinductive potential of these matrices alone, with MBCP+® exhibiting superior qualities. The addition of h-TBMs to these matrices had a slight impact on improving bone formation in our study compared with highly osteoinductive rat-TBM. The addition of a very large amount of confluent h-MSCs to these matrices led to systematic inhibition of bone formation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Reborne 7th PCRD HEALTH-2009-1-4-2 (GA n° 241879). The authors would like to thank Paul Pilet, Thierry Rouillon, Hélène Terrisse, Stéphane Grolleau, Nicolas St ephant, Julien Guiol and Roman Hossein Khonsari for their participation to this work.

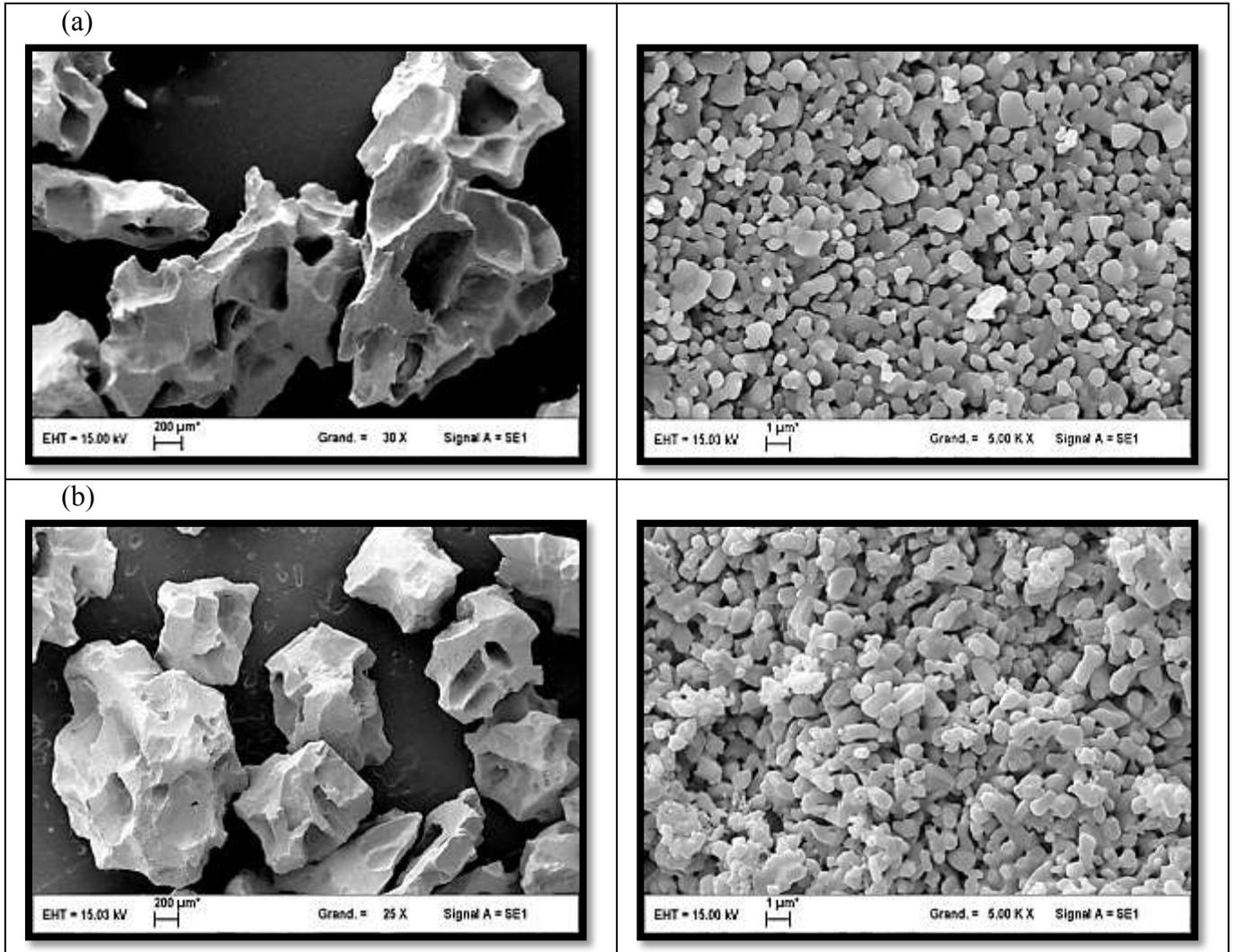


Figure 1: SEM images of (a) MBCP scaffold macro- (left) and microstructure (right) (b) MBCP+ macro- (left) and microstructure (right)

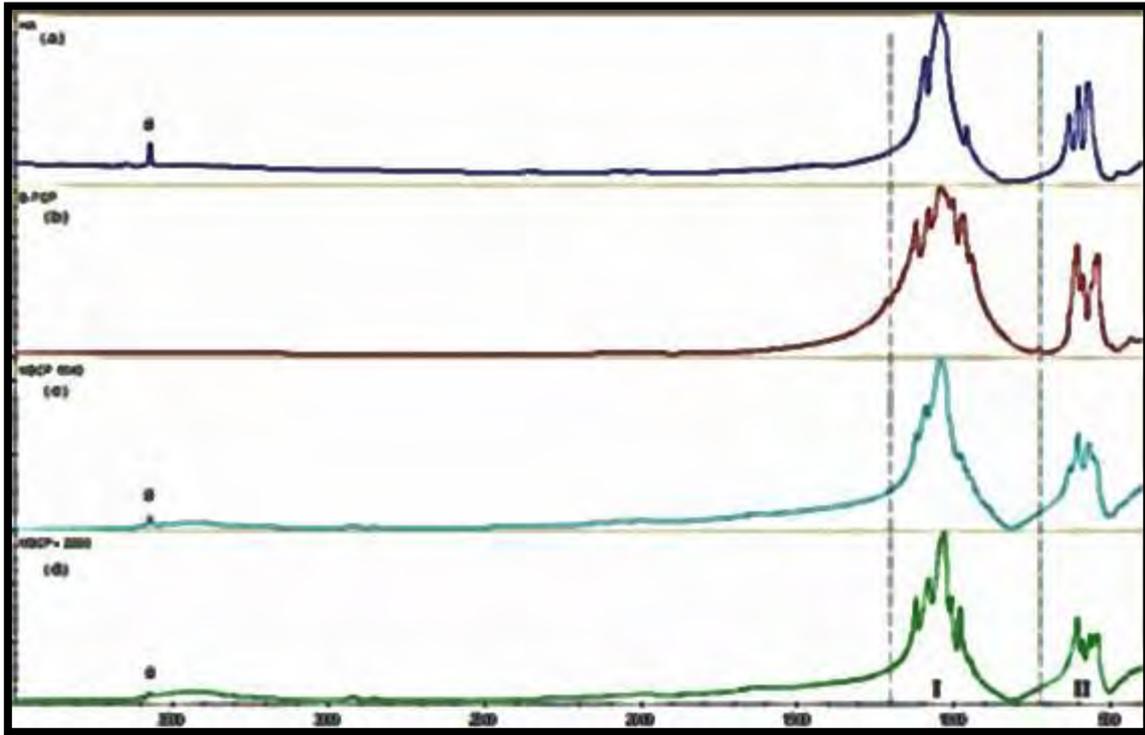


Figure 2: FTIR spectra based on KBr discs (a) pure HA, (b) pure β -TCP, (c) MBCP, (d) MBCP+. These symbols point out the easily identifiable apatitic hydroxyl peak at 3572 cm^{-1} . I and II symbols for phosphates ν_1 - ν_3 and ν_4 respectively.

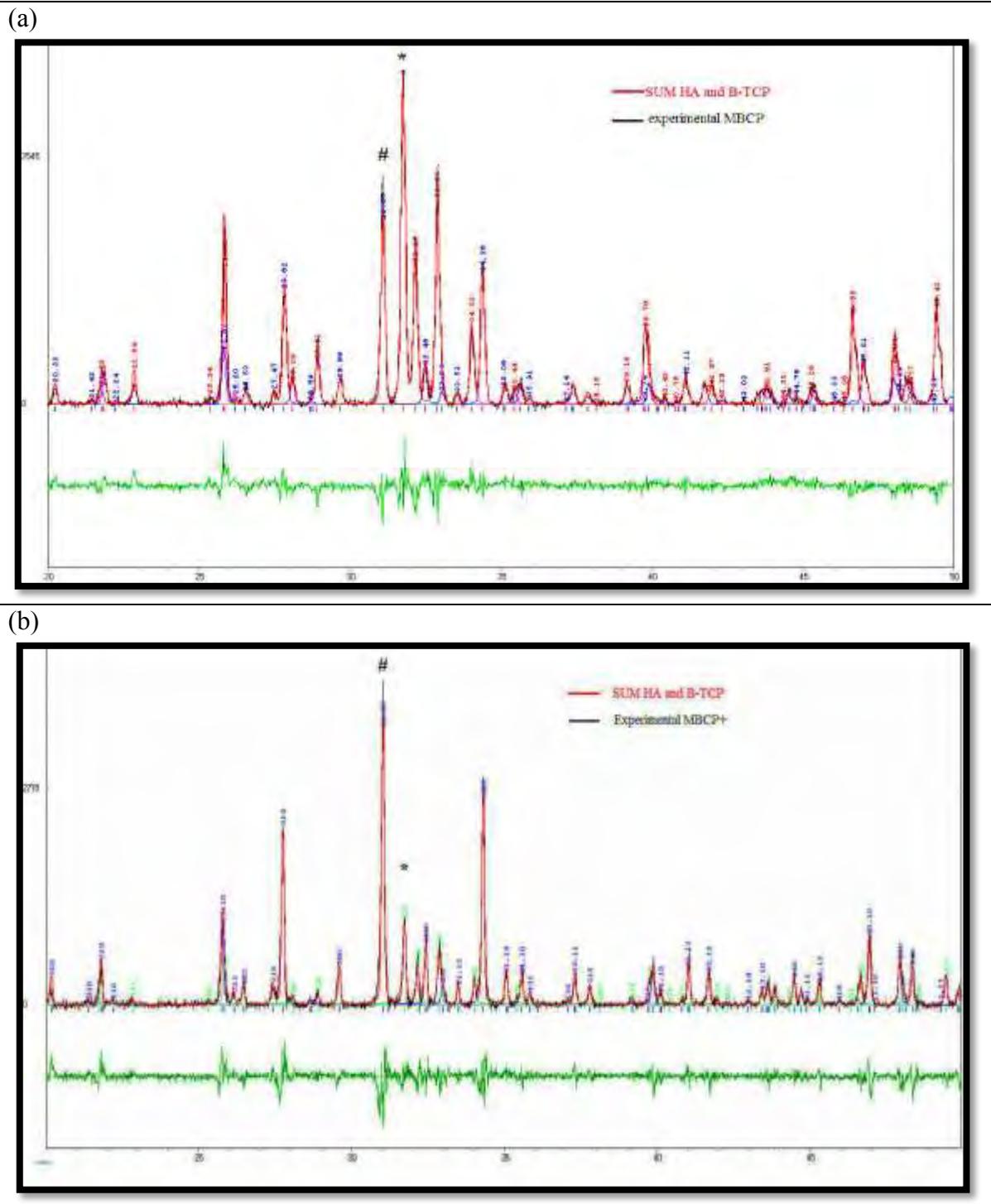


Figure 3: Diffractograms of (a) MBCP, (b) MBCP+. These show the main peak of β -TCP, and star the main peak of HA.

Scherrer Calculation for crystals size (nm)		Volume presence of HA and β -TCP by Rietveld refinement (%)	
MBCP :	272 (5)	HA 58.2	β -TCP 41.8
MBCP+:	265 (12)	HA 19.8	β -TCP 80.2

Table 1: Crystal size calculation by Scherrer formula and phase proportion by Rietveld Refinement.

ζ potential (mV)		
	MBCP	MBCP+
alone	- 21.10 (0.35)	- 33.10 (0.55)
incubated in SBF	-19.02 (1.38)	- 19.72 (1.40)

Table 2 : Zeta potential of different BCP microparticles in suspension into water solution (pH 7.5). Standard deviation in brackets.

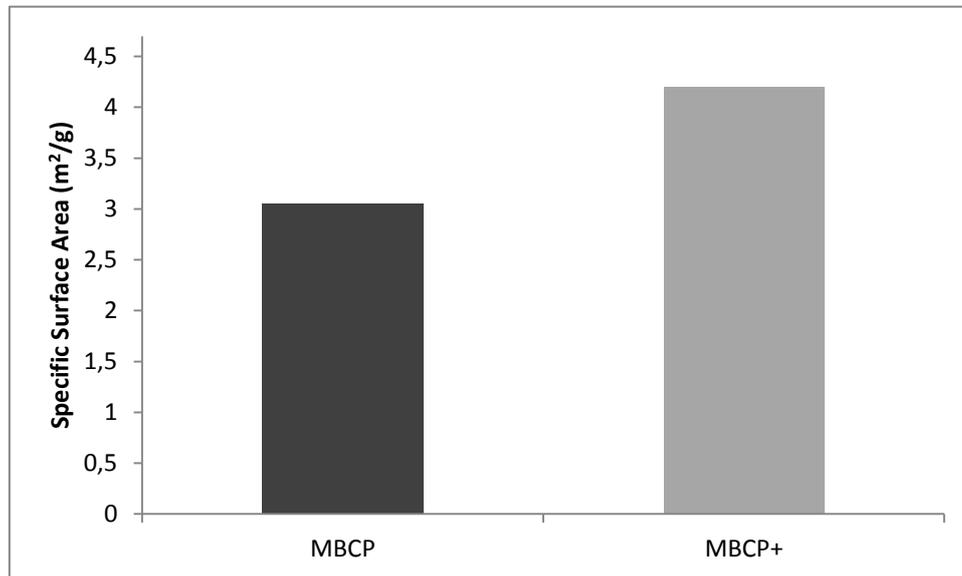


Figure 4: Semi-quantitative SSA comparison between MBCP and MBCP+ (m²/g).

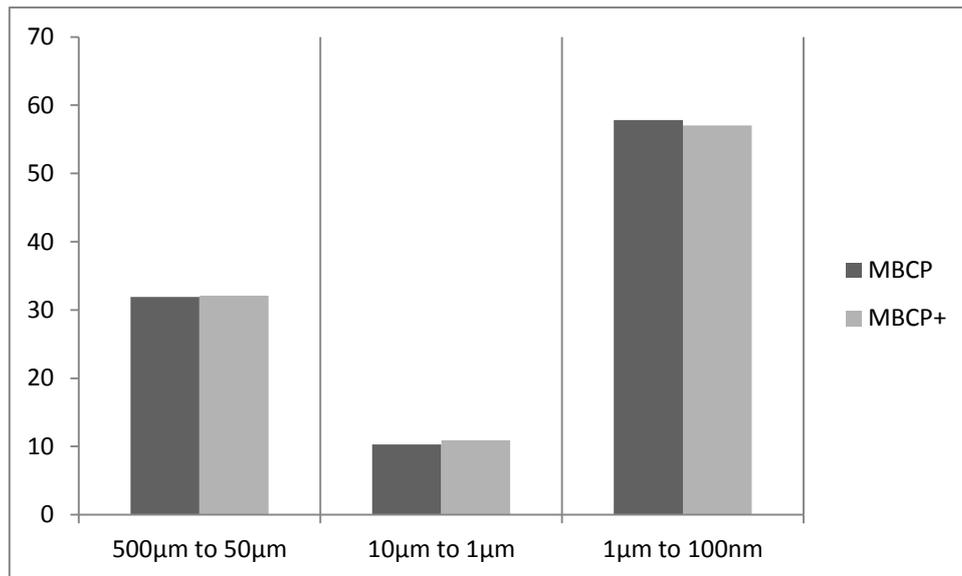


Figure 5: Semi-quantitative comparison of pore distributions between MBCP and MBCP+

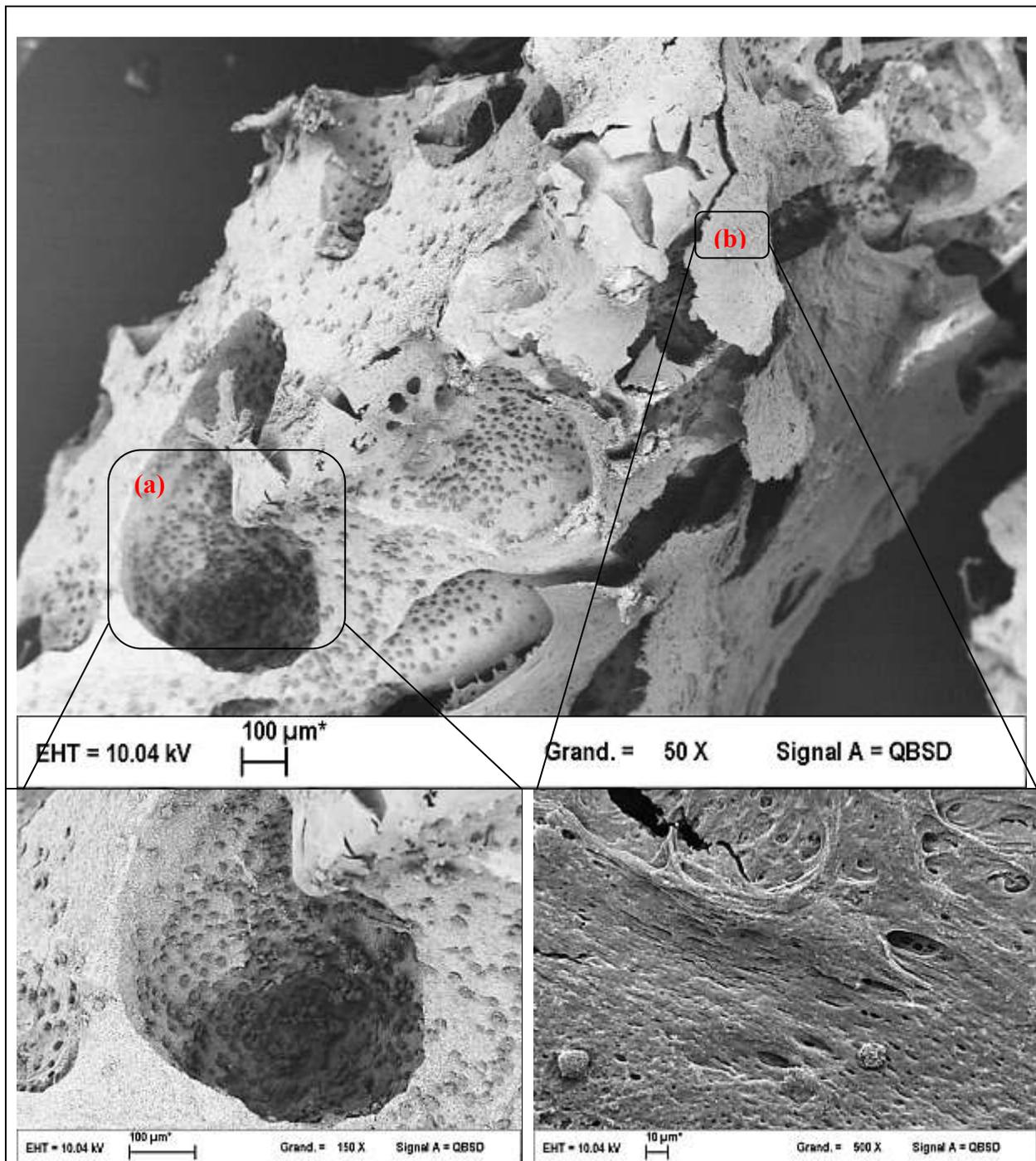


Figure 6: SEM pictures of h-MSC seeded on MBCP after 30 min. (a) Concavity of macropores full of adhering cells. (b) Extracellular matrix deposits on scaffold

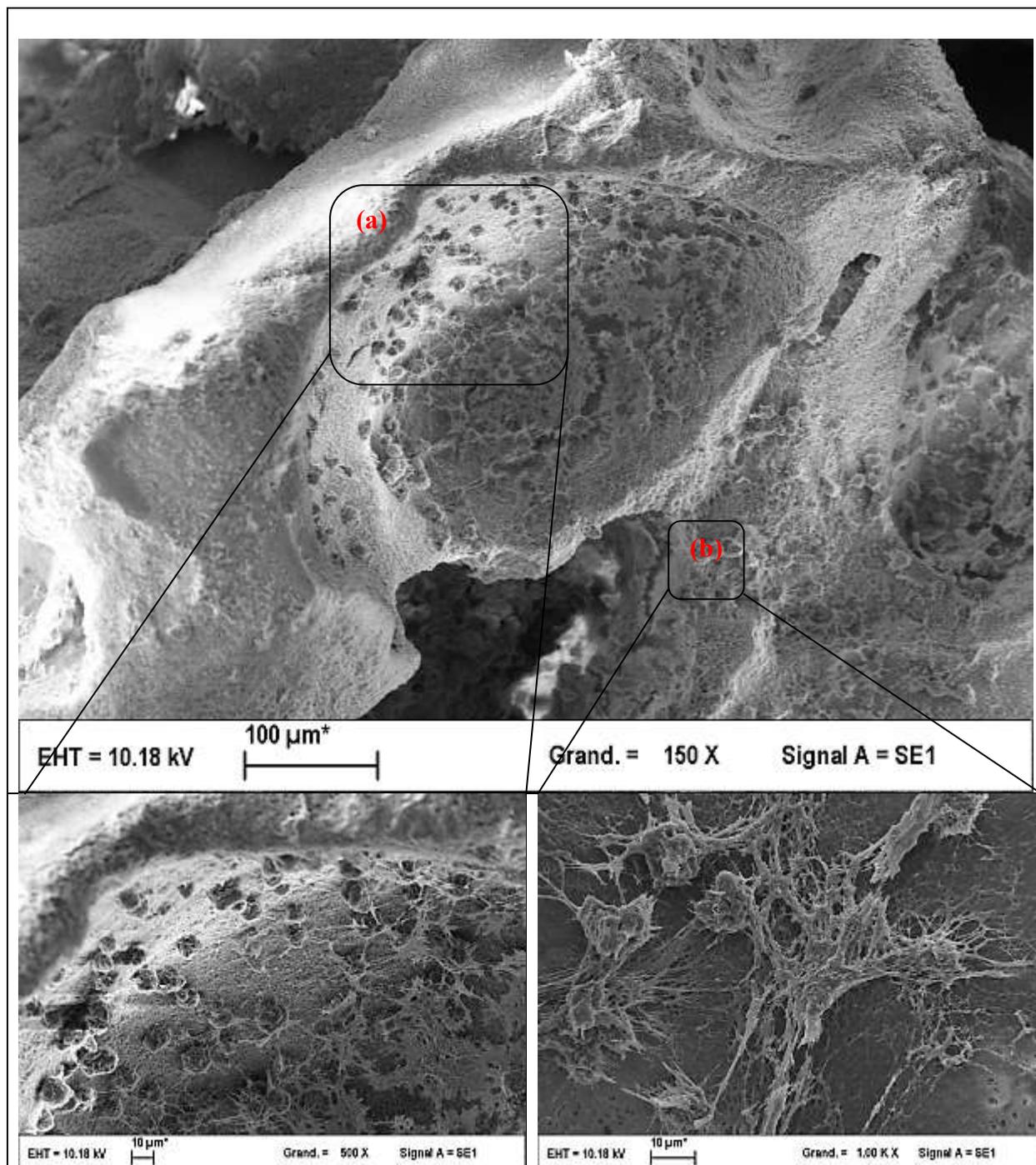


Figure 7: SEM pictures of h-MSC seeded on MBCP+ after 30 min. a) Concavity of macropores full of adhering cells. b) Cells and extracellular matrix deposits on scaffold

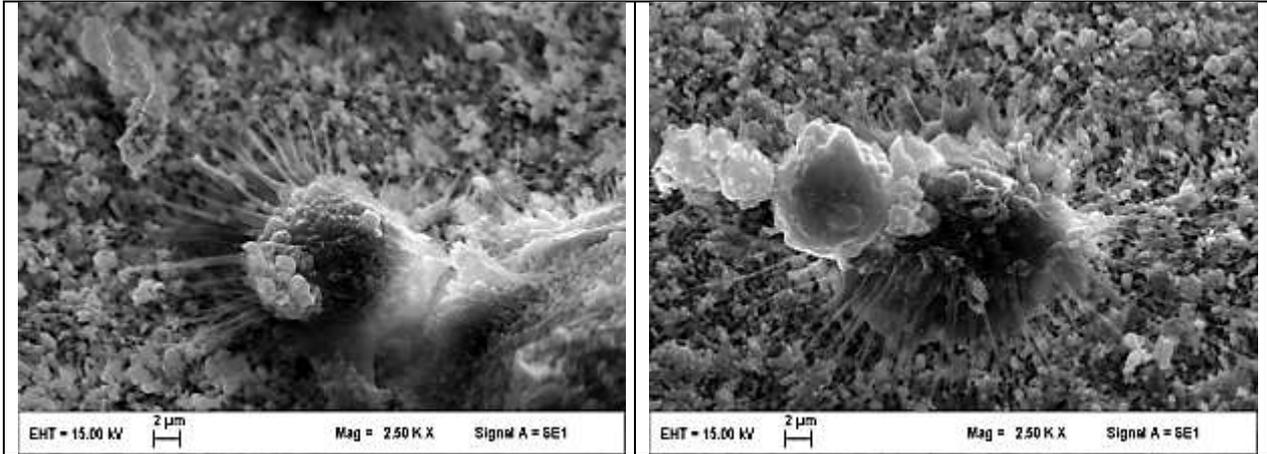


Figure 8: h-MSC adhesion on MBCP (left) and MBCP+ (right) after 30min

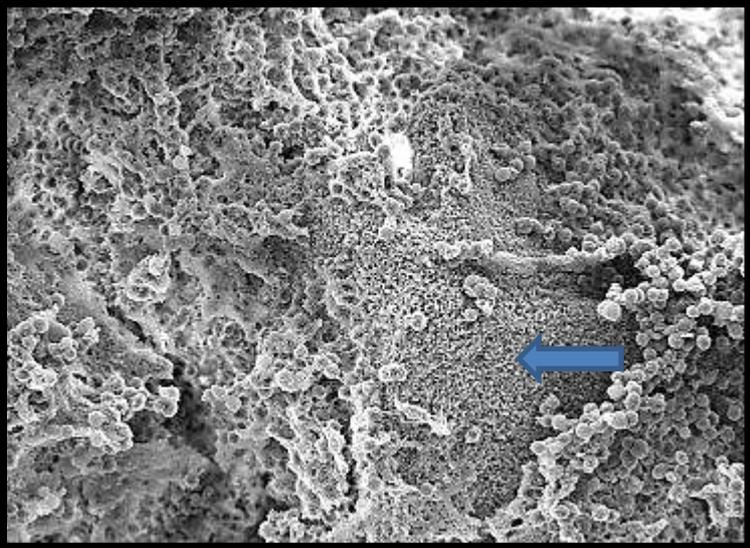
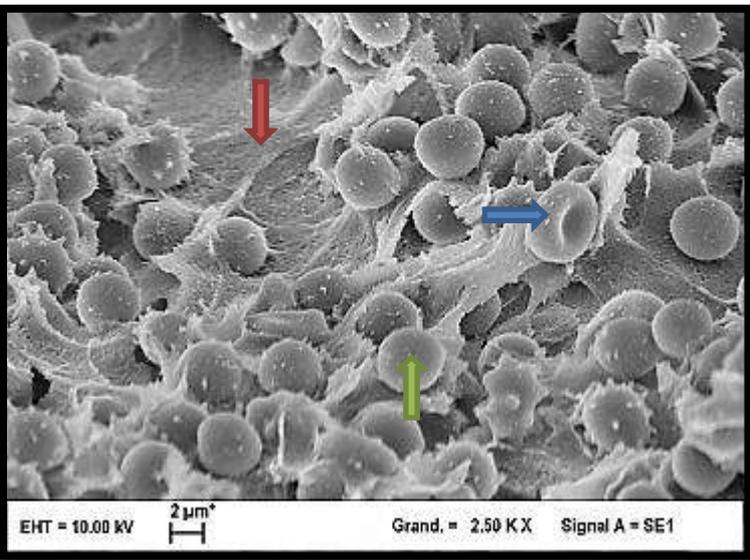
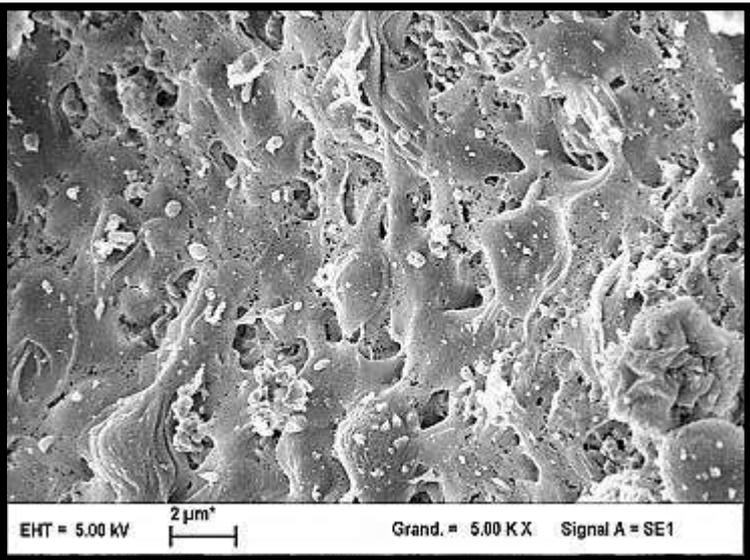
	<p>(a) X500 A granule covered by human total bone marrow with some non-covered area (blue arrow)</p>
 <p>EHT = 10.00 kV 2 μm* Grand. = 2.50 KX Signal A = SE1</p>	<p>(b) X2500 White (green arrow) and red blood cells (blue arrow) Medullary matrix (red arrow)</p>
 <p>EHT = 5.00 kV 2 μm* Grand. = 5.00 KX Signal A = SE1</p>	<p>(c) X5000 Adhering cells (h-MSC?)</p>

Figure 9 : SEM pictures of MBCP with human-TBM after 30 min

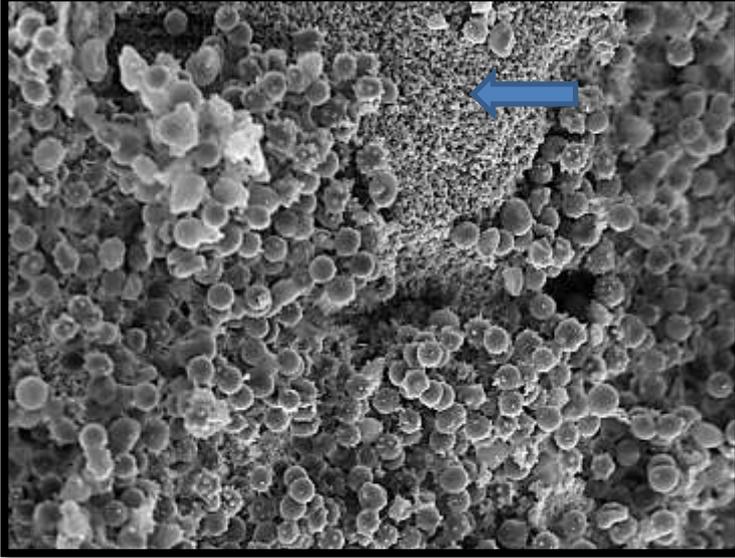
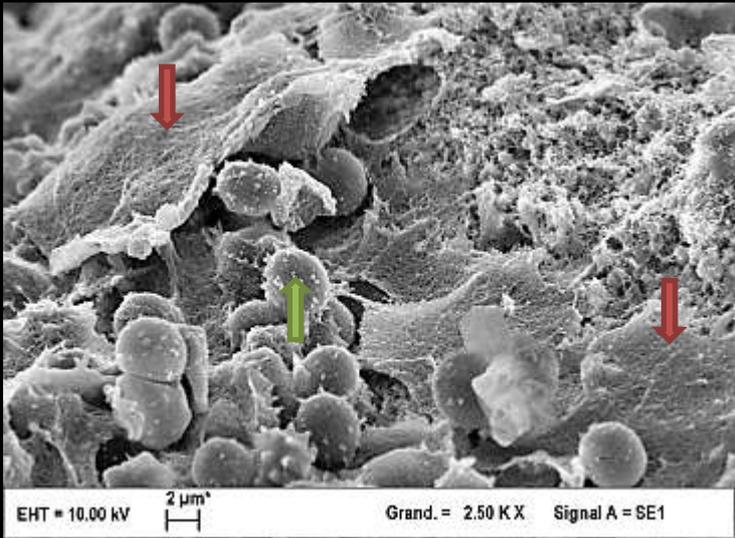
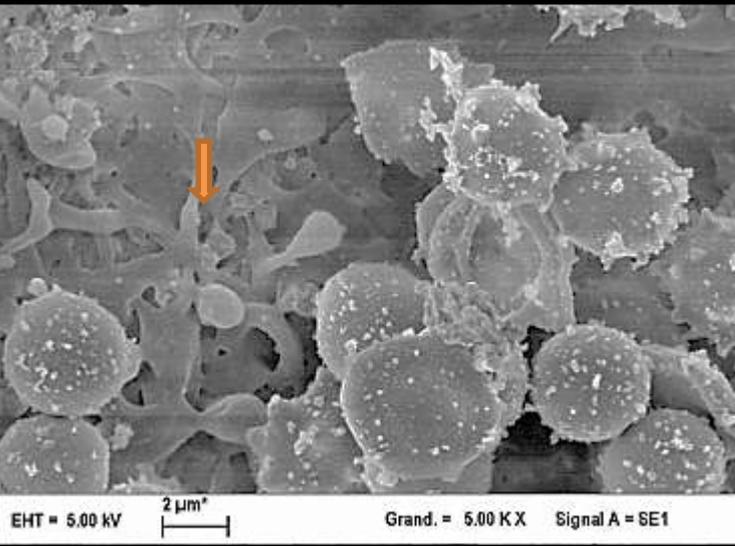
	<p>(a) X500 A granule covered by human total bone marrow with some non-covered areas (blue arrow)</p>
 <p>EHT = 10.00 kV 2 μm Grand. = 2.50 K X Signal A = SE1</p>	<p>(b) X2500 White blood cells (green arrow) Medullary matrix (red arrows)</p>
 <p>EHT = 5.00 kV 2 μm Grand. = 5.00 K X Signal A = SE1</p>	<p>(c) X5000 Adhering platelets (orange arrow)</p>

Figure 10 : SEM pictures of MBCP+ with human-TBM after 30 min

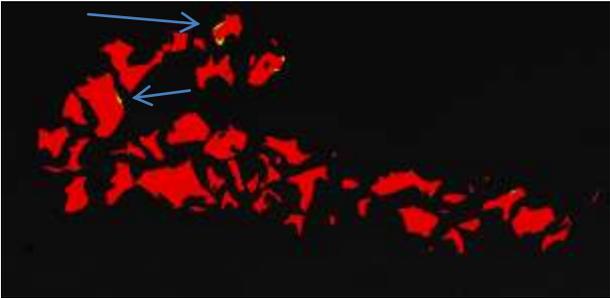
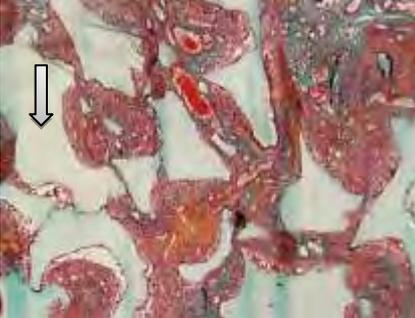
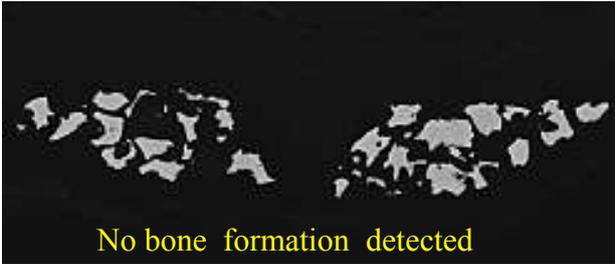
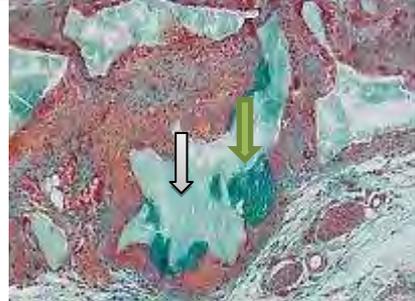
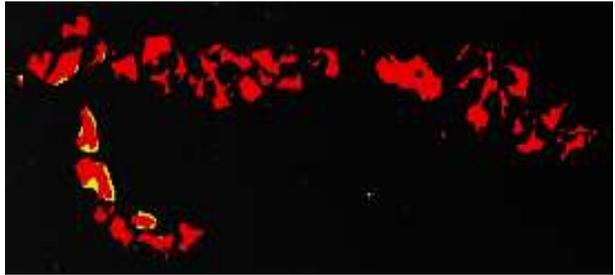
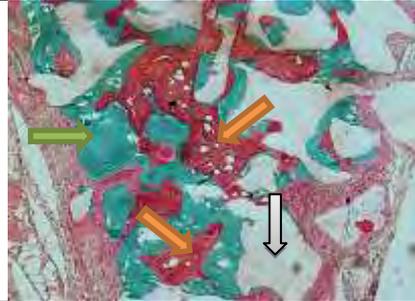
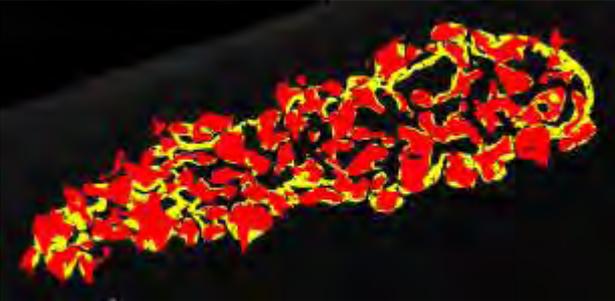
Scaffold Alone		
Isolated h-MSC		 <p>No bone formation detected</p>
h-TBM		
Rat-TBM		

Figure 11 : Goldner's staining (first column), and SEM image analysis (second column) of embedded explants from dorsolateral sites of mice after eight weeks with MBCP+. For histological sections: osteoinduced bone in dark green (green arrows), CaP scaffold sites in white and light green (white arrows) and bone marrow in dark red (orange arrows). For image analysis: CaP scaffolds in red and osteoinduced bone in yellow (blue arrows).

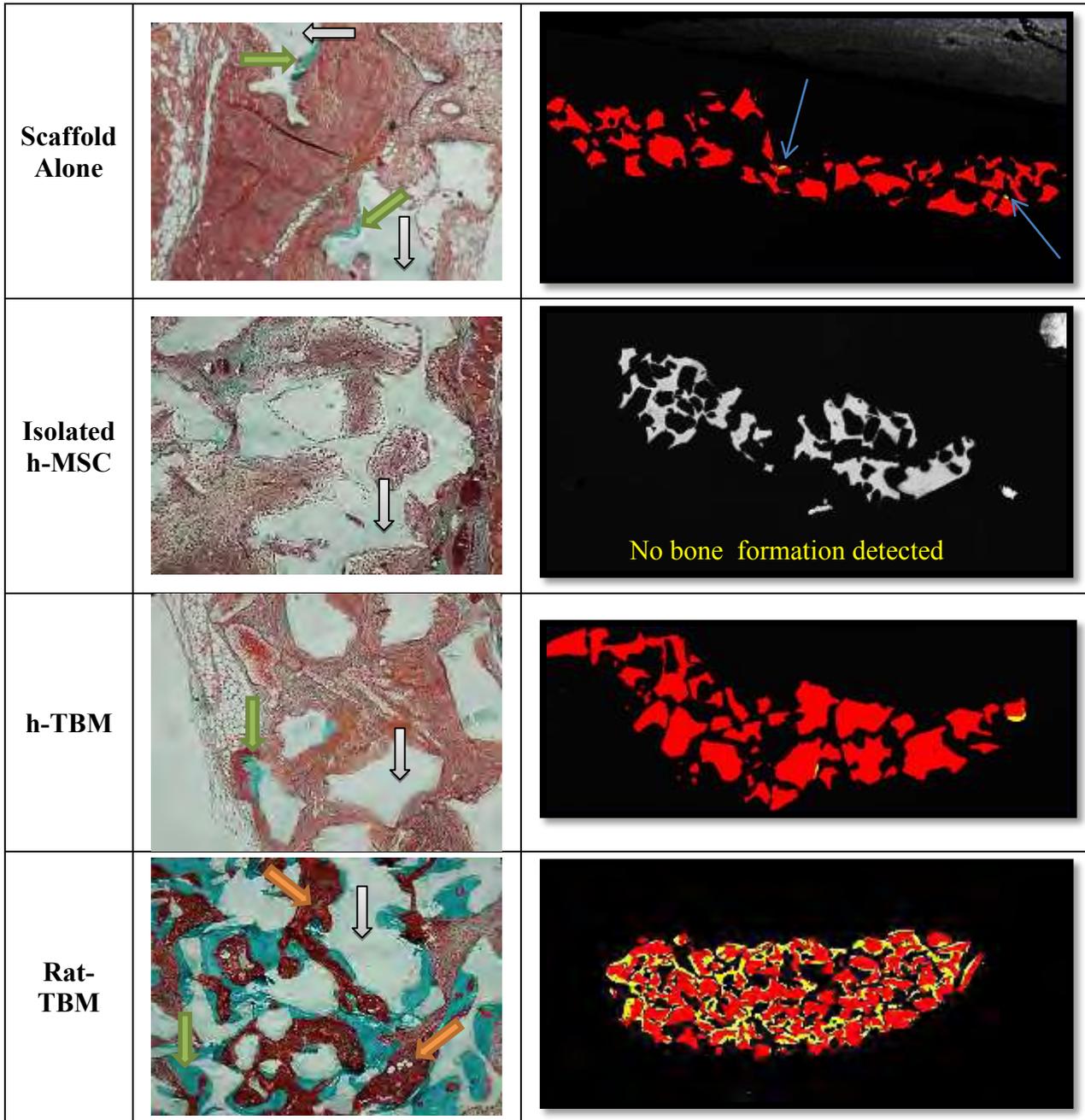
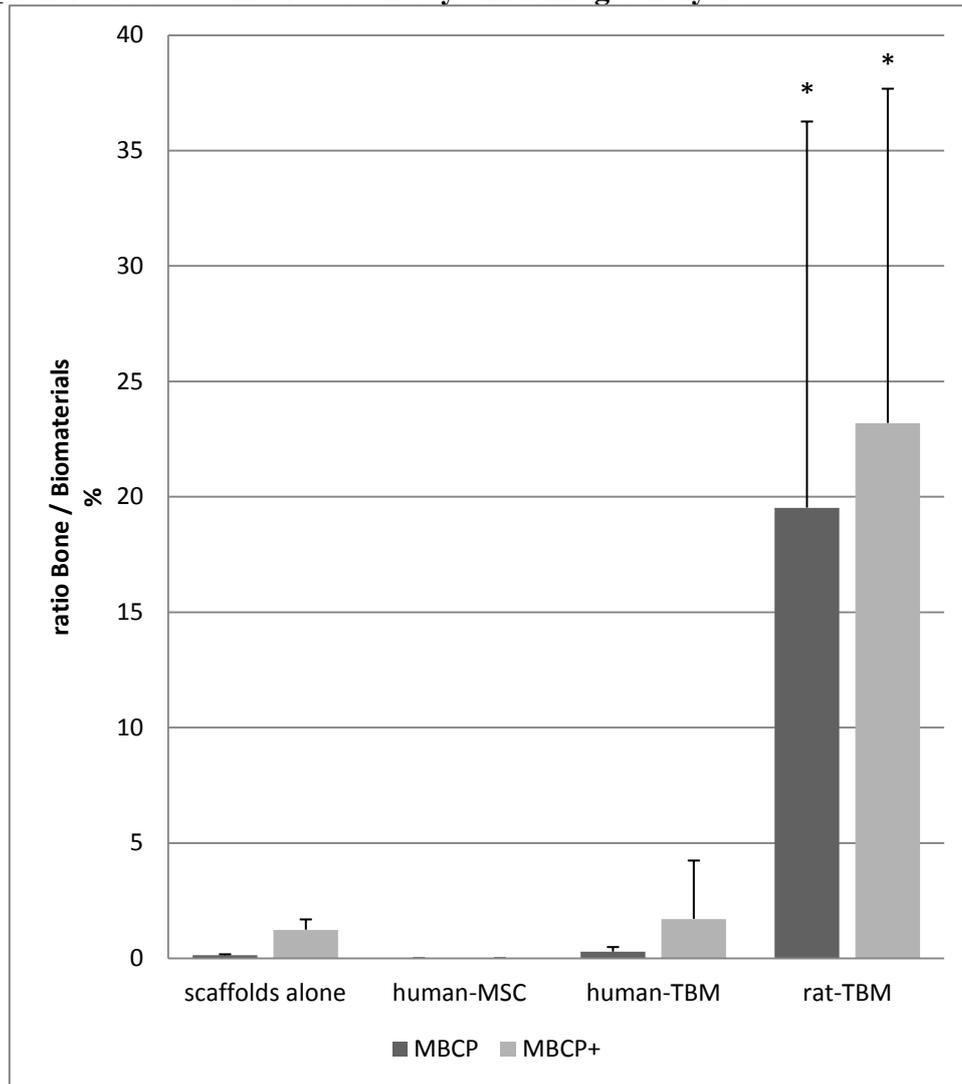


Figure 12: Goldner's staining (first column), and SEM image analysis (second column) of embedded explants from dorsolateral sites of mice after eight weeks with MBCP. For histological sections: osteoinduced bone in dark green (green arrows), CaP scaffold sites in white and light green (white arrows) and bone marrow in dark red (orange arrows). For image analysis: CaP scaffolds in red and osteoinduced bone in yellow.

a) Quantitative osteoinduced bone by SEM image analysis



*: highly significant difference between rat-TBM and others conditions (Anova, Fisher LSD post-hoc, $p < 0.05$)

b) Number of mice presenting osteoinduced bone

	Alone	isolated h- MSC	h-TBM	rat-TBM
MBCP	3/6	0/6	2/6	6/6
MBCP+	3/6	0/6	6/6	6/6

c) Resulting combinative notation of osteoinduction quality

	Alone	isolated h- MSC	h-TBM	rat-TBM
MBCP	+	-	+	+++
MBCP+	+	-	++	+++

Figure 13: Number of mice in which osteoinductive bone was found (SEM and histological sections) and qualitative notation of osteoinduction after eight weeks. Note for c) +: presence of a small amount of induced bone in few sites / presence of a small amount of induced bone in all sites / +++: presence of a large amount of induced bone in all sites

REFERENCES

- Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S (2001) Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials* **22**: 1643-1651.
- Arinzech TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G (2005) A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* **26**: 3631-3638.
- Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P (2011) Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European cells & materials* **21**: 407-429; discussion 429.
- Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J (2008) Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* **28**: 1319-1327.
- Boukhechba, F., T. Balaguer, et al. (2011). Fate of Bone Marrow Stromal Cells in a Syngenic Model of Bone Formation. *Tissue Engineering Part A* **17**(17-18): 2267-2278.
- Brown O, McAfee M, Clarke S, Buchanan F (2010) Sintering of biphasic calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **21**: 2271-2279.
- Cuomo AV, Virk M, Petrigliano F, Morgan EF, Lieberman JR (2009) Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **91**: 1073-1083.
- Daculsi G (1998) Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**: 1473-1478.
- Daculsi G, Layrolle P (2004) Osteoinductive Properties of Micro Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics. *Key Engineering Materials* **254-256**: 1005-1008.
- Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B (1989) Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *Journal of biomedical materials research* **23**: 883-894.
- Damien CJ, Parsons JR (1991) Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials* **2**: 187-208.
- Deschepper, M., K. Oudina, et al. (2011). Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**(7): 1505-1514.
- Djouad F, Gu, rit D, Marie M, Toupet K, Jorgensen C, No, l D, le (2012) Mesenchymal Stem Cells: New Insights into Bone Regenerative Applications. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* **2**: 14-28.
- Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T (2002) Promotion of bone formation using highly pure porous [beta]-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* **23**: 4493-4502.
- El-Ghannam A, Ning CQ (2006) Effect of bioactive ceramic dissolution on the mechanism of bone mineralization and guided tissue growth in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **76A**: 386-397.
- Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL (1986) Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **6**: 22-33.
- Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P (2008) Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* **29**: 1177-1188.
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* **19**: 133-139.

Habibovic P, de Groot K (2007) Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* **1**: 25-32.

Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K (2006) Relevance of Osteoinductive Biomaterials in Critical-Sized Orthotopic Defect. *Journal of Orthopaedic Research* **24**: 867-876.

Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* **26**: 3565-3575.

Hernigou, P., A. Poignard, et al. (2005). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. *J Bone Joint Surg Am* **87**(7): 1430-1437.

Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D (1996) Role of bone substitutes. *Clinical orthopaedics and related research* **324**: 55.

Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP (1997) Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue engineering* **3**: 173-185.

Khlusov IA, Karlov AV, Sharkeev YP, Pichugin VF, Kolobov YP, Shashkina GA, Ivanov MB, Legostaeva EV, Sukhikh GT (2005) Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces. *Bulletin of experimental biology and medicine* **140**: 144-152.

Kinnari TJ, Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Sánchez-Muñoz O, Sánchez-Salcedo S, Colilla M, Vallet-Regí M, Gomez-Barrena E (2009) Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of medical microbiology* **58**: 132-137.

Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* **24**: 2161-2175.

Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004) Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **22**: 544-551.

Langford JI, Wilson AJC (1978) Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography* **11**: 102-113.

Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P (2005) Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* **36**: 1086-1093.

LeGeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical orthopaedics and related research*: 81-98.

LeGeros RZ (2008) Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews* **108**: 4742.

Liang G, Yang Y, Oh S, Ong JL, Zheng C, Ran J, Yin G, Zhou D (2005) Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* **26**: 4265-4271.

Malard O, Gautier H, Daculsi G (2007) In Vivo Demonstration of 2 Types of Microporosity on the Kinetic of Bone Ingrowth and Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics Resorption Key Engineering Materials **361-363**: 1233-1236.

Mankani MH, Kuznetsov SA, Robey PG (2007) Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density. *Experimental hematology* **35**: 995-1004.

Miron R, Zhang Y (2012) Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *Journal of Dental Research*.

- Moore DC, Chapman MW, Manske D (1987) The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **5**: 356-365.
- Nakamura T (1996) Bioceramics in orthopedic surgery. *Bioceramics* **9**: 31-34.
- Nery EB, Eslami A, Van Swol RL (1990) Biphasic calcium phosphate ceramic combined with fibrillar collagen with and without citric acid conditioning in the treatment of periodontal osseous defects. *Journal of periodontology* **61**: 166-172.
- Passuti N, Daculsi G, Rogez JM, Martin S, Bainvel JV (1989) Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin Orthop Relat Res*: 169-176.
- Patterson AL (1939) The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Physical Review* **56**: 978-982.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M (2001) Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine* **344**: 385-386.
- Rath SN, Strobel LA, Arkudas A, Beier JP, Maier A-K, Greil P, Horch RE, Kneser U (2012) Osteoinduction and survival of osteoblasts and bone-marrow stromal cells in 3D biphasic calcium phosphate scaffolds under static and dynamic culture conditions. *Journal of cellular and molecular medicine*: n/a-n/a.
- Richart O, Descamps M, Liebetrau A (2000) Macroporous calcium phosphate ceramics: optimization of the porous structure and its effects on the bone ingrowth in a sheep model. *Bioceramics*.
- Ripamonti U (1996) Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* **17**: 31-35.
- Ripamonti U, Roden L (2010) Biomimetics for the induction of bone formation. *Expert review of medical devices* **7**: 469-479.
- Shi (2006) *Introduction to biomaterials*. World Scientific Publishing: 213
- van Eeden SP, Ripamonti U (1994) Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plastic and reconstructive surgery* **93**: 959-966.
- Wu CH, Hara K, Ozawa H (1992) Enhanced osteoinduction by intramuscular grafting of BMP-beta-TCP compound pellets into murine models. *Archives of histology and cytology* **55**: 97-112.
- Yang RN, Ye F, Cheng LJ, Wang JJ, Lu XF, Shi YJ, Fan HS, Zhang XD, Bu H (2011) Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **12**: 582-590.
- Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD (2006) Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue engineering* **12**: 1607-1615.

2.3. Compléments de l'étude du potentiel d'ostéoinduction

Dans cet article tout d'abord les résultats obtenus avec les cellules souches isolées de la moelle osseuse humaine sont surprenants. En effet comme indiqué dans l'article et dans le paragraphe précédent, de nombreuses équipes à travers le monde ont démontré le potentiel ostéoinducteur des cellules souches mésenchymateuses isolées (Matsushima *et al.* 2009). Mais comme indiqué en discussion la concentration des CSM isolées *in vitro* était très élevée avec 20.10^6 cellules par gramme de matériaux. Une première hypothèse soulevée était que les cellules confluentes avaient préalablement synthétisé de la matrice extra-cellulaire (MEC) recouvrant les macropores des matrices de BCP avant leur implantation, diminuant ainsi drastiquement la surface spécifique accessible aux protéines d'adhésion cellulaire des souris hôtes et inhibant *in fine* l'adhésion et la prolifération (Habibovic *et al.* 2005). La seconde serait qu'une large fraction des cellules humaines implantées meurent pendant l'opération, initiant ainsi un cycle d'apoptose et libérant localement dans les tissus ectopiques des protéines de signalisation d'inactivation du recrutement des cellules ostéoprogénitrices hôtes (Solheim *et al.* 1992). Une troisième hypothèse serait que les cellules confluentes établissent dans une matrice extracellulaire abondante avant implantation se seraient déjà différenciées *in vitro* en lignée non-osteoblastique (fibroblastique par exemple).

Cet article a également soulevé le potentiel ostéoinducteur des matrices MBCP® et MBCP+® seuls par l'observation d'os *de novo* dès 8 semaines en sous-cutané chez la souris en leur seule présence. L'ajout de MOT humaine n'a pas engendré d'amélioration statistiquement discernable malgré une présence d'os plus fréquente mais équivalente en termes de quantité en comparaison avec les conditions de matrices seules. L'analyse critique énoncée dans l'article considérait la pertinence du site tibial et du protocole clinique de prélèvement induisant une trop grande dilution de la moelle prélevé, comme les myélogrammes l'ont d'ailleurs démontré. Cependant les quantités observées d'os ostéoinduit étaient toujours très faibles comparées à celle observées en combinant les matrices céramiques avec la moelle osseuse de rat (différences statistiquement significatives en analyse de la variance ANOVA).

Cependant afin de savoir si les cellules souches de la moelle osseuse totale (MOT) déposée sur les matrices sont à l'origine de l'ostéogénèse ou si ce sont uniquement les cellules hôtes qui en sont responsable, deux études de faisabilité complémentaires à ces travaux ont été réalisées, avec les auteurs de l'article et Caroline Vignes-Colombeix (ingénieur Inserm en charge de la microscopie confocale du LIOAD), pour tracer les cellules de la moelle avec un marqueur fluorescent. Le marqueur membranaire CM-DIL est en effet recommandé dans ce genre d'applications de l'ingénierie tissulaire osseuse pour sa forte fluorescence restant stable *in vivo* même après plusieurs semaines (Ferrari *et al.* 2001; Kruyt *et al.* 2003). Au regard des résultats sensiblement meilleurs obtenus avec les matrices MBCP+® (ratio HA/TCP 20/80) lors des expérimentations décrites dans l'article du paragraphe précédent, ce sont ces dernières qui ont été retenues pour réaliser ces études complémentaires.

Matériels et Méthodes

Dans le premier cas, 3 souris immunodéficientes (Swiss Nude, femelle, Charles River), ont été implantées en site ectopique sous-cutané dorso-latéral (n=4 par souris) pour un délai de 8 semaines avec des matrices MBCP+® de 0,5-1mm (50 mg par site) supplémentés de MOT de rat (environ 1mL pour 500mg) (Wistar mâle, Charles River).

Dans le second cas, 1 souris immunodéficiente (Swiss Nude, femelle de 6 semaines, Charles River) a été implantée en site orthotopique de calvaria avec défaut de taille critique pour une durée de 6 semaines avec ces mêmes granules (15mg par site) supplémentés de MOT de rat (Sprague-Delay, femelle, Charles River). Le défaut de taille critique en calvaria a été réalisé avec une tréphine de 4mm avec anesthésie par air-isoflurane. Le côté gauche accueillant les matrices MBCP+® avec MOT non-marquée et le côté droit marquée au CM-DIL (chlorométhyl-benzamidodialkylcarbocyanine, Invitrogen-Molecular Probes). Dans les deux cas, la MOT de rat a été obtenue par lavage des fûts tibiaux et fémoraux des rats (Figure).



Figure 28: Lavage des fûts tibiaux et fémoraux de rat (gauche), MOT obtenue avec un rat (droite)

Les MOT ont été alors incubés avec 20 μ M de CM-DIL pendant 5 min à 37°C puis 15 min à 4°C, afin d'en marquer les membranes des cellules souches mésenchymateuses pour observation au microscope confocal. Dans les deux cas, les explants ont été traités en histologie afin d'être inclus en résine PMMA, en bloc pour observation au MEB et en coupe fine pour coloration au trichrome de Goldner. Dans le cas de l'implantation calvaria, une analyse d'image (Quantimètre Q500, Leica) a été effectuée pour en tirer la quantification de l'aire osseuse ostéoinduite.

Résultats et discussion pour les implantations en ectopique

Les coupes histologiques sériées alternativement colorées et non-colorées ont servi à localiser les zones d'ostéoinduction par microscopie optique afin de les retrouver en microscopie confocale (Figure 29). Le marquage DIL préalablement testé sur la MOT de rat avant implantation a permis de s'assurer de la présence et fluorescence des cellules (Figure).

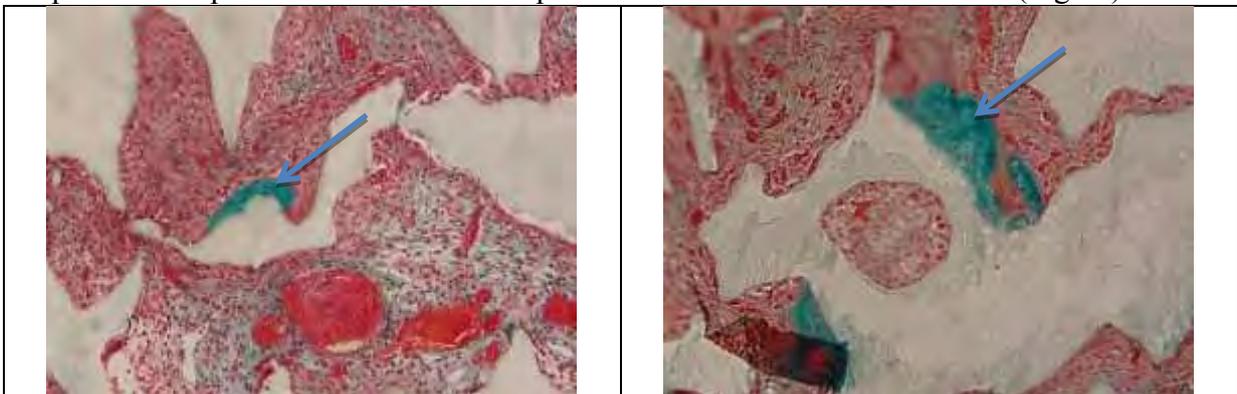


Figure 29 : Localisation par microscopie optique des zones d'ostéoinduction à 8 semaines en ectopique avant visualisation en microscopie confocale. En vert les zones d'os de novo (flèches bleues)

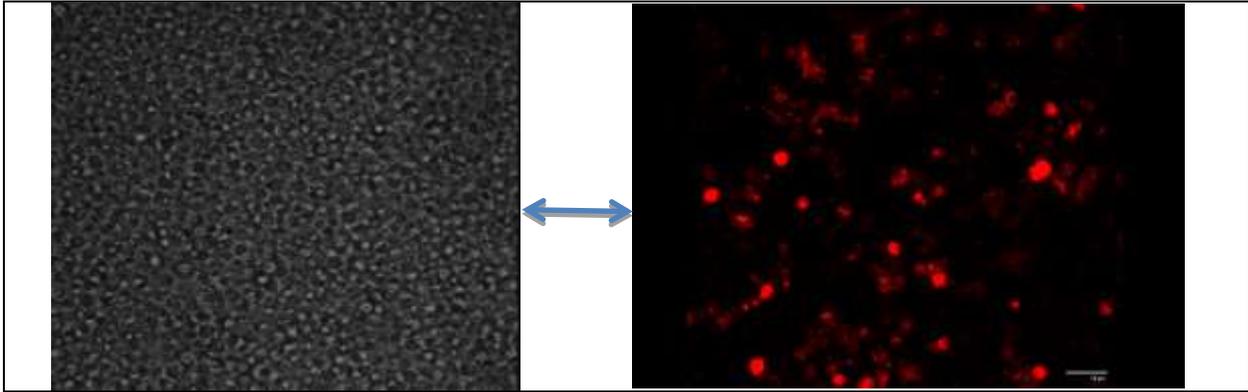


Figure 30 : Vérification du marquage DIL des cellules de la MOT de rat avant implantation. MOT en lumière transmise (gauche) et laser confocale 543 nm (droite)

Enfin l'observation *in situ* des cellules de la MOT de rat marquées au DIL après 8 semaines, ont permis d'identifier sur les bordures de l'os néoformé des zones de fluorescences. Ces cellules observées sont donc *a priori* des cellules souches mésenchymateuses de la MOT de rat s'étant différenciées en ostéoblastes en bordure de zone ostéoïde. Les ostéocytes ne présentaient aucune fluorescence, ce qui est normal du fait de la minéralisation de leur environnement (Figure) (Kruyt *et al.* 2003).

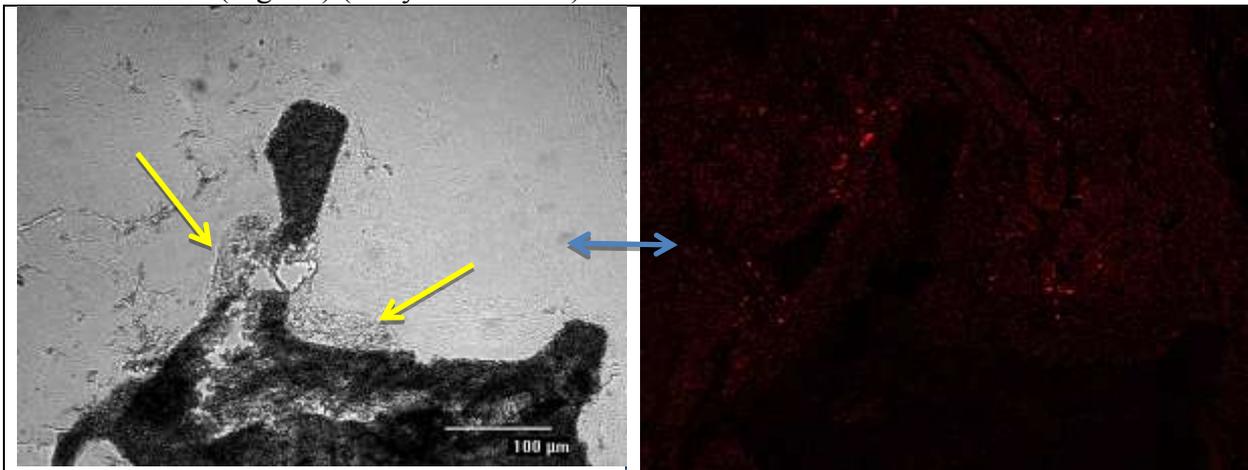


Figure 31 : Images confocales à 543 nm laissant apparaître des cellules implantées après 8 semaines participant à la formation de l'os de novo. Les cellules inoculées et marquées au DIL bordent l'os néoformé

Résultats et discussion pour les implantations en calvaria

La souris ne présentait aucun signe de défaut de motilité ou de comportement symptomatique post-opératoire. Les matériaux étaient très majoritairement restés sur leurs sites d'implantations, sans mélange entre les deux côtés (Figure 32), ce qui valide le protocole opératoire délicat pour ne pas percer la calvaria. Ces contraintes techniques concernant le modèle calvaria de la souris sont les raisons pour lesquelles peu d'études sur les BCP l'utilisent au profit de modèle animaux plus grands comme le rat (Develioglu *et al.* 2007) ou le lapin (Park *et al.* 2010).



Figure 32 : Macrographie de la souris pendant l'opération en calvaria (gauche) et après euthanasie à 6 semaines (droite).

Les coupes histologiques colorées présentaient une forte présence d'os avec l'environnement médullaire toujours visibles à 6 semaines, des deux côtés de la calvaria (Figure 33).

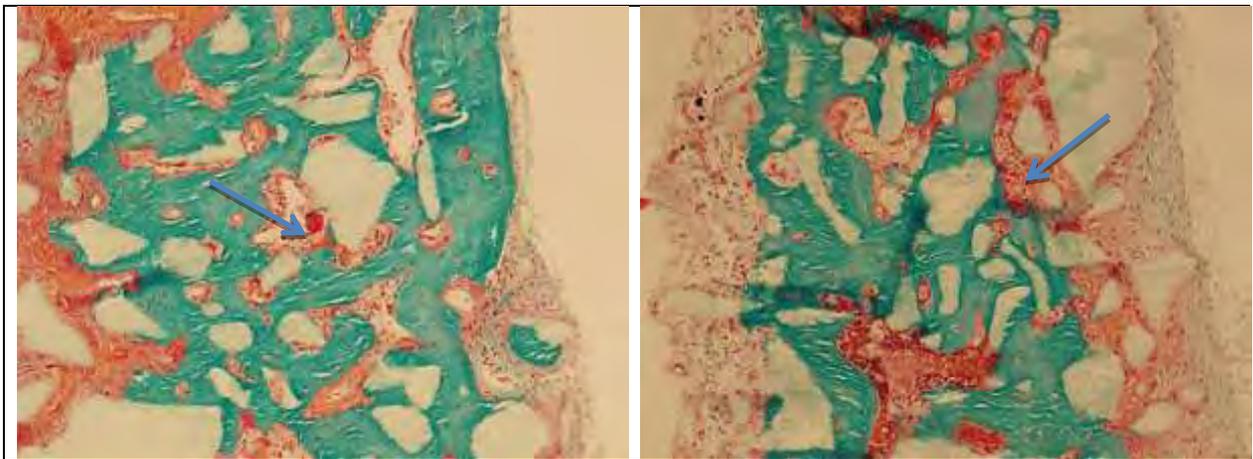


Figure 33 : Coupes histologiques colorées au trichrome de Goldner des calvarias avec MBCP+® et MOT non-marquée (à gauche) ou marquée au DIL (à droite). Flèches : environnement médullaire

Les analyses d'images MEB ont permis de quantifier la surface de l'os formé à 6 semaines en défaut de taille critique en calvaria de souris, similaire dans les 2 cas. La quantité d'os nouvellement formé est très supérieur en terme de ratio Surface de l'os formé/Surface du défaut par rapport au site ectopique. Le site étant orthotopique il est logique d'observer cette tendance néanmoins le délai étant court (6 semaines), cela conforte les résultats de l'article démontrant le potentiel ostéoinducteur très fort du système hybride matrice MBCP® avec MOT de rat, au moins sur le modèle animal de la souris immunodéficente.

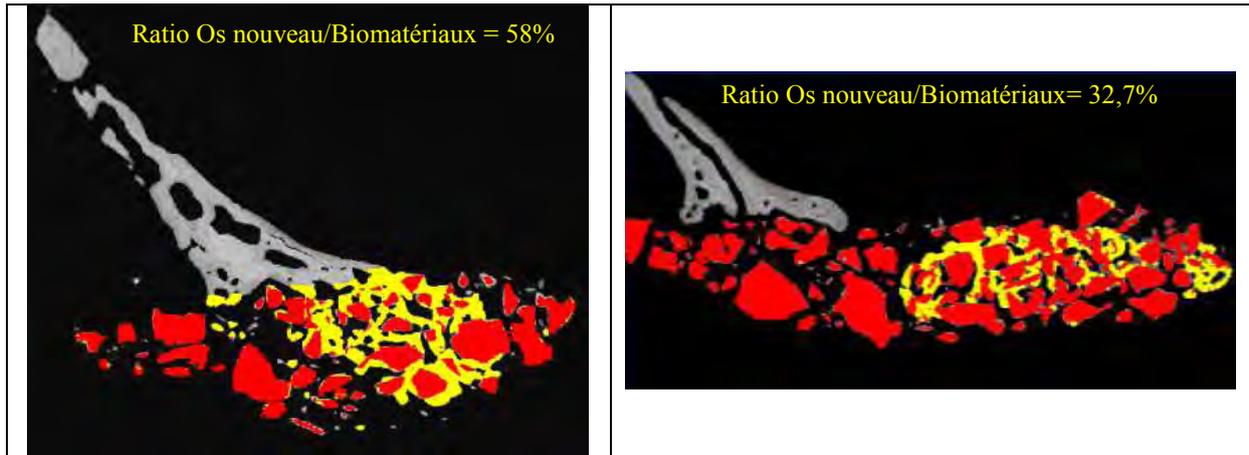


Figure 34: Analyses d'images MEB, en rouge le biomatériau et en jaune l'os nouvellement formé sur la calvaria de souris avec MBCP+® et MOT de rat non-marquée (gauche) et marquée au DIL (droite). Les proportions Os/Biomatériaux sont indiquées sur chaque image.

Enfin l'imagerie confocale a permis, comme pour l'implantation en ectopique, de tracer *in situ* quelques cellules de la MOT de rat marquée au DIL, toujours visible après 6 semaines, autour de l'os remodelé comme la figure ci-dessous le montre.

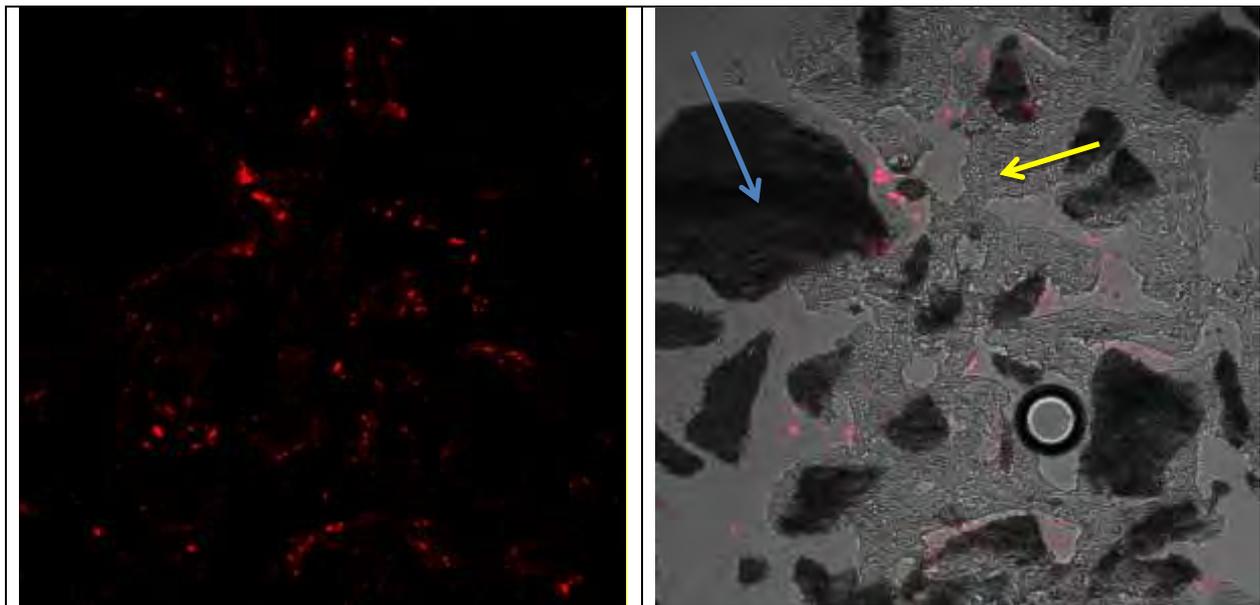


Figure 35 : Marquage au DIL de la MOT de rat sur matrice MBCP+® (droite) par rapport à la moelle contrôle non-marquée (gauche) en site calvaria à 6 semaines. En rouge les cellules inoculées et marquées au DIL après 6 semaines en site calvaria. Flèche bleue : biomatériaux ; flèche jaune : os néoformé

Conclusion

Les 2 études de faisabilité *in vivo* complémentaires à l'article du paragraphe précédent, visant à déterminer si les cellules de la MOT de rat participent directement au remodelage osseux, offrent des éléments de réponse encourageants. En effet les résultats corrélés du traçage au DIL des CSM en site ectopique et orthotopique semblent confirmer que les cellules de la MOT de rat améliorent non-seulement le potentiel ostéoinducteur des matrices seules, démontré dans l'article, mais laisse entrevoir l'ostéogénécité du système hybride matrices MBCP+®/MOT.

N'ayant qu'une souris en site calvaria, les résultats obtenus en orthotopique ne permettent que de valider le protocole opératoire difficile du défaut de taille critique sur la calvaria de la souris qui permet d'utiliser le modèle fort utile de la souris immunodéficiente sans induire de pathologies neurologiques. En effet ces souris immunodéficientes peuvent supporter toutes sortes de cellules xénogènes (Habibovic et De Groot 2007). Les modèles animaux étant particulièrement onéreux, et les sites orthotopiques de la souris autres que la calvaria presque inaccessibles en chirurgie classique du fait de leur fragilité et de leurs tailles très réduites, la validation de ce modèle permettrait de diminuer les coûts de la recherche en ce domaine et d'avoir les avantages du modèle immunodéficient très bien maîtrisé chez la souris (Kelland 2004).

2.4. Étude de faisabilité d'un modèle d'ostéonécrose tibiale chez le lapin

L'ostéonécrose est une pathologie souvent observée en chirurgie orthopédique, l'ostéonécrose de la tête du fémur étant la plus fréquente, ou en chirurgie-maxillo-faciale à cause par exemple de l'utilisation des biphosphonates médicamenteux traitant l'ostéoporose* ou des maladies métastatiques traités par irradiation entraînant une nécrose des tissus sains périphériques (Migliorati *et al.* 2005). C'est pourquoi il est important de réussir à démontrer que des matrices en PCa ostéoinductrices porteuses de cellules souches autologues (Gangji *et al.* 2004) parviendraient à réparer ce type de défauts chez l'animal naturellement irréparable par les simples processus du remodelage osseux (Assouline-Dayan *et al.* 2002). Les méthodes d'induction artificielle de nécrose en pré-clinique décrites dans la littérature consistent à avoir recours soit à des techniques chirurgicales comme l'ischémie en ligaturant des vaisseaux sanguins avoisinant (Conzemius *et al.* 2002), soit par induction thermique aussi bien par le froid grâce à l'emploi d'azote liquide, que par le chaud grâce à l'emploi de sources de chaleur, ou encore par brûlure électrique induisant des brûlures locales profondes et irrémédiables (Malizos *et al.* 1993). Dans cette étude de faisabilité c'est une méthode simple, rapide et peu coûteuse d'ostéonécrose thermique par la chaleur qui a été réalisée afin de pouvoir envisager par la suite une étude pré-clinique actuellement en cours de préparation.

Matériels et Méthodes

6 lapins Néo-Zélandais âgés de 5 mois et pesant 4 kilos ont été opérés et explantés après un délai de 3 semaines (21 jours) et 6 semaines (42 jours) de la façon suivante :

- Tibia gauche : Trou témoin de 5 mm de diamètre au niveau de l'épiphyse tibiale sur une profondeur d'environ 7mm
- Tibia droit : Trou de 5 mm de diamètre au niveau de l'épiphyse tibiale sur une profondeur d'environ 7mm. Un thermocouple d'embout de diamètre 5mm chauffé à 80°C, qui est au-dessus de la température critique rapportée comme étant aux alentours de 50°C (Augustin *et al.* 2008), a été ensuite introduit dans le trou pendant une durée de 30s. La température de l'embout étant mesurée à l'aide de la sonde thermique juste avant la pose.

Les tibias fraîchement explantés (à tous les délais) ont été passés au microscanner afin de visualiser l'état de la repousse osseuse en 3D (Microscanner Skycan 1072). Les tibias explantés ont ensuite suivi un processus de déshydratation à l'alcool afin d'être inclus en résine de polyméthylméthacrylate (PPMA). Les blocs de résine contenant les échantillons ont été d'une part polis puis recouverts d'or-palladium pour observations au MEB (LEO 1450VP). et d'autres part coupés afin d'obtenir des lamelles histologiques colorées au pentachrome de MOVAT. L'analyse d'images MEB en 2D (Quantimet Leica Q500) a permis de calculer l'aire de la repousse osseuse en comparaison de l'aire totale du défaut osseux.



Figure 36 : Thermocouple pour l'ostéonécrose (à gauche) et perforation de l'épiphyse tibiale (à droite)

Résultats et Discussion

Les résultats d'analyses d'images ont démontré l'efficacité du modèle d'ostéonécrose induite par une rapide brûlure au-dessus de la température critique de 50°C (Augustin *et al.* 2008), ainsi la figure ci-dessous permet de constater une nette diminution d'os en présence dans les sites nécrotiques. Ceci est confirmé par un test statistique comparatif simple (t-test) qui conclut à la différence significative entre site témoin vide et site nécrotique ($p=0,05$) à 21 jours mais pas à 42 jours ($p=0,17$).

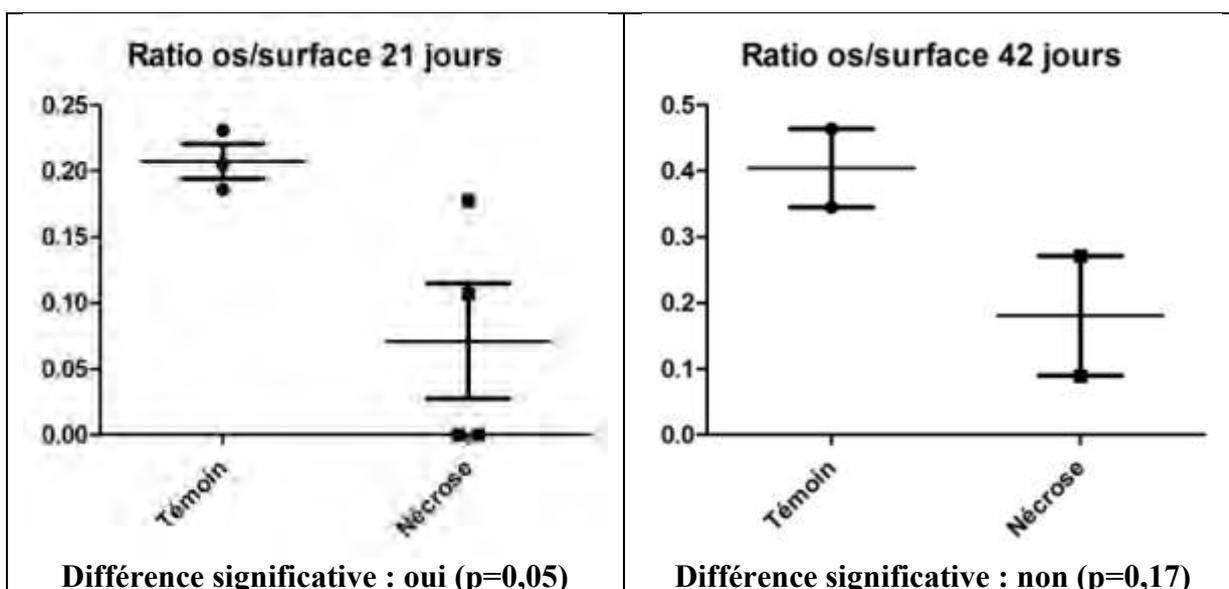


Figure 37: Ratio aire de la repousse osseuse par rapport à la surface du défaut calculée par analyse d'images

Les coefficients de variation de la densité d'os en présence pour les sites nécrotiques sont plus élevés à 21 jours et beaucoup plus élevés à 42 jours, comme le montre la figure ci-dessous, ce qui dénote d'une grande hétérogénéité dans la densité des travées osseuses par rapport aux sites témoins.

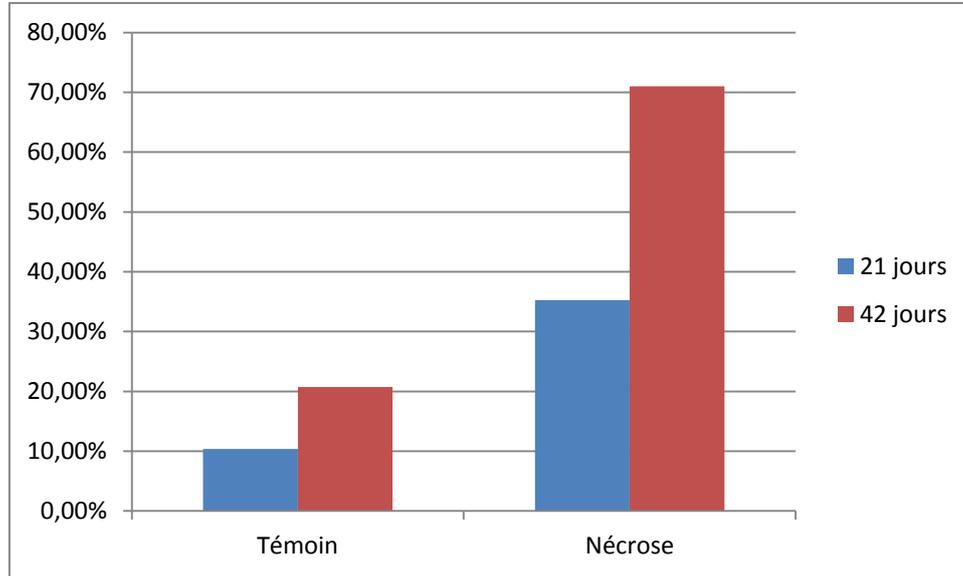


Figure 38 : coefficient de variation de la densité des travées osseuses par analyse d'image

Ces très forts écarts entre lapins d'une même condition nécrotique peuvent signifier que le protocole doit être amélioré notamment au niveau du temps de pose du thermocouple dans les défauts et du maintien du même axe de pénétration dans les trous afin d'homogénéiser davantage les réactions des tissus hôtes.

Conclusion sur la faisabilité du modèle ostéonécrose

L'étude de faisabilité est suffisamment concluante au regard des résultats présentés ci-dessus pour valider le modèle tout en prenant en compte les besoins de contrôler plus précisément la température du thermocouple et l'acte chirurgical, tant au niveau de la pose systématique du thermocouple que de la profondeur et diamètre des trous percés. Cette étude a ainsi permis la préparation actuellement en cours d'une étude pré-clinique large, comprenant une vingtaine de lapins, dans la stratégie d'association cellules souches-matrices phosphocalciques biphasiques d'ingénierie tissulaire visant à étudier l'ostéogénécité de ces systèmes hybrides pour pouvoir dans un futur proche offrir aux patients des solutions innovantes et efficaces.

Perspectives et discussion

L'étude du potentiel ostéoinducteur des matrices de la gamme MBCP®, selon la stratégie de l'ingénierie tissulaire osseuse du contexte du projet REBORNE, a permis d'obtenir des résultats à la fois surprenants et prometteurs. Les matrices seules ont été confirmées comme étant ostéoinductrices à 8 semaines, même si la quantité d'os nouveau n'était pas grande, c'est la preuve de concept qui conforte les publications préconisant ce type de matrices céramiques (Yuan *et al.* 2009) à la fois biomimétiques par leurs compositions et bioactives par leur double distribution de pores macro-microscopiques (Daculsi *et al.*, 2009). Ce potentiel ostéoinducteur des matrices phosphocalciques biphasées a été inhibé, selon notre hypothèse, par l'association avec des cellules souches humaines cultivées en très grand nombre et mis en contact avec les biomatériaux alors qu'une matrice extra-cellulaire abondante avait déjà été synthétisée par ces cellules *in vitro*. Ce résultat est étonnant car il va à l'encontre des nombreuses études sur les CSM et les matrices phosphocalciques prouvant leur apport ostéoinducteur, ou ostéogénique (Mendes *et al.* 2002 ; Cordonnier *et al.* ; Petite *et al.* 2000 ; Spadaccio *et al.* 2009). Cette question mérite d'être approfondie en réitérant l'expérience avec plusieurs concentrations de CSM en présence des mêmes matrices.

L'association de MOT humaine avec les matrices biphasées n'a pas eu d'impact significatif sur l'ostéoinduction comparée à la condition contrôle « matrices seules », ce qui a souligné l'importance de la qualité du prélèvement de moelle osseuse et du choix du site d'extraction. En l'occurrence prélever en site tibial n'est effectivement pas la méthode de référence qui reste le prélèvement de moelle osseuse totale en crête iliaque (Muschler *et al.* 1997). Les implantations de MOT devraient ainsi se faire après vérification par myélogrammes de la concentration élevée en cellules souches même si le besoin de mélange extemporané avec les matrices BCP et les contextes cliniques imprévisibles ne permettent un systématisme protocolaire. La provenance de la MOT humaine, c'est-à-dire le donneur, peut également beaucoup influencer les résultats. Par exemple lors du vieillissement, la moelle hématopoïétique de patient âgés est remplacée par de la graisse, et même si des sources de cellules souches adipeuses existent, leur potentiel ostéogénique reste parfois contesté par rapport aux CSM (Im *et al.* 2005). En revanche l'ajout de MOT de rat a très fortement décuplé ce potentiel d'ostéoinduction des matrices seules avec une différence statistique significative, ce qui est en adéquation avec la littérature pour ce type de modèle murin au métabolisme très réactif (Maniatopoulos *et al.* 1988). L'avantage de la MOT étant sa relative simplicité d'extraction, de manipulation avec les matrices de BCP et de disponibilité en clinique par rapport à d'autres agents bioactifs comme les PRP ou PRF nécessitant des traitements post-opératoires plus fastidieux (Malard *et al.* 2005).

En ce qui concerne la comparaison entre les matrices, une légère amélioration du potentiel ostéoinducteur a été observée lors de l'association avec la moelle humaine avec les matrices MBCP+® mais sans différence statistique significative. Ce léger mieux doit être rattaché aux analyses physico-chimiques présentées dans l'article. En effet bien qu'ils n'apparaissent pas de différences importantes dans la macro-microporosité des MBCP® et des MBCP+®, dont le rôle essentiel a été rappelé (Ripamonti et Roden 2010), les différences de potentiel zêta, avec des charges de surface des particules de MBCP+® plus élevées et donc plus réactives en solution, pourraient être un des facteurs à l'origine de ce résultat. Les particules plus chargées attirant davantage de protéines et donc permettant le recrutement de plus de cellules. De plus le ratio HA/TCP de 20/80 augmente la libération d'ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} , grâce à la phase β -TCP biorésorbable, intervenant dans les mécanismes de minéralisation de la matrice ostéocytaire (Qi *et al.* 2011).

Se basant sur ces résultats, les études de faisabilités complémentaires sur le traçage des CSM de l'implant n'ont ciblé que la meilleure condition observée dans les travaux de l'article, c'est-à-dire l'implantation du système hybride matrice phosphocalcique synthétique/moelle osseuse totale. La MOT comprenant, en plus des CSM tous les agents bioactifs cités au cours de ce chapitre (facteurs de croissance, plaquettes, fibrines, protéines d'adhésion...) (Dietz 1944). La traçabilité à 5 semaines des CSM de la moelle marquée au DIL s'est avérée correcte mais sans évidence concernant l'intervention massive des CSM de l'implant. Des études plus larges, comprenant assez d'animaux et de conditions pour effectuer des analyses statistiques paramétriques devront se mettre en place afin de trancher sur le caractère ostéogénique ou ostéoinducteur du système hybride MOT/MBCP®.

La pertinence du modèle animal de la souris pour extrapoler à l'humain peut également être mise en question car les modèles accessibles facilement et plus proches de l'homme sont les grands animaux comme le chien ou le porc (Pearce *et al.* 2007). Le meilleur modèle restant celui des primates (Tableau 14) mais beaucoup moins accessible au regard des lois bioéthiques (Wang *et al.* 1998; Turner 2001).

	Chiens	Mouton/Chèvre	Porc	Lapin	Souris/rat	Primate
Macrostructure de l'os	++	+++	++	+	+	+++
Microstructure de l'os	++	+	++	+	+	+++
Composition de l'os	+++	++	+++	++	+	+++
Dynamique du remodelage osseux	++	++	+++	+	+	+++

Tableau 14 : Comparatif qualitatif des ressemblances des modèles animaux avec l'homme adapté de (Pearce *et al.* 2007). +++ étant le meilleur score

L'utilisation des CSM se faisant par défaut de pouvoir utiliser en France des cellules souches embryonnaires au regard de la législation, au travers de cette étude se soulève alors les problèmes bioéthiques liés à l'utilisation de cellules souches immortelles sur le plan symbolique puisqu'elles sont à l'origine de tous les tissus du corps humain. Les réglementations de chaque pays sont différentes en la matière en fonction notamment de l'opinion publique sur la question. Des phases de dialogues et d'explications pédagogiques avec le grand public doivent avoir lieu afin de donner aux citoyens toutes les cartes pour peser les pour et les contres de ces approches de l'ingénierie tissulaire porteuses de grands espoirs pour beaucoup et de craintes pour d'autres (Trommelmans *et al.* 2009). Les arguments contre l'utilisation de ces cellules souches embryonnaires sont plus souvent d'ordre religieux ou moral mais de plus en plus d'études démontrent le potentiel de dérives oncogènes non-maîtrisées des cellules souches notamment lors de l'ajout de facteurs de croissance (Bjerkvig *et al.* 2005).

Enfin la pertinence de l'utilisation des cellules souches comme source de cellules pluripotentes est remise en question depuis 2006 par la découverte des cellules souches pluripotentes induites (IPS) qui sont des cellules adultes possédant les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires après reprogrammation génétique (Takahashi et Yamanaka 2006). Ainsi sans enfreindre les règles actuelles de la bioéthique, ces très récentes cellules IPS connaissent un plein essor nécessitant néanmoins plus de recul pour en juger les avantages et les risques.

Chapitre 3

Développement et caractérisations de nouvelles formulations galéniques

Développement de matrices céramiques et composites pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Chapitre 3, les grandes lignes :

Ce chapitre précise en quoi le développement de nouveaux granules creux répond au cahier des charges du projet européen de thérapie génique GAMBA. Ce troisième chapitre traite également de l'étude comparative in vivo chez le lapin entre le produit composite hydrogel/céramique In'Oss (Biomatlante, France) et le produit Actifuse BX (Apatech, Angleterre).

3.1. Les granules creux

3.1.1. Le projet GAMBA : thérapie génique et ingénierie tissulaire

La médecine régénérative comporte deux volets d'approche complémentaire. Comme nous l'avons vu au second chapitre l'ingénierie tissulaire est une stratégie d'implantation de matrices bioactives supplémentées d'agents bioactifs (cellules, facteurs de croissance...) pour réparer des défauts osseux de taille critique, donc de soigner « de l'extérieur ». La thérapie génique en revanche est une stratégie visant à soigner « de l'intérieur » en modifiant le patrimoine génétique, c'est-à-dire l'ADN*, de cellules ciblées des patients afin de guider leurs expressions géniques, en fonction des affections à traiter. Dans le cas des pathologies de l'os et du cartilage, et en particulier l'arthrose*, intéressant le projet européen GAMBA (pour « Gene Activated Matrices for Bone and cartilage regeneration in Arthritis », www.gamba-project.eu) il s'agira ainsi non pas d'induire une différenciation des cellules souches mésenchymateuses (l'ostéoinduction), comme pour l'ingénierie tissulaire osseuse, mais de la provoquer directement par transfection des cellules souches avec des plasmides contenant de l'ADN complémentaire*(ADNc), codant pour des protéines d'intérêts, portées par des vecteurs de transfection cellulaire et ces derniers eux-mêmes contenus dans des matrices composites comprenant des granules phosphocalciques biphasés HA/ β -TCP. Ainsi le projet GAMBA se base à la fois sur les principes de l'ingénierie tissulaire utilisant des matrices hybrides biomatériaux/cellules et ceux de la thérapie génique pour apporter des solutions innovante dans le but de soigner l'arthrose (également appelée l'ostéoarthrite). En effet l'arthrose est une maladie chronique des articulations touchant actuellement presque 20% de la population mondiale (Van den Berg 2011) et ce chiffre croît avec l'effet de vieillissement des populations à tel point qu'il est prédit qu'elle sera la quatrième cause de handicap au niveau mondial d'ici 2020 (Woolf et Pfleger 2003).

La stratégie globale du projet GAMBA

Il est intéressant de noter que la première application clinique de la thérapie génique eut lieu en 1990 aux États-Unis. Depuis plus de 1600 essais cliniques ont été réalisés à travers le monde, dont la quasi-totalité aux États-Unis (65%) et en Europe (30%) (Wiley 2010).

L'arthrose la plus courante intervient au genou (Newman 1998), et l'intervention chirurgicale est la plus souvent pratiquée pour diminuer les douleurs par ablation de tissus endommagés ou même par remplacement total du genou par une prothèse qui peut causer des complications à long terme (Hunziker 2002). En proposant une alternative moins radicale et invasive, la thérapie génique s'avère être très prometteuse.

La thérapie génique est ainsi définie comme l'introduction délibérée de matériel génétique dans les cellules somatiques* humaines dans le but de corriger un défaut génétique ou de pallier le manque d'une protéine en apportant le gène responsable de sa synthèse (Tolstoshey

1993). C'est cette seconde définition qui correspond à la démarche du projet GAMBA. Les différents partenaires du projet GAMBA se trouvent en annexe 4.

Les 3 options de thérapies géniques du projet GAMBA

Il existe plusieurs options pour réaliser ce projet de thérapie génique, tout d'abord par le choix du type de vecteurs de transfections. Les gènes de l'ADNc ne pouvant entrer spontanément dans les cellules, ils doivent être placés dans des vecteurs pouvant y pénétrer. Ces vecteurs de transfections peuvent être d'origine virale ou non-virale. Les deux possibilités ont été retenues par le consortium GAMBA. Ainsi les techniques de transfection utilisant des adénovirus* étant bien maîtrisées, efficaces et reconnues désormais comme sans danger (St George 2003), ces vecteurs viraux ont été sélectionnés. Les adénovirus, responsables du rhume par exemple, sont modifiés afin de bloquer leur réplication et afin de pouvoir accueillir le gène d'intérêt en leur sein. Également des liposomes ou des polymères synthétiques, tel le poly(éthylène imine), capables d'encapsuler l'ADNc ont été sélectionnés comme vecteurs non-viraux à la fois pour leur large utilisation dans le domaine de la thérapie génique et pour pallier la crainte de certains patients concernant les vecteurs d'origine virale (Lasic and Templeton 1996 ; Niidome and Huang 2002). Le schéma ci-dessous représente les 2 types de vecteurs utilisés dans ce projet.

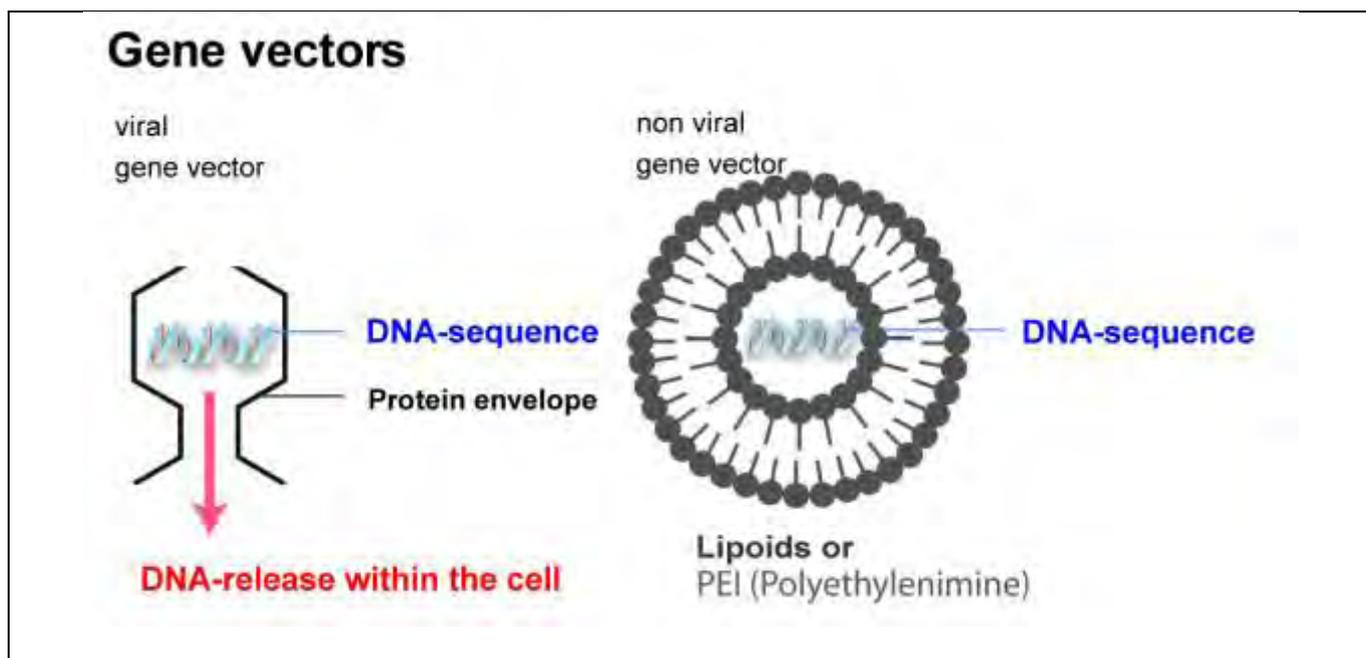


Figure 39 : Les différents types de vecteurs de transfection utilisés pour le projet GAMBA

La seconde option quant à elle concerne la voie de transfection des cellules, c'est-à-dire soit *in vivo* en misant sur le recrutement des cellules souches par les matrices contenant les vecteurs de transfections, soit *in vitro* en prélevant directement chez les patients des cellules souches autologues qui seront ensuite cultivées et transfectées en laboratoire avant d'être réimplantées après mise en contact avec les matrices phosphocalciques. Ce sont ces deux options qui seront exploitées en simultanément dans ce projet.

Enfin la troisième option mentionne le procédé d'activation des gènes d'intérêts une fois transfectés et implantés chez le patient. C'est la dimension temporelle de l'application puisqu'elle implique le contrôle dans le temps de l'effet thérapeutique de synthèse des protéines d'intérêts. Les choix de mode d'activation des gènes transfectés sont nombreux,

nous ne les détaillerons pas ici mais une liste se trouve en annexe (annexe 6). Le projet GAMBA utilisera l'activation thermique à l'aide de nanoparticules magnétiques, l'activation par répression bactérienne à l'aide d'antibiotiques et l'activation par réaction enzymatique.

De l'expression génique à la synthèse des protéines d'intérêt

L'approche du projet GAMBA est complexe puisqu'elle vise à mettre en place un système hybride [vecteurs de plasmides/cellules souches/matrices ostéoconductrices] disposant de 3 niveaux de bioactivité et pouvant être activé soit de l'extérieur par des stimuli (thermiques ou magnétiques) soit de l'intérieur par réaction des cellules transfectées à la présence de cytokines inflammatoires. Ce système est ainsi appelé « sur commande-sur demande » et agit à la fois dans l'espace sur trois niveaux de l'articulation et sur la durée (Aguado *et al.* 2011).

Ainsi, le premier niveau spatial de bioactivité sera dans la partie osseuse (sous-chondrale) des articulations pour promouvoir la régénération osseuse. C'est à ce niveau qu'intervient le rôle des granules phosphocalciques implantés. Ces derniers auront tout d'abord le rôle qu'on leur connaît de matrices ostéoconductrices mais également le rôle de porteur de vecteur de plasmides contenant de l'ADNc codant pour l'expression génique du facteur de croissance BMP-2 induisant, comme nous l'avons succinctement évoqué au chapitre 2, la différenciation des cellules souches transfectées en ostéoblastes pouvant remodeler l'os endommagé. Ces facteurs de croissance ont déjà prouvé leur efficacité en clinique (Carragee *et al.* 2011). Cette expression génique ostéoinductrice peut de plus être stimulée par la prise d'antibiotiques systémiques par le patient grâce au procédé d'activation génique Tet-on/Tet-off dont le principe général est expliqué en annexe (annexe 6) (Ueblacker *et al.* 2004). Afin de faciliter la manipulation et la cohésion des granules phosphocalciques pendant les étapes *in vitro* d'association avec les vecteurs et les cellules, ces granules seront introduits dans un gel à base d'acide hyaluronique dont les propriétés thermosensibles permettent de les mélanger d'abord en phase liquide avant de réticuler les polymères pour former un gel composite où les granules sont intégrés en trois dimensions. Ce gel est actuellement développé et optimisé par nos partenaires (D'Este *et al.* 2012) ses propriétés sont présentées en annexe (annexe 5).

Le second niveau de bioactivité résidera dans la partie cartilagineuse de l'articulation, ici c'est le gel hyaluronique, sans granules de BCP, contenant les cellules souches transfectées qui libèrera le facteur de croissance TGF- β 1, promoteur de la différenciation des cellules souches hôtes en chondrocytes remodelant le cartilage (Massagué 2000). Afin d'activer de l'extérieur et de contrôler dans le temps cette synthèse protéique ciblée par les cellules implantées, des nanoparticules magnétiques, préalablement insérées lors de la synthèse de l'hydrogel, pourront induire une augmentation de température locale entraînant l'activation du gène d'intérêt (Anton *et al.* 2011). Pour cela un champ magnétique extérieur indolore par impulsion pourra être appliqué sur le genou du patient. Ce champ magnétique correspondant à la fréquence de résonance des nanoparticules provoquera leur agitation et donc une augmentation sensible de la température très localement sur le site d'implantation. Cette augmentation de température de 5°C étant localisée et de courte durée ne provoquera pas de dommage aux cellules mais activera la synthèse de TGF- β 1 par les cellules souches transfectées induisant leur différenciation et celles des cellules souches recrutées de façon endocrine par l'hydrogel propice à leur adhésion. De plus dans ce gel seront également dispersés les vecteurs isolés afin de transfecter les cellules souches recrutées *in vivo* décuplant ainsi la différenciation cellulaire en chondrocytes *in vivo*.

Le troisième et dernier niveau se situera dans la zone synoviale et comprendra le même gel hyaluronique qu'au niveau chondral, sans nanoparticules magnétiques mais avec les cellules souches transfectées cette fois-ci avec un gène codant pour la synthèse de cytokine anti-inflammatoire IL-10. L'activation de ce gène se fera quant à lui par réaction à la présence dans le milieu hôte de l'enzyme pro-inflammatoire Cox-2. La synthèse d'IL-10 inhibera alors le processus inflammatoire douloureux pour les patients (Yang *et al.* 2008).

Le schéma suivant synthétise ces 3 niveaux spatiaux de bioactivité.

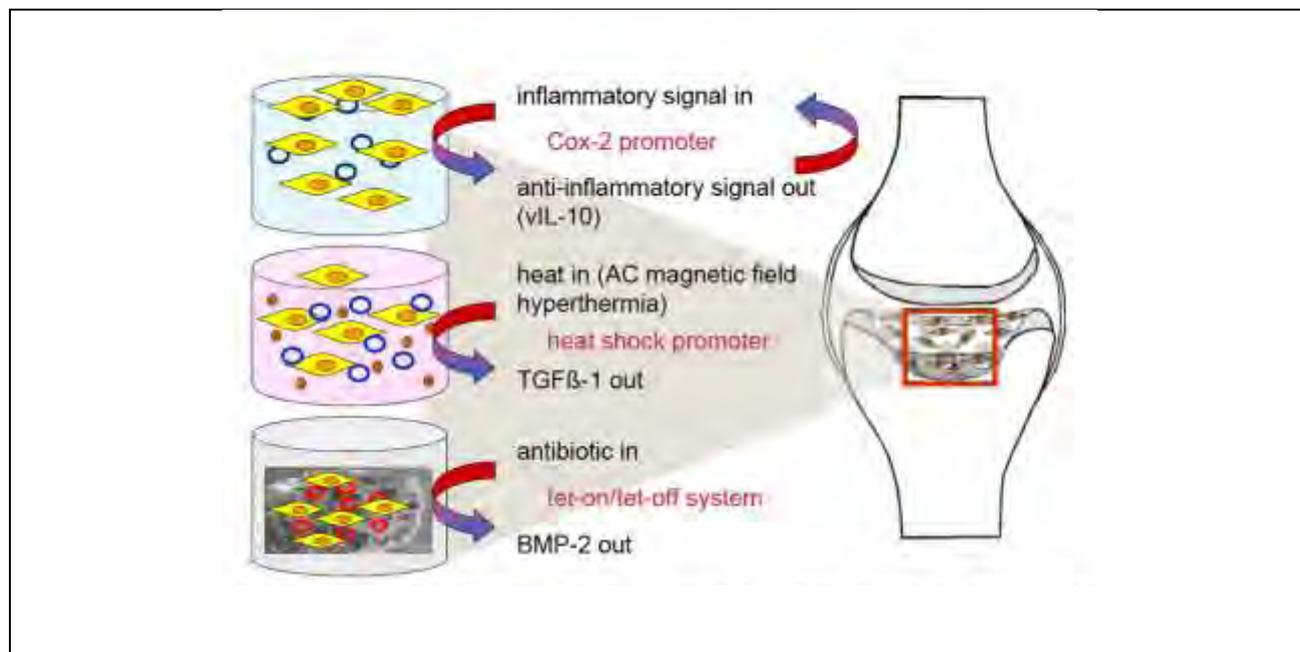


Figure 40 : Schéma d'action multiniveaux impliquée dans le projet GAMBA

Matrices phosphocalciques porteuses de vecteurs et de cellules

La partie nous concernant est celle désignant la régénération osseuse, et plus précisément de pourvoir aux partenaires du projet des matrices phosphocalciques capables d'accueillir et de protéger les cellules souches des patients. Ce sont en premier lieu les matrices granulaires de la gamme MBCP® qui ont été choisies pour ce faire. Nous avons déjà expliqué en détails dans les chapitres précédents les propriétés bioactives des matrices phosphocalciques biphasées HA/TCP favorisant l'adhésion et la prolifération des cellules souches et des cellules osseuses (ostéoconduction). Les matrices spécifiques micro-macroporeuses de la gamme MBCP® ont démontré leur potentiel d'ostéoinduction comme nous l'avons étudié lors de notre article présenté au chapitre précédent. Ces matrices sont actuellement testées par nos partenaires européens dans leurs différentes étapes d'association avec les vecteurs de transfections afin d'évaluer la faisabilité de transfection des cellules en une seule étape. Effectivement, en déposant les vecteurs directement sur les granules puis en introduisant les cellules *in vitro*, cela permettrait un meilleur mélange des différents acteurs bioactifs avant implantation et surtout éliminerait une étape de transfection préalable des cellules seules.

Étude de faisabilité sur l'adhérence de vecteurs non-viraux au MBCP et MBCP+

Nous avons ainsi pu caractériser l'influence du traitement subi par les granules de la gamme MBCP® lors de l'adsorption de vecteurs non-viraux polymériques (A) et liposomiques (B) contenant des plasmides (ADNc) mis en contact par nos partenaires.

Matériels et Méthodes

Les granules MBCP® et de MBCP+® porteurs de vecteurs de transfections soit polymériques (A) soit liposomiques (B) ont été observés par microscopie électronique à balayage (LEO 6400, Zeiss) après déposition d'une couche d'or-palladium.

Les éventuelles modifications de ratio HA/TCP lors des procédés de mise en contact ont été caractérisés par diffraction des rayons X (PW 1830, Philips) en utilisant la raie $K\alpha$ du cuivre ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) une durée de pas de 2s et une largeur de pas de $0,02^\circ$ (2θ). La fenêtre d'acquisition est comprise entre 20° et 50° (2θ).

La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (Magna IR 550, Nicolet Instruments) entre 400cm^{-1} et 4000cm^{-1} a été utilisée afin de constater ou non d'éventuelles modifications chimiques.

Résultats

L'analyse du ratio HA/TCP a révélé un changement non négligeable de ce ratio pour les matrices MBCP+®, passant ainsi de 20/80 à 35/75 lors de l'association avec A et 36/74 avec B. En revanche les matrices 60/40 sont restées stables en association avec A et B.

Mesures par DRX	Ratio HA/TCP avant mise en contact		Ratio HA/TCP après mise en contact
MBCP et vecteurs polymériques A	59/41	→	59/41
MBCP et vecteurs liposomiques B	59/41	→	59/41
MBCP+ et vecteurs polymériques A	23/77	→	37/63
MBCP+ et vecteur liposomiques B	23/77	→	35/65

Tableau 15 : Calculs des ratio HA/TCP à partir des diffractogrammes de DRX

Les clichés MEB montre que les vecteurs polymériques B adhèrent et s'étalent totalement à la surface des granules sans distinction particulière entre les deux types de granules. En revanche les vecteurs liposomiques A semblent mieux adhérer sur les granules MBCP+ comme les figures ci-après permettent de le constater.

Les spectres IRTF de la figure 43 confirment la présence accrue des groupements OH apatitiques à 3550 cm^{-1} et 675cm^{-1} pour les BCP 2080 qui indiquent effectivement une augmentation du ratio HA/TCP. Sur les deux types de matrices et pour les 2 types de vecteurs, la mise en contact est visible par IRTF faisant ressortir les groupements alkyls des vecteurs par un double pic ou épaulements légers à 2850 et 2950 cm^{-1} .

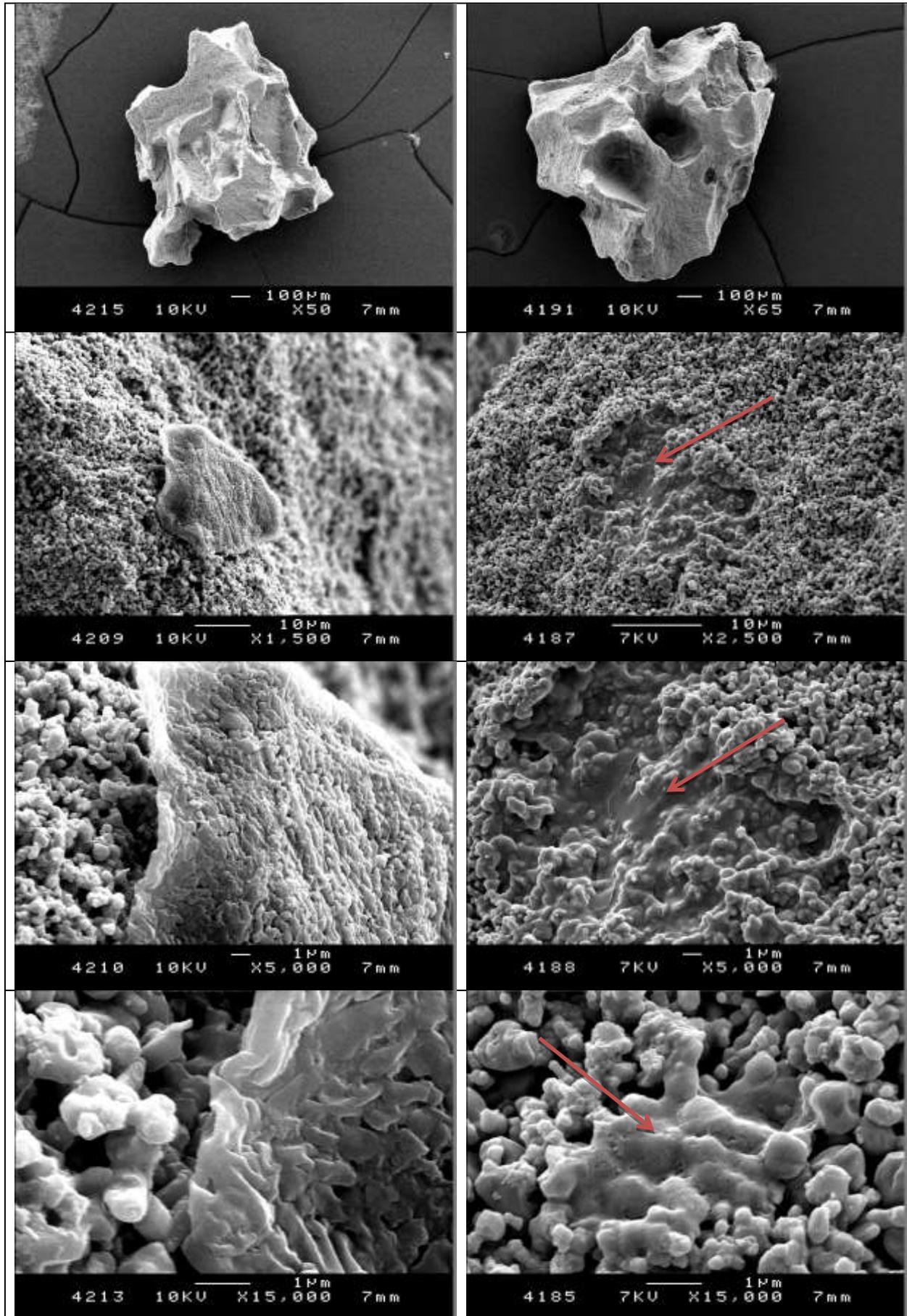
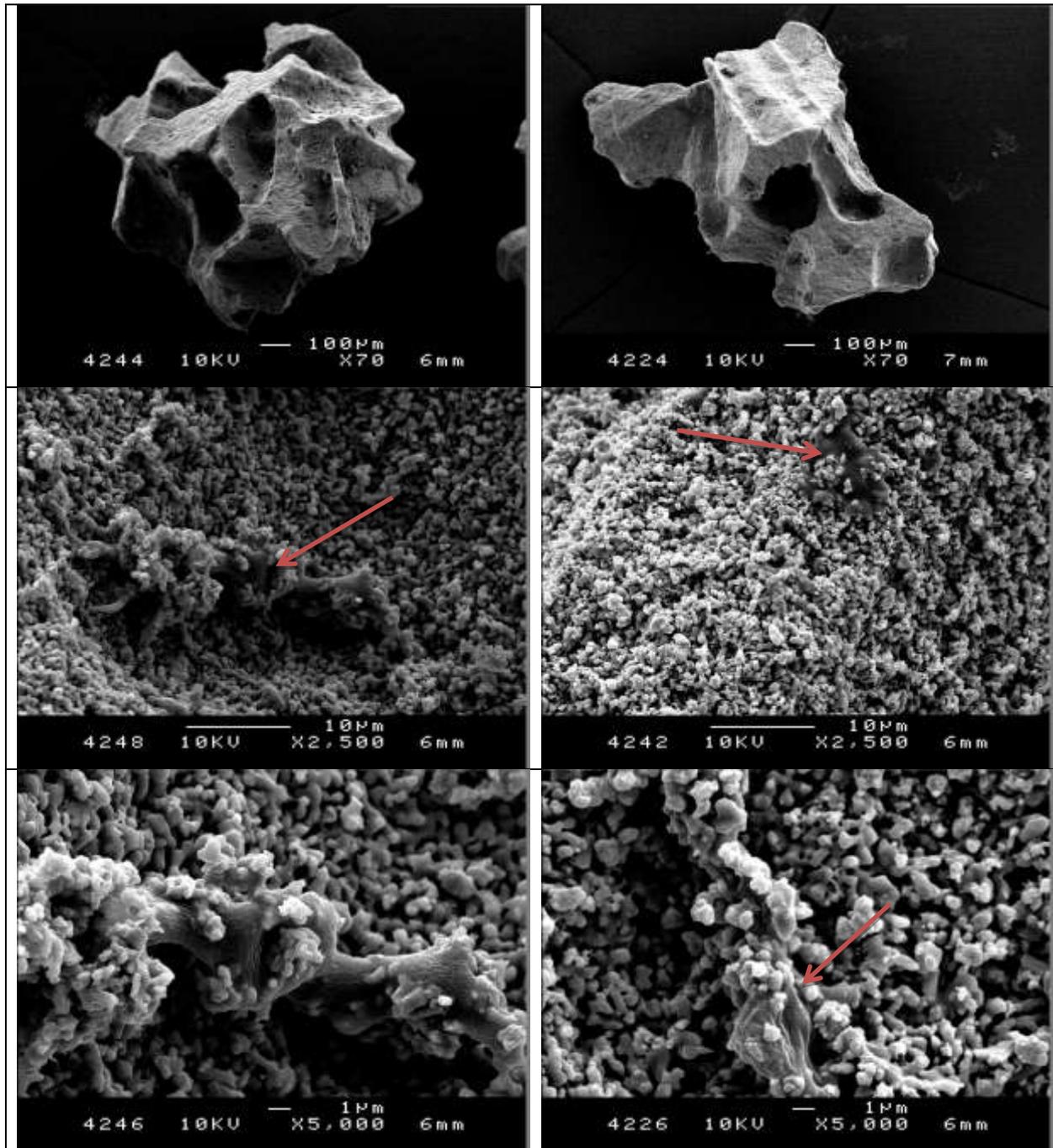


Figure 41 : Vecteurs polymériques (flèches rouges) sur MBCP (gauche) et MBCP+ (droite)



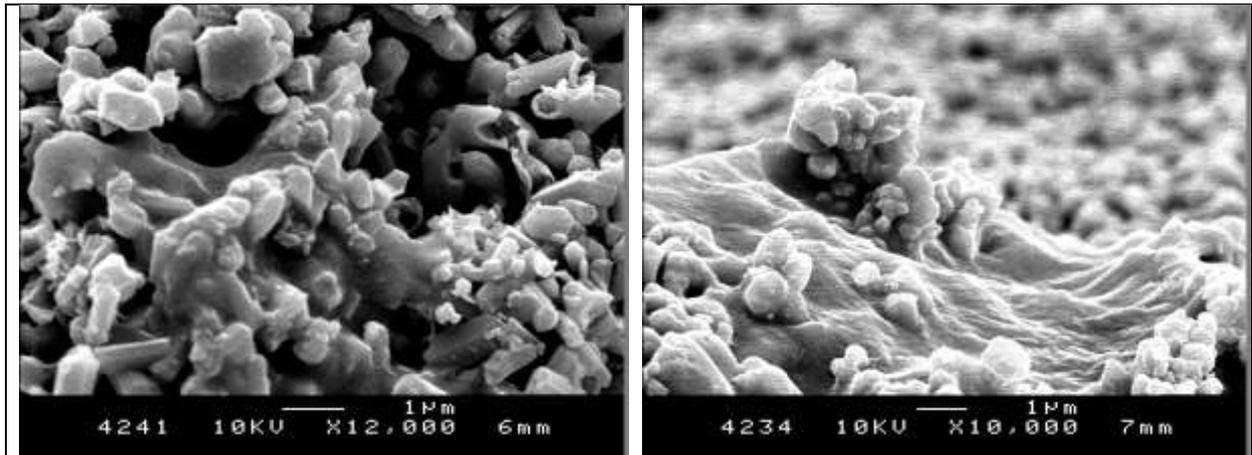
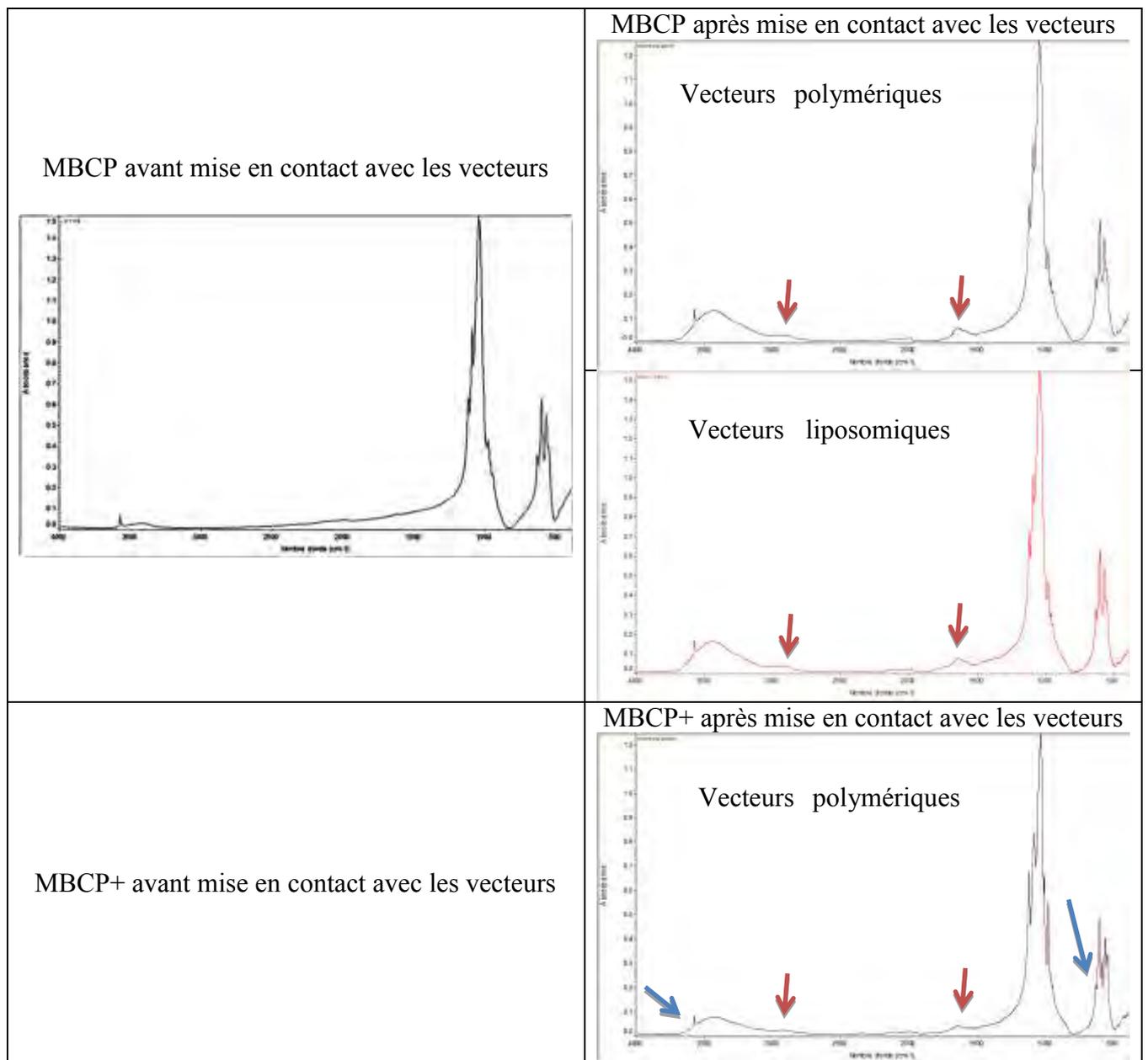


Figure 42 : Vecteurs liposomiques (flèches rouges) déposés sur MBCP (gauche) et MBCP+ (droite)



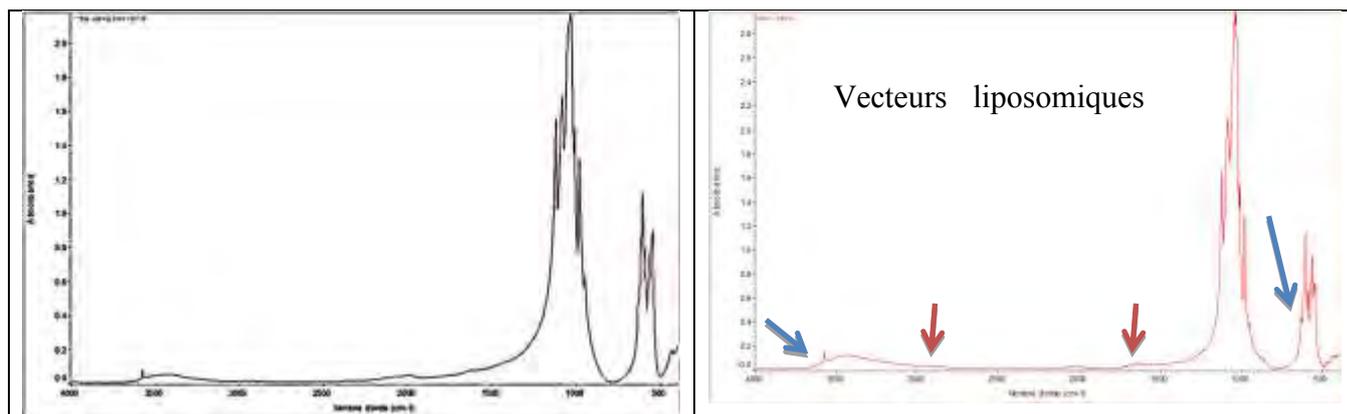


Figure 43 : Spectres IRTF. Flèches bleues : renforcement de la présence des groupes OH apatitiques. Flèches rouges : Apparition de pics de carbonate et de groupement alkyls CH-

Conclusion et discussion sur l'étude d'adhésion des vecteurs

L'adhésion de vecteurs de transfusions sur les matrices phosphocalciques MBCP® et MBCP+® est possible, avec une plus grande affinité des vecteurs polymériques pour le MBCP+® et une équivalence d'adhésion pour les vecteurs liposomiques entre les 2 types de granules. Cette légère différence d'adhésion donnerait l'avantage aux vecteurs liposomiques à même d'adhérer sur les deux types de granules.

Les granules MBCP sont restés stables chimiquement après les traitements de déposition des vecteurs A et B. En revanche les granules MBCP+® sont instables pendant ces traitements, la phase β -TCP s'étant partiellement dissoute durant les étapes *in vitro* de mise en contact dû à sa plus grande vitesse de dissolution (Daculsi *et al.* 2003). Le ratio des MBCP+® est ainsi passé de 20/80 à 35/65 en moyenne. Cette étude de faisabilité montre que les produits de réaction utilisés pour déposer les vecteurs sur les granules provoquent un fort relargage de phase β -TCP qui est une phase à dissolution rapide (Daculsi *et al.* 2003).

Le développement de nouveaux granules creux

Afin d'élargir l'éventail de matrices ostéoconductrices disponibles et de proposer une formulation capable d'accueillir et de protéger au maximum les cellules, un nouveau type de granule a été synthétisé. En effet lors des étapes de manipulations avant et pendant l'implantation ainsi que *in vivo* en présence du flux sanguin, des frottements entre les granules peuvent se produire, abrasant la surface des granules et endommageant alors potentiellement les cellules adhérentes sur leur surface (Cartwright 1994; Davis 2001). Dans le cas des granules de la gamme des MBCP, ces frottements n'ont qu'un effet mineur car les cellules adhérentes se trouvent essentiellement dans les concavités des macropores et sont donc protégées de ses forces de frottements comme nous l'avons vu dans les résultats de l'article annexé au chapitre 2. En revanche avec des granules ronds classiques, les cellules ne peuvent qu'être sur les convexités inhérentes à leurs morphologies sphériques et donc ouvertement soumises à ces contraintes tribologiques.

Pour répondre à ce cahier des charges du projet GAMBA, une nouvelle formulation galénique de granules de BCP a été mise au point. Ces nouveaux granules ont la spécificité d'être creux, ovoïdes et ouverts, offrant ainsi une concavité interne disponible à l'adhésion cellulaire. Cette

morphologie ressemblant ainsi à celle des coquillages nous leur avons donné l'appellation en anglais « hollow shells » ou granule creux.

La méthode de granulation utilisée pour obtenir cette formulation n'a pas encore été brevetée et ne sera pas décrite dans le présent manuscrit par souci d'en préserver le secret dans le cadre de la propriété intellectuelle.

Les granules obtenus par cette méthode ont un diamètre externe pouvant aller de 50µm jusqu'à environ 1mm. Leur synthèse incluant une étape de frittage au-dessus de 1000°C, ils possèdent comme les granules de la gamme MBCP® une microporosité à la fois interne et externe. La morphologie des granules n'est pas homogène, ainsi on trouve dans les échantillons synthétisés des granules le plus souvent ovoïdes mais parfois des formes en demi-coquilles sont présentes, comme les clichés MEB de la Figure le montrent.

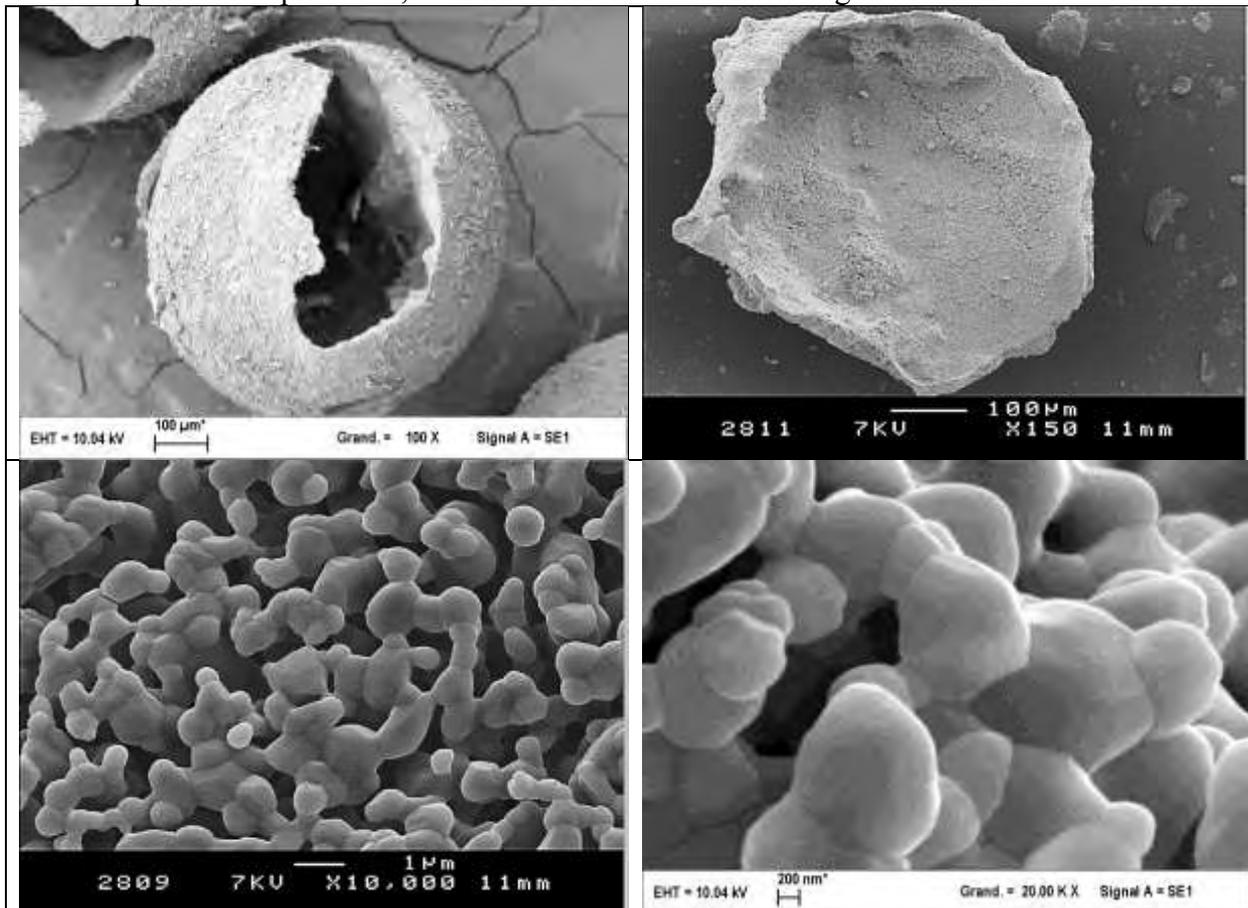


Figure 44 : Images de MEB des nouveaux granules creux

Le rôle des concavités microporeuses a été décrit comme un facteur possible d'ostéoinductivité (Ripamonti et Roden 2010), les cellules souches adhérentes au sein des concavités de granules seraient ainsi susceptibles de se différencier en lignées osseuses sans apport d'agents bioactifs (Yuan *et al.* 2010). Ceci rejoint les notions de bioactivité provoquée par les modifications de topographies rendant bioactif même un biomatériau bioinerte. Ce phénomène a été observé lors de la présentation de l'étude avec les granules de la gamme MBCP® au chapitre 2. Ces nouveaux granules creux se basent sur ce concept visant ainsi à accueillir les cellules souches par de larges concavités et favoriser leur caractère ostéoinductif. Un effet qui devrait donc s'ajouter avec la transfection de cellules de la stratégie du projet GAMBA. La tomographie X permet de constater les concavités internes sur l'ensemble des granules d'une même synthèse comme la Figure le montre.

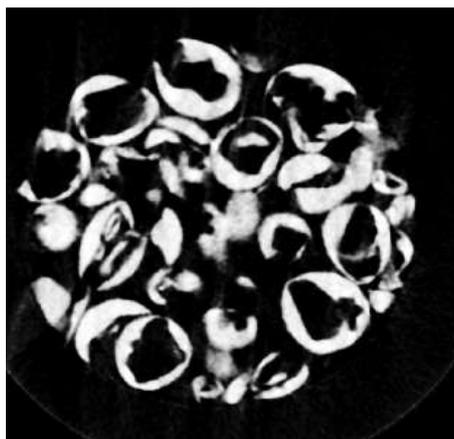


Figure 45 : Microtomographie d'un lot de granules creux

De nombreux articles de la littérature et de brevets décrivent des granules creux d'hydroxyapatite, non pas en forme de coquillage ouvert mais toujours sphériques et fermés mis au point par des technologies spécifiques de granulations ne permettant pas l'obtention d'une microporosité, ni de concavité directement accessible pour un dépôt de cellules. Ces granules sont parfois même nanoscopiques et ne peuvent donc accueillir des cellules dont le diamètre initial est de l'ordre de quelques micromètres. Seul un brevet décrit la formation de granule creux équivalent aux nôtres, possédant une même microporosité interne et externe ainsi que cette ouverture sur une concavité interne. Cependant la méthode de synthèse est totalement différente et ne permet pas l'obtention de granules de taille inférieure à 350 μm . Ce brevet ne mentionne pas non plus la possibilité d'obtenir des BCP, et les granules sont sphériques plutôt que ovoïdes, c'est pourquoi notre méthode reste aujourd'hui originale.

Le tableau suivant présente, en comparaison avec les granules creux mis au point durant ce doctorat notés [A], les exemples les plus représentatifs d'études ou brevets dont les descriptions concordent avec l'obtention de granules ou billes creuses. Les deux brevets dont les propriétés des granules décrits sont les plus similaires sont notés [B] et [C].

<i>Auteurs/ inventeurs</i>	<i>Matériaux</i>	<i>Échelle de taille des granules</i>	<i>Morphologie ouverte ou fermée</i>	<i>Microporosité</i>	<i>Macroporosité</i>	<i>Applications revendiquées</i>
[A] Granules creux «hollow shells»	BCP (HA et β-TCP)	50μm à 1mm	Ouverte	externe et interne	concavité ovoïdale interne	Porteurs de cellules
Article (Fu et al. 2011)	Si-HA	100- 150 μm	fermée	non	Concavité sphérique interne / épaisseur mésoporeuse	Délivrance de principes actifs (protéines, médicaments)
Article (Li et al. 2010)	HA/chitosan	100-200 nm	fermée	non	Concavité sphérique interne	Délivrance de principes actifs (protéines, médicaments)
Article (Santoni et al. 2007)	BCP (HA et β -TCP)	700- 800 μm	fermée	Externe et interne	Concavité sphérique interne	Délivrance de principes actifs (protéines, médicaments)
Article (Qiu et al. 1999)	Bioverres + dépôt de HA en surface	100- 200 μm	fermée	externe	Concavité sphérique interne	Délivrance de principes actifs (protéines, médicaments)
Article (Senuma et al. 2000)	PLA	160-320 μm	ouverte	non	Concavités multiples internes	Encapsulation de cellules

Article (Eckert et al. 2000)	Al ₂ O ₃	5mm	ouverte	Interne et externe	Concavités multiples internes	Porteurs de cellules
Brevet (Starling and Stephan 2001)	BCP (HA et β-TCP)	500µm à 3mm	fermée	Externe ; Interne : non indiqué	Concavité simple ou multiple interne	Porteurs de cellules
[B] Brevet (Radin et al. 2002)	Si-CaP (non précisé)	200µm à 5mm	ouverte	Nanopores externe et interne	Concavité ovoïde interne	Porteurs de cellules
[C] Brevet (Maspero et Ruffieux 2003)	HA ou β- TCP	350 µm à 2 mm	ouverte	Interne ; Externe : non indiqué	Concavité sphérique interne	Porteurs de cellules

Tableau 16 : Liste des études et brevets similaires ou approchant à la synthèse de granules creux de BCP

Parmi les exemples représentatifs présentés, certains font appel à la synthèse de nano ou microparticules sphériques par passage sous pression au travers d'une buse (Li *et al.* 2010 ; Senuma *et al.* 2000). Un examen des articles révèle le plus souvent une synthèse de granules de phosphate de calcium à partir de verres ou de bioverres après dissolution des phases amorphes (Fu *et al.* 2011 ; Radin *et al.* 2002). Ces méthodes incluant des étapes de sol-gel ne sont pas comparables à celle utilisée pour nos synthèses de granules creux. En revanche dans le tableau ci-dessus est mis en avant 2 brevets (noté [B] et [C]) dont les méthodes de synthèses sont très différentes mais dont les granules résultants montrent une grande similarité. La morphologie des granules de CaP du brevet [B] (aucune autre précision n'a été mentionnée dans ce brevet), synthétisés par méthode sol-gel à partir de verres silicatés, ressemble à celle d'une coquille vide comme dans notre cas, les inventeurs ont d'ailleurs appelé leur granule « hollow CaP-shells ». Mais leurs compositions, leur cristallinité et leur microstructure n'ont pas de rapport avec les granules [A]. Les granules [C] sont très similaires aux [A], surtout sur le plan de la morphologie globale, et la composition HA ou β-TCP qui les dédient également à l'ingénierie tissulaire osseuse. La figure ci-dessous démontre ces proximités, même si les clichés des brevets sont de mauvaise qualité.

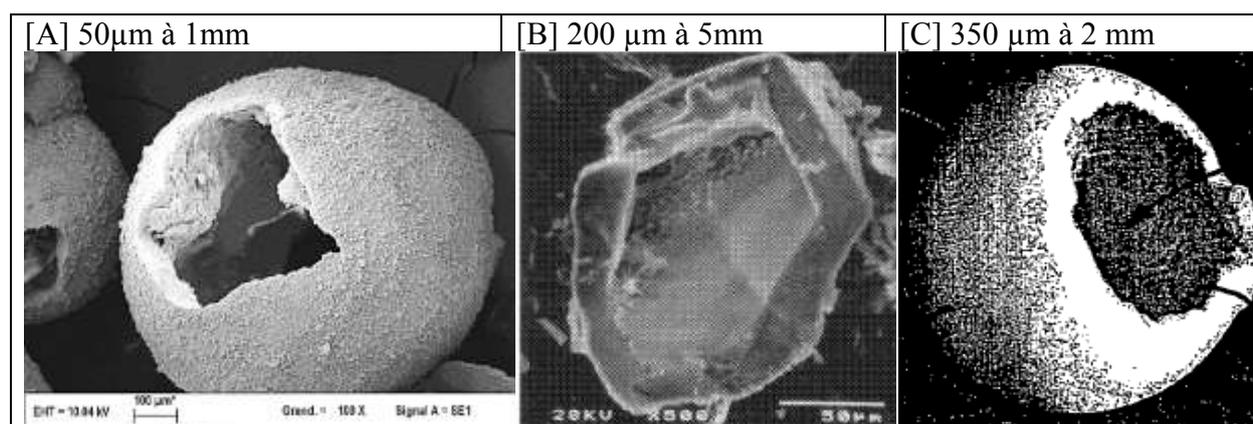


Figure 46: Image de MEB des 2 brevets [B] et [C] les plus proches des granules creux développés [A]

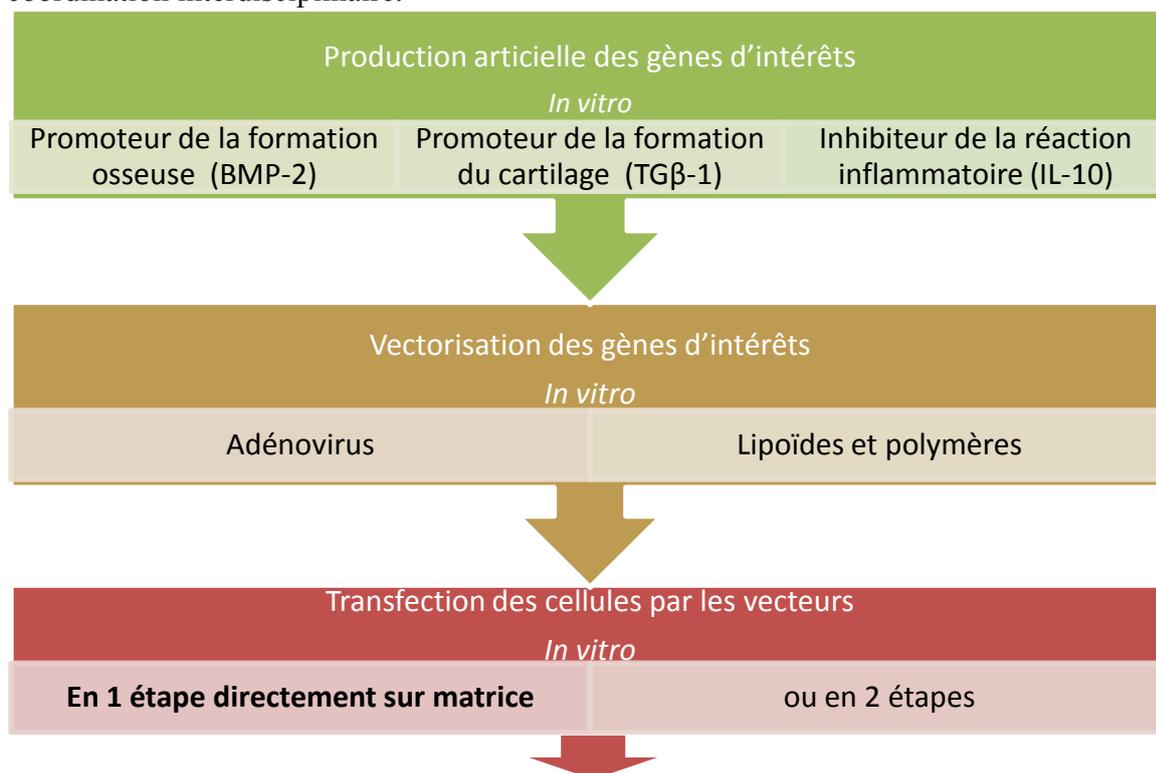
Ainsi la majorité des études mentionnant des granules creux désignent des particules fermées destinées à encapsuler le plus souvent des principes actifs (médicaments, protéines...) pour des systèmes de délivrance (DDS pour Drug Delivery System) ou de façon beaucoup plus rare à encapsuler des cellules. Par contre un seul brevet et aucune publication, n'a à notre connaissance décrit des granules aux propriétés équivalentes avec cependant quelques nuances dans la morphologie (sphérique dans le cas du brevet, ovoïde dans notre cas) et dans

les limites inférieures de taille de granules (350 μm dans le brevet et 50 μm dans notre cas). De plus le brevet ne décrit pas précisément la microstructure externe dont on ne sait pas si elle est microporeuse comme dans le cas de nos granules creux. Les deux formes A et C s'apparentent à la forme classique de granules ronds et denses. Le simple fait d'intégrer une macroporosité interne donne un intérêt potentiel à l'adhésion, la sauvegarde et la différenciation des cellules souches dans un microenvironnement au relargage ionique favorable (notamment comme nous l'avons expliqué par la présence de la phase plus soluble de β -TCP), microporeux et concave.

C'est dans cette logique de comparaison entre granules apparentés, ronds-denses et ronds-creux qu'une première étude comparative a été menée afin de distinguer d'éventuelles améliorations dans l'adhésion de cellules et leur viabilité *in vitro* ainsi qu'en évaluant les termes de la repousse osseuse après implantation de chaque type en site fémoral chez le rat. Cette étude est présentée au paragraphe suivant.

Conclusion sur les enjeux du projet GAMBA

Le projet GAMBA est ambitieux puisqu'il vise la réparation simultanée de l'os sous-chondral et du cartilage tout en inhibant les processus inflammatoires douloureux dans la cavité synoviale des articulations. L'encensement de la différenciation des cellules souches en cellules de lignée osseuse et cartilagineuse par transfection de gènes codant pour la synthèse de protéines d'intérêts se base à la fois sur les mécanismes paracrines* et autocrines*. En effet des cellules souches des futurs potentiels patients seront isolées puis transfectées *in vitro* en une seule étape par adhésion préalable des vecteurs viraux ou non-viraux. Les essais préliminaires d'adhésion de ces derniers sur les granules de la gamme MBCP® étant prometteurs bien que de nouveaux tests avec une plus grande concentration de vecteurs soient nécessaires afin de confirmer les premiers résultats. Les contraintes de frottements entre granules pouvant diminuer la qualité et la durabilité de l'adhésion cellulaire, surtout avec des granules ronds et denses, a mené à la synthèse de nouveaux granules ronds et creux par une méthode encore inédite. La figure suivante récapitule ces enjeux complexes nécessitant une coordination interdisciplinaire.



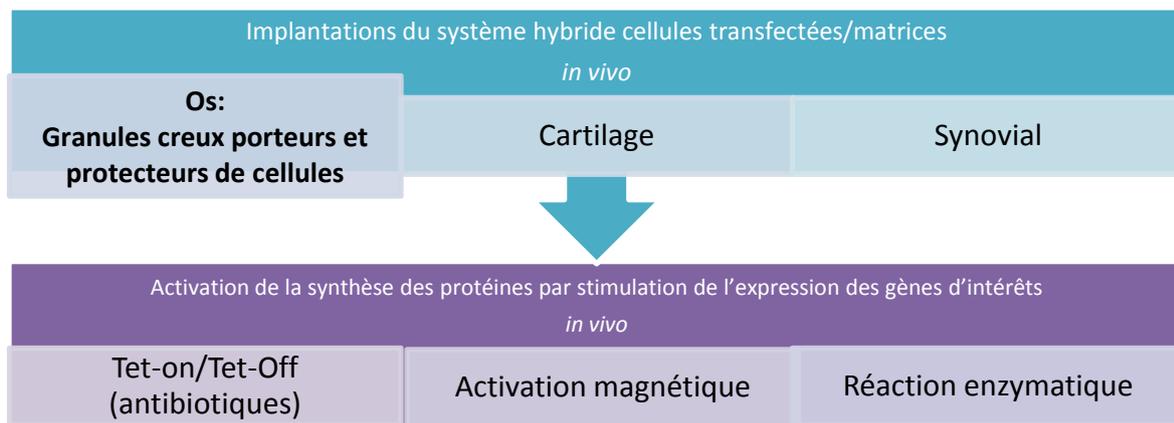


Figure 47 : Résumé synthétique des stratégies évoquées dans le projet GAMBA

3.1.2. Étude comparative granules ronds-denses/ronds-creux

Afin de caractériser au mieux ces nouveaux granules ronds-creux et d'évaluer leur potentialité en tant que porteur de cellules, nous avons effectué une étude comparative entre cette nouvelle formulation creuse et la formulation classique des granules ronds-denses auxquels ils sont apparentés. Les granules micro-macroporeux de la gamme MBCP® étant déjà utilisé dans le projet GAMBA, nous ne les avons pas intégrés à cette étude comparative. L'article annexé ci-après sera discuté et complété au paragraphe suivant.

Le plan de l'étude intégrant caractérisations physico-chimiques, test *in vitro* et implantation *in vivo* en site fémoral de rat est représenté sur la figure ci-dessous.

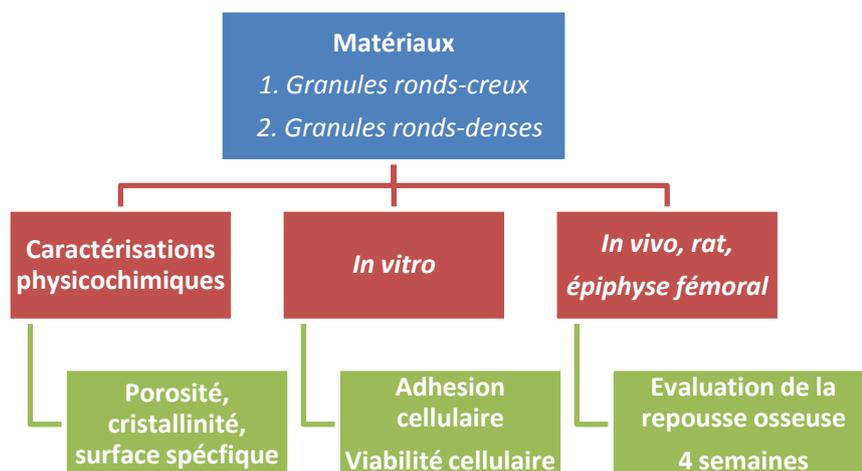


Figure 48 : Plan général de l'étude comparative granules ronds-denses/granules ronds-creux

**“Hollow Shells Development and Characterisation for cells
carrying purpose”**

Biomaterials (soumis)

Hollow Shells Development and Characterisation for cells carrying purpose

Miramond.T^{1,2}, Baroth.S^{1,2}, Colombeix.C¹, Borget.P², Moreau.F², Fellah.B³, Daculsi.G¹

¹ INSERM U791, Nantes University, Nantes, France, thomas.miramond@etu.univ-nantes.fr

² Biomatlante SA, Nantes, France

³ BBTOCEX, Service de chirurgie Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, France

SUMMARY

Bioceramics draw attention in bone tissue engineering field since their biomimetic properties regarding bone attribute. In this context, a concept of smart bioceramics granules made of Hydroxyapatite have been set up, enhancing surface area available to body fluids containing proteins and cell adhesion for bone forming respectively thanks to microporosities and macropore concavities. New “hollow shell” granules were developed and assessed by physico-chemical characterizations, in-vitro experiments and in-vivo implantation in comparison with classical round granules. This new original galenic formulation showed promising potential in cell carrying and osteoconduction matter.

Keywords: osteoconduction – calcium phosphate – biomaterials – hollow granule

INTRODUCTION

The interests of the crystalline phase hydroxyapatite (HA) for bone regeneration are known and largely studied for decades (Albee, 1920; Aoki, 1991; Dorozhkin, 2010; LeGeros and LeGeros, 1993; Willmann, 1996). Granule shapes are used as bone filling when strong mechanical properties are not required (Christopher, 2002; Moore et al., 2001). The material is gradually dissolved in the body, seeding new bone formation as it releases calcium and phosphate ions into the biological medium (Dorozhkin, 2002; Kokubo *et al.*, 2003; LeGeros, 2002).

Hydroxyapatite is obtained when calcium-deficient apatite is sintered at temperatures above 700°C. Calcium deficiency depends on the method of preparation (precipitation, hydrolysis or mechanical mixture) including reaction pH and temperature (LeGeros *et al.*, 2003). Properties of bioceramics relating to their medical applications include: macroporosity, microporosity, mechanical properties, bioreactivity associated with in vitro and in vivo carbonated hydroxyapatite formation on ceramic surfaces, dissolution, and osteoconductivity (Bohner, 2000; Gauthier *et al.*, 1998; Hench and Polak, 2002; von Doernberg *et al.*, 2006).

Two large European programs of the 7th PCRD are investigating Bone Tissue Engineering (REBORNE) and Gene Osteoarticular Therapy (GAMBA). These exploratory studies required bioceramic granules with specific properties to carry cells or transfection vectors. This study was then focused on the design of new galenic formulation capable of both hosting cells by a large internal concavity, and allows the invasion of biological fluids by a porous microstructure (Ripamonti and Roden, 2010). Comparison between classical round granules and new hollow shells properties were assessed so as to determinate whether the new morphology could be used in these European projects as scaffold for tissue engineering or gene therapy.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1 Granule Synthesis

Different technologies were used for granules elaboration using Calcium Deficient Apatite (CDA) powders. 2 types of granules were synthesized: classical Round shape and new Hollow Shell shape only based on hydroxyapatite phase.

CDA powders were obtained from Biomatlante company (Vigneux-de -Bretagne, France). Both hollow shells and round granules were synthesized from CDA powders by two different ways. The main difference is the use of naphthalen porogen powder mixed with CDA powder being rotatively mixed. Sublimation of this porogen induced the formation of an internal hollow concavity, and the resultant granule morphology was shell-like.

Round granules and hollow shells were passes through sieves so as to keep respectively 400-600 μm and 400-650 μm granules.

1.2 Physico-chemical characterizations

Physico-chemical characterizations of those granules were carried-out by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infra-red (FTIR), Brunauer-Emmett-Teller (BET) method for specific surface area (SSA), Mercury porosimetry, and visualized by Scanning electron microscopy (SEM). Granule shape, crystal size, pores distribution and specific surface area were the main studied parameters.

All granules were previously manually crushed in agate mortar to have homogeneous particles before analyzing by XRD, FTIR.

X-ray diffraction (PW 1830 generator, Philips) was performed to check crystalline phases using $K\alpha$ Copper radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) with a scan step time of 2s and step size of 0.002° (2θ).

Pellets containing 1.5% of sample were used to record Fourier transform infrared spectra (Magna IR 550, Nicolet Instruments). This method allows us to control whether undesirable chemical groups, such as carbonates and pyrophosphates (Bohic *et al.*, 1998), are avoided during synthesis process.

Samples were platinum-gold sputtered before microstructure observation using scanning electron microscopy (LEO 1450VP, Zeiss).

Specific Surface Area (SSA) measurements were determined using Brunauer-Emmett-Teller method (BET) by nitrogen adsorption at 77K (Asap2010, Micromeritics).

Pore distributions were assessed by mercury intrusion porosimetry (Autopore IV 9500, Micromeritics). Prior to analysis samples were degassed to remove physisorbed gas. Low pressure test was performed followed by high pressure test. The pressure was then varied from 0 to 30000 psi.

1.3 In vitro tests

In vitro experiments were realized with MC3T3 murine cells seeded on both granule types at 10^4 Cells/cm². Granules were gently stirred on an agitator plate in order to avoid that cells attached only in concavity of hollow shells by gravity. MC3T3 were cultured in a 5% CO₂ incubator at 37 °C in α -MEM medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 1% of L-glutamine and 1% of penicillin/streptomycin.

At day 3 and 6, cells were fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) then the immune-independent actin marker phalloidin (Sigma-Aldrich) have been incorporated to the seeded cells after using a permeabilization buffer (Tween 0.05%, BSA 3% in PBS). Nucleus staining was obtained only on MC3T3 cells thanks to Topro-3 DNA dye (Invitrogen). Stained cells were observed *in situ* using fluorescent and confocal microscopy.

Cell viability was assessed by MTS assay after 3 and 6 days using the mitochondria tetrazolium salt (MTS) test. This colorimetric test measures the ability of living cell mitochondria to oxidize tetrazolium salt in formazan (Goodwin *et al.*, 1995). Results were expressed as relative MTS activity compared to positive control (cells cultured on culture-treated plastic).

1.4 In vivo implantations

3 Wistar Han male rats 8 weeks old (Charles Rivers, France) of 350g were implanted with hollow shells and round-shaped granules in orthotopic sites (n=3). A 2-3mm of diameter and 3mm of deepness bone defect was performed in femoral epiphysis and fill with hollow shells without any cells adding so as to assess osteoconduction potential of this new galenic formulation. Empty defects were considered as control. Explantation was done after 4 weeks and histological analysis was achieved as previously described (Jegoux *et al.*, 2008). Briefly, explants were included in glycol methylmethacrylate (GMMA) resin so as to carry out histological sections. Goldner coloration was chosen to distinguish new bone formation from native bone.

2. RESULTS AND DISCUSSIONS

2.1 SEM-EDX

Macro and microstructure were controlled by SEM. Shape and sizes of granules were verified as homogeneous in each lot. Both macro and micro structure have been verified as homogeneous for each type of granule (figure 1). Microstructures comparison leads to conclude that round granules have less microporosities than hollow shells (figure 2).

Hollow shell grain boundaries as shown on figure 2 enable to approximate that grain size are inferior to 1 μ m in diameter. Hollow shell wall thickness was directly determined by measuring on SEM pictures (figure 3). It was found to be thin, around $15\mu\text{m} \pm 5$.

3.2 Infra-red spectroscopy

All synthesis processes lead to controlled chemical composition, without undesirable lattice substitutions (figure 4). Briefly phosphate and dihydrogen phosphate (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-}) appears respectively between $900\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ and $550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ while apatitic hydroxyle peak is visible at 3550 cm^{-1} (Gadaleta *et al.*, 1996).

3.3 X-Ray diffraction

Diffraction patterns of manually ground granules showed that only HA phase was in presence as expected on both granules type. No undesirable phases were founded such as calcium oxide (CaO) or tetracalcium phosphate (TTCP) (Best *et al.*, 2008; Obadia *et al.*, 2007). Main peaks of HA appears at 2θ values 31.75° (figure 5) which are correlated to preferential crystallographic axis direction [1;2;1]. Round granules and hollow shells presented equivalent diffraction pattern with the same full width at half maximum as seen on figure 5 which indicates a same level of high crystallinity.

3.4 Specific surface area and developed surface

The specific hollow shell granules developed have SSA up to $2 \text{ m}^2/\text{g}$ when round granules presented a SSA around $1 \text{ m}^2/\text{g}$ (table 1). These results are conformed to expected values (Fellah *et al.*, 2008). These specific surface areas are available to protein adsorption and body fluids absorption (Habibovic *et al.*, 2005; Malard *et al.*, 2007). In order to have an approximation of surface available to cell adhesion, a simple calculus has been set up for each type of granule to obtain the developed surface: round granule has been considered as spheres whose surface directly corresponds to the surface visible to the cells. Microporosities are not included in the calculus since once the proliferation started, cells extensions goes easily over it. Hollow shell surface has been modeled as a double sphere, an external one with a radius r equal to the sphere equivalent diameter, and the internal one as $(r-30\mu\text{m})$ which represents the external radius minus the wall thickness as described above during SEM microscopy (figure 6). These estimations of developed surface demonstrated that hollow shells has double surface available to cells (developed surface) and double surface available to proteins (SSA) than round granules.

3.6 Mercury porosimetry

Hollow shells have only one concavity which can be considered as one macropore and microporosities, while round-shaped granules have no macropores but only micropores. All these porosity profiles are well described using mercury porosimetry method (table 2 and table 3).

Each shape has its own pore distribution profile; round shape provide mainly micropores in the range 1 to $10\mu\text{m}$ hollow shells have a large volume of internal concavity combined to micropores ranging $10\mu\text{m}$ to 100nm .

3.7 In vitro tests

Cell viability was found to be over 75% by MTS ($n=3$) assay for each type of granule after 3 and 6 days (figure 8), while cell spreading on granules was observed after both 3 and 6 days (figure 7) thanks to cell spreading (morphology) and cell extensions (pseudopodia and filopodia). Some cells attached on convex surface but the majority of the cells preferred concave surface of inner hollow shell macropores. Hollow shells being brittle it does often break, offering 2 concave surfaces to carry and protect cells from frictional force (figure 9).

3.8 In vivo explantation analysis

Histological sections (Goldner coloration) were analyzed by microscopy on 4-weeks explanted samples (figure 10 and figure 11). New bone formation in and around hollow shells clearly appeared as well as osteoclasts resorbing biomaterials. Medullar components of bone marrow seemed to be present inside each hollow shell which means there is a strong positive interaction between bioceramics and host bony environment. Moreover, higher magnification point out the compacity difference between hollow shells thin edge, penetrated by cells and body fluids, compared to intact surface of round granules (figure 10 (c), figure 11 (c)).

Image analysis showed how the new bone forming appears both inside the concavities of hollow and outside on the convex surface while new bone forming can only be seen at the surface of round granule (figure 12). Although the ratio New Bone Forming/Defect Surface is equivalent for both formulations, the ratio Bone Surface/Bioceramic Surface is higher for hollow shells which means osteoconduction performance is better with these hollow shells. In other words, less quantity of biomaterials is needed to obtain the same quantity of new bone (table 4).

CONCLUSION

The comparison between new hollow shells and classical round granules studied offers a good insight about assets associated to each galenic formulation. Hence, the round granules more compact and less resorbable will be preferred for purposes requiring greater mechanical strength such as bone filling (Bohner and Baumgart, 2004). Cells cannot penetrate into the micropores so the convex surface of the round granules is the only possibility of osteoconduction. Since interconnected macropores of porous shape granules have a positive effect on the adhesion and proliferation of cells that predispose them to use oriented bone tissue engineering. Microporosity always present offers both a large surface area for proteins adsorption and absorption of biological fluids favoring the progressive dissolution of scaffolds (Daculsi and Layrolle, 2004). Finally hollow shells with their inner concavity and their thin walls can form a favorable protective microenvironment for both proliferation and differentiation of cells (Habibovic *et al.*, 2005; Ripamonti, 1996). Further studies would be conducted to characterize the properties of ionic microenvironment within the hollow shells. These new hollow granules may be intended to act as cells or cDNA carrier for gene therapy issues (Son *et al.*; Uskoković and Uskoković, 2011) while promoting bone ingrowth through osteoconduction property, here demonstrated at least as good as classical bioceramics granules.

Although hollow shells are brittle, it does not have to be considered as a major flaw since if broken, a half-hollow shell still have his cells carrying properties thanks to concavity (figure 14). As explained above the main perspective of use of these granules is cellular and gene therapy that is why they are currently under optimization to be part of the medical device developed in the context of European project GAMBA (Plank *et al.*, 2012).

Additionally, thin walled hollow shells may provide better permeability to biological fluids as aforementioned during histological analysis which is a major asset regarding bone ingrowth at the expense of bioceramics resorption (Daculsi *et al.*, 2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant 7eme PCRD Health, grant agreement REBORNE HEALTH-2009-1-4-2 and grant agreement GAMBA NMP 2009-2.3-1.

We would like to especially thank Pierre Corre from Nantes Hospital, Thierry Rouillon, Paul Pilet from LIOAD and Stephane Grolleau from IMN for their participation to this work.

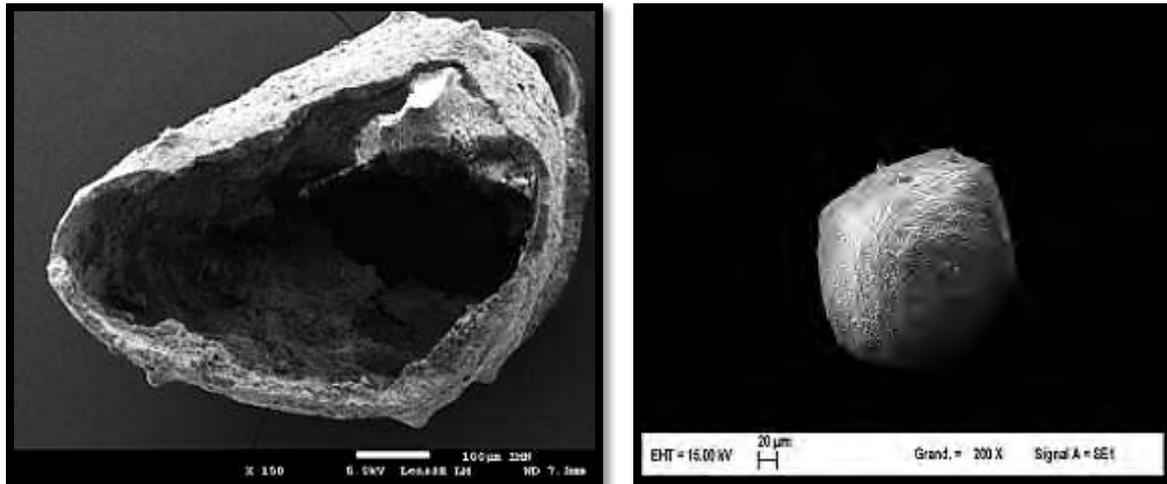


Figure 1: Macrostructures by SEM of New Hollow shells (left) compared to classical round (right)

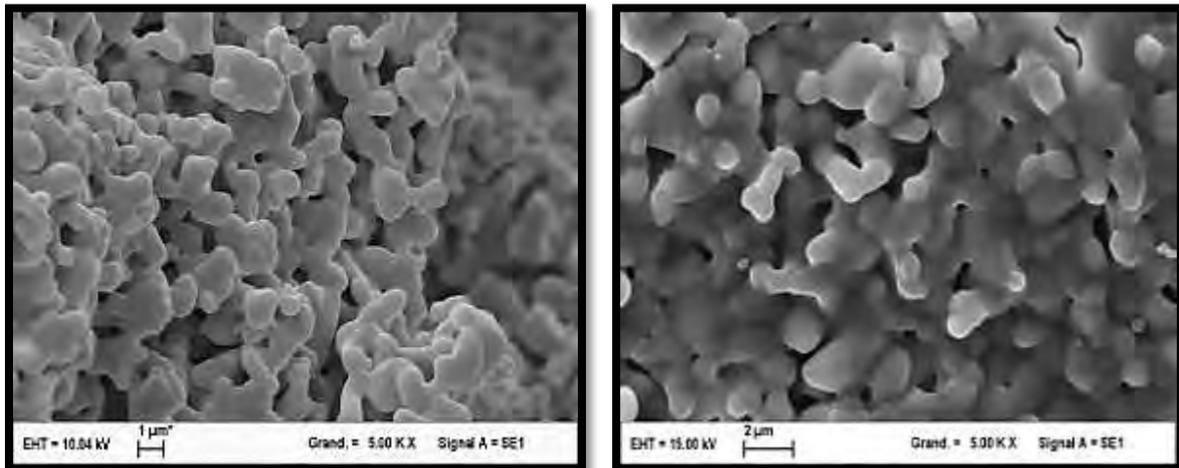


Figure 2: Microstructures by SEM of hollow shells (left) compared to classical round (right).

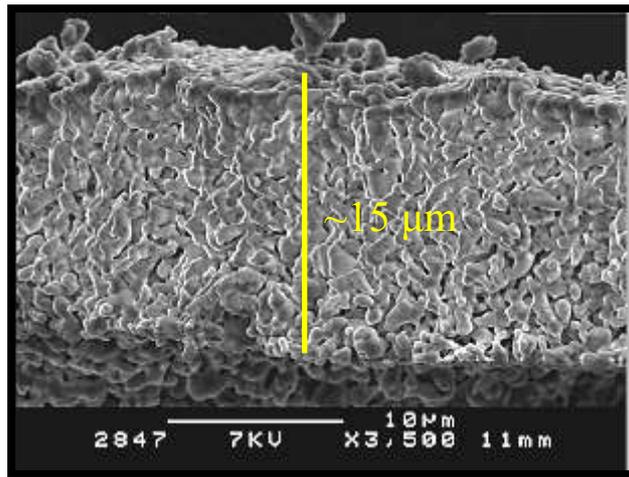


Figure 3: Typical homogeneous edge thickness of hollow shells around 15 μm .

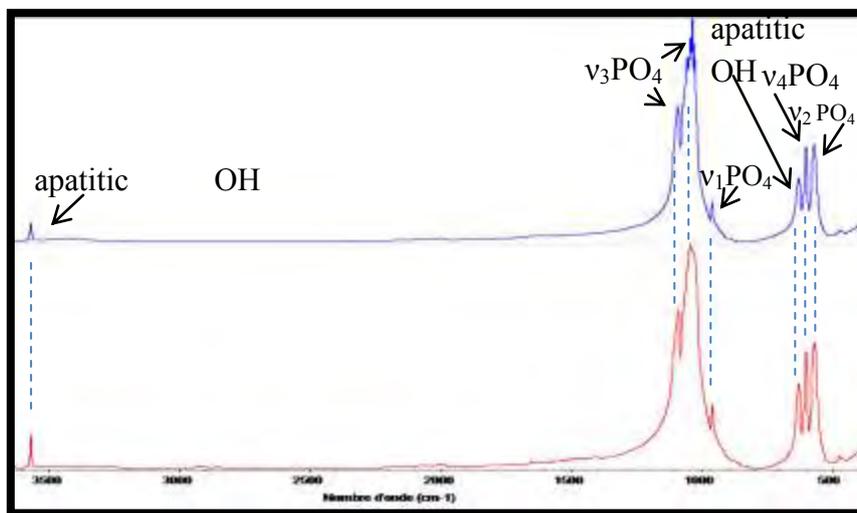


Figure 4: FTIR spectra based on KBr discs (a) round granule HA, (b) hollow shell HA.

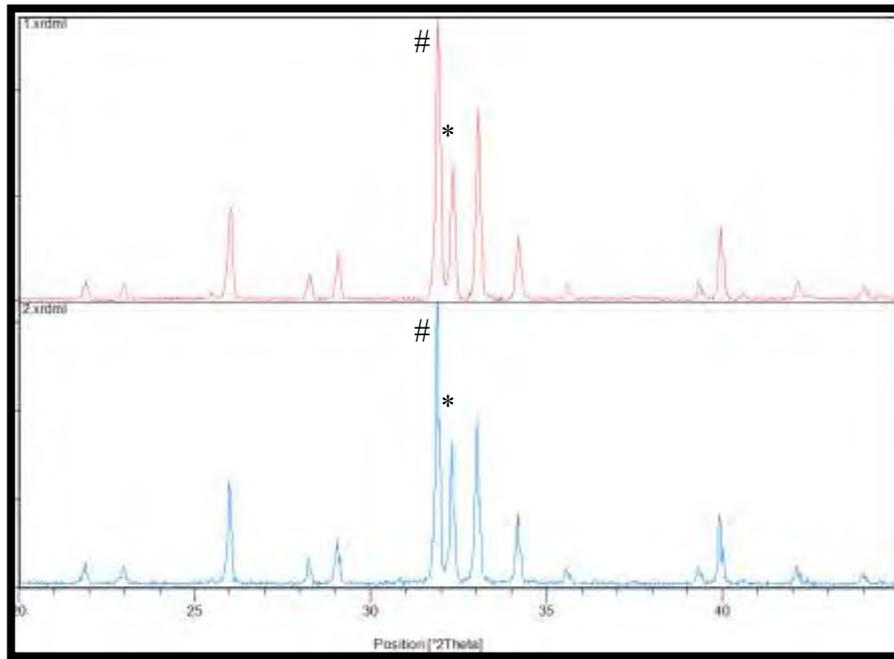


Figure 5: Diffractograms of (a) round granule HA, (b) hollow shell HA.

#: main peak of β -TCP phase *: main peak of HA phase

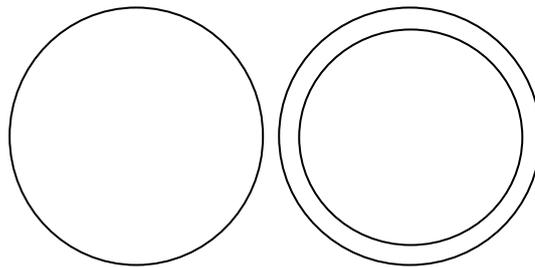


Figure 6: Approximate modelization of round granules (left), hollow shells (right) for Developed Surface estimation.

	SSA m ² /g (n=2)	Developed surface mm ² /granule (calculi)
Round granules 400-600μm	1.0 (0,1)	Πr^2 up to 0,28
Hollow Shell 6040 400-600μm	1.9 (0,1)	$\Pi r^2 + \Pi(r-30)^2$ up to 0,5

Table 1: SSA and developed surface estimation of different types of granules

% volume of total pores	450 μ m to 10 μ m	10 μ m to 1 μ m	1 μ m to 100nm	Total porosity %
Round granules	-	94,4	5,6	58,7
Hollow Shell	66.3	25.8	7.9	81,5

Table 2: Pore distributions and total porosity comparison between hollow shells and round granules

	Micropores	Macropores
Round-shaped	Yes	No
Hollow Shell	Yes	shell concavity

Table 3: Main differences in porosity between the 2 shapes of granule.

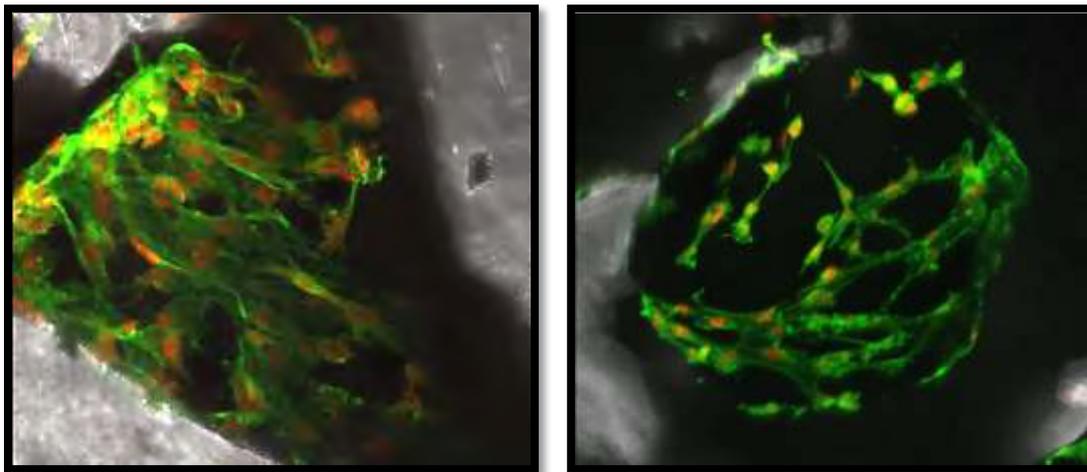


Figure 7: Concept of MC3T3 cells in concavity of hollow shell (a) and on convexity of round granules (b) observed after 6 days of culture by confocal microscopy in glass-bottom Petri dish. In green is the F-actin cytoskeleton, in red the nucleus and in black is biomaterials outline.

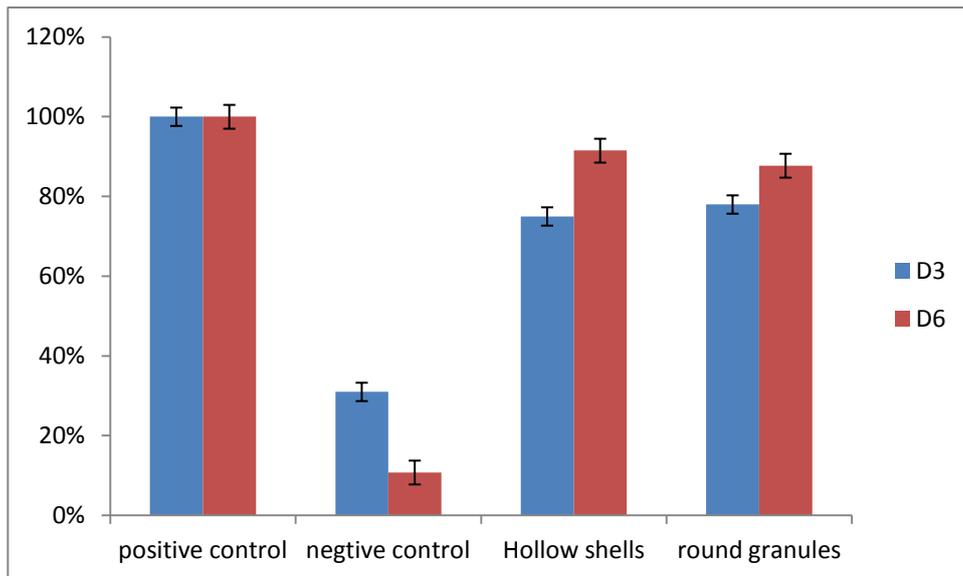


Figure 8: MTS viability assay at day 3 and day 6. Hollow shells and round granules were deposited in ultra-low adhesion 24-well plates. Cells seeded in culture-treated 24-well plates were considered as positive control. Cells seeded in ultra-low adhesion 24-well plates.

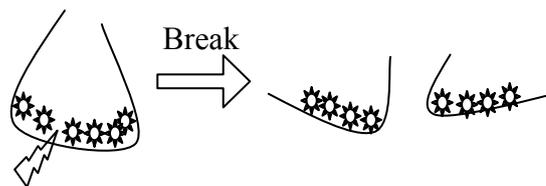


Figure 9: Concept of cell adhesion in concavities of half and non-broken hollow shells.

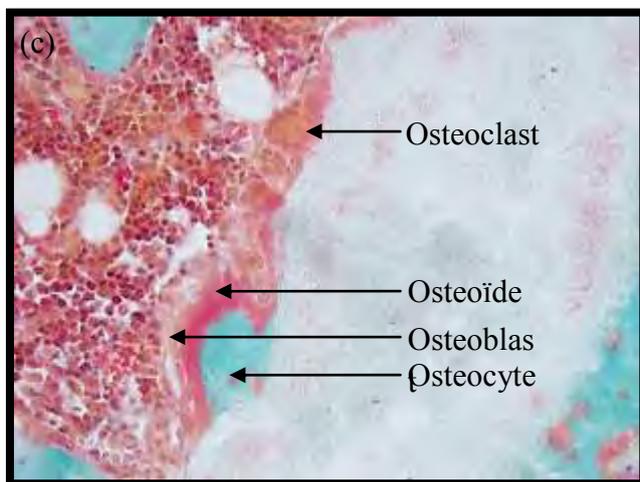
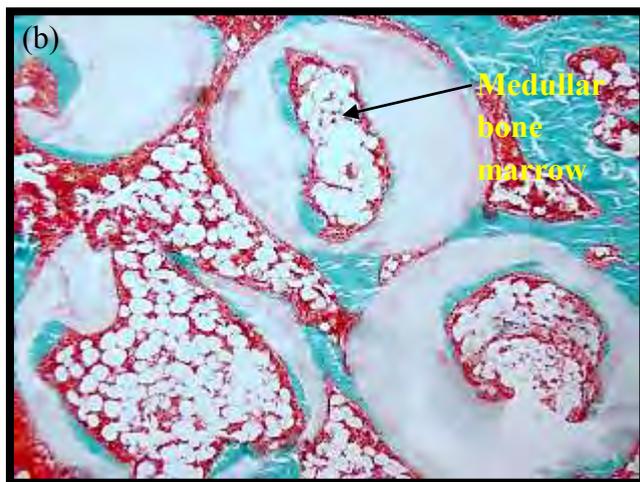
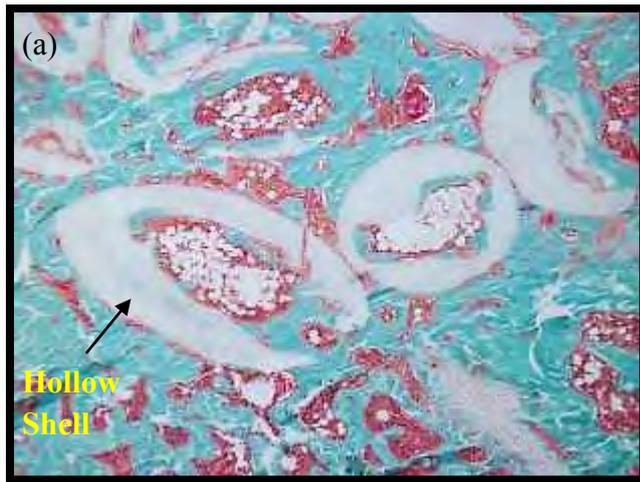


Figure 10: Goldner histological section of Hollow Shells in femoral epiphysis. In green is the new bone, in light grey is the bioceramic and in red and white are the medullar components of bone marrow. (a) Optical magnification x10 (b) x20 (c) x40

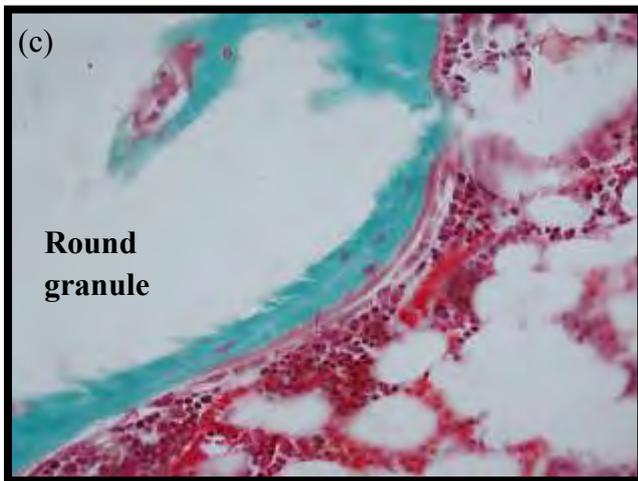
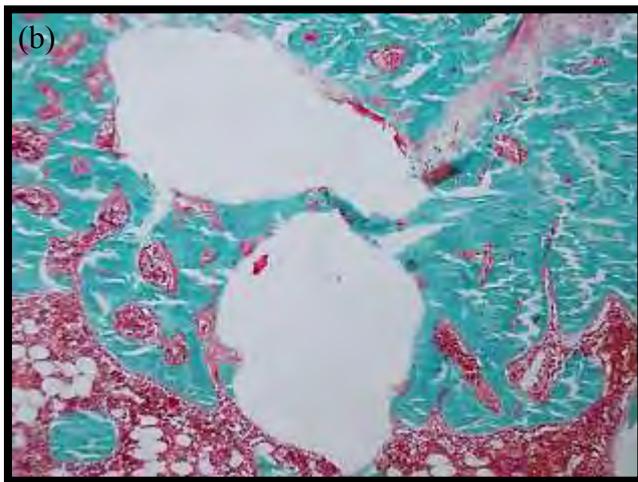
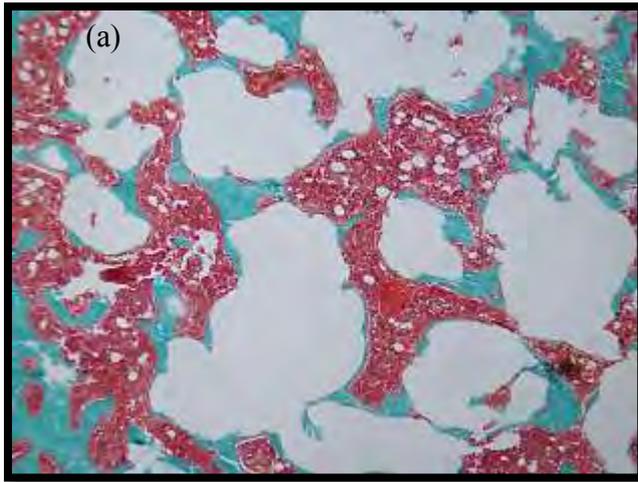


Figure 11: Goldner histological section of round granules in femoral epiphysis. In green is the new bone, in white is the bioceramic and in red and white are the medullar components of bone marrow. (a) Optical magnification x10 (b) x20 (c) x40

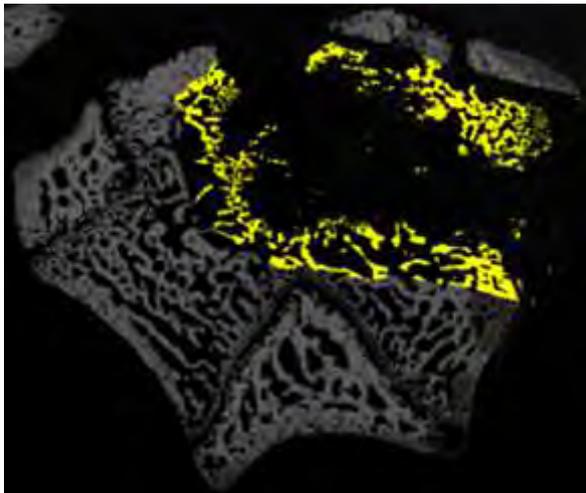
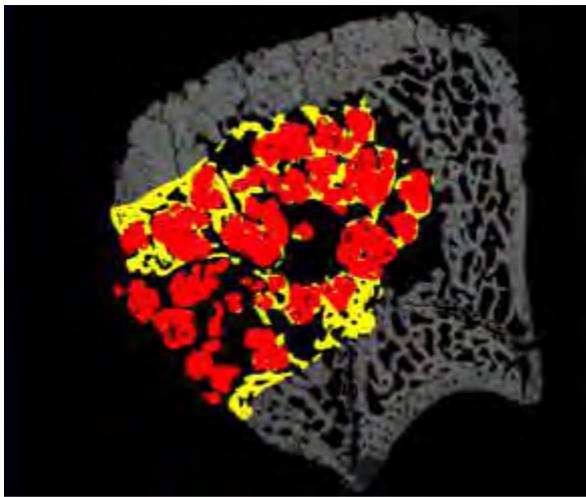
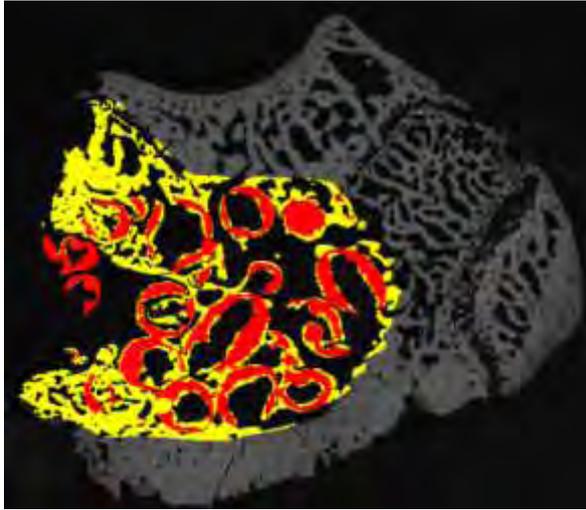


Figure 12: Image analysis from SEM picture of femoral epiphysis filled with hollow shells (up), round shaped granules (middle) and empty control (down) after 4 weeks. In grey is the native bone, in red is the biomaterial and in yellow the new bone forming.

	<i>Ratio New bone surface / Bioceramic surface</i>	<i>Ratio New bone surface / Defect surface</i>
<i>Empty site</i>	-	22%
<i>Round granules</i>	60%	24%
<i>Hollow Shells</i>	104%	24%

Table 4: Image Analysis of bone ingrowth from SEM pictures.

REFERENCES

- Albee FH (1920) Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery* 71: 32.
- Aoki H (1991) Science and medical applications of hydroxyapatite. *Ishiyaku Euroamerica*.
- Best S, Porter A, Thian E, Huang J (2008) Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* 28: 1319-1327.
- Bohic S, Heymann D, Pouézat JA, Gauthier O, Daculsi G (1998) Transmission FT-IR microspectroscopy of mineral phases in calcified tissues. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 321: 865-876.
- Bohner M (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements: Calcium-orthophosphate in der medizinen: von der keramik zu calciumphosphat-zementen: Des orthophosphates de calcium en médecine: des céramiques aux ciments phosphocalciques: Los ortofosfatos de calcio en medicina: de la cerámica a los cementos de fosfato de calcio. *Injury* 31: D37-D47.
- Bohner M, Baumgart F (2004) Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25: 3569-3582.
- Christopher G (2002) Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 84: 454-464.
- Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P (2003) Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14: 195-200.
- Daculsi G, Layrolle P (2004) Osteoinductive Properties of Micro Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics. *Key Engineering Materials* 254-256: 1005-1008.
- Dorozhkin SV (2002) A review on the dissolution models of calcium apatites. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 44: 45-61.
- Dorozhkin SV (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31: 1465-1485.
- Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P (2008) Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 29: 1177-1188.
- Gadaleta S, Paschalis E, Betts F, Mendelsohn R, Boskey A (1996) Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcified Tissue International* 58: 9-16.
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19: 133-139.
- Goodwin C, Holt S, Downes S, Marshall N (1995) Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of immunological methods* 179: 95-103.
- Habibovic P, Yuan H, Van Der Valk CM, Meijer G, Van Blitterswijk CA, De Groot K (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26: 3565-3575.
- Hench LL, Polak JM (2002) Third-generation biomedical materials. *Science* 295: 1014-1017.

- Jegoux F, Aguado E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, Goyenvalle E (2008) Repairing segmental defect with a composite associating collagen membrane and MBCP® combined with total bone marrow graft in irradiated bone defect: An experimental study in rabbit. *Key Engineering Materials* 361: 1245-1248.
- Kokubo T, Kim HM, Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24: 2161-2175.
- LeGeros R, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros J (2003) Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14: 201-209.
- LeGeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 395: 81.
- LeGeros RZ, LeGeros JP (1993) Dense hydroxyapatite. *Advanced series in ceramics* 1: 139-180.
- Malard O, Gautier H, Daculsi G (2007) In Vivo Demonstration of 2 Types of Microporosity on the Kinetic of Bone Ingrowth and Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics Resorption *Key Engineering Materials* 361-363: 1233-1236.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001) Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery* 71: 354-361.
- Obadia L, Rouillon T, Bujoli B, Daculsi G, Bouler JM (2007) Calcium-deficient apatite synthesized by ammonia hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate: Influence of temperature, time, and pressure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 80: 32-42.
- Plank C, Eglin D, Fahy N, Sapet C, Borget P, van Osch G, Gentili C, Miramond T, Zöller K, Anton M (2012) Gene activated matrices for bone and cartilage regeneration in arthritis. *European Journal of Nanomedicine* 4: 17-32.
- Ripamonti U (1996) Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 17: 31-35.
- Ripamonti U, Roden L (2010) Biomimetics for the induction of bone formation. *Expert review of medical devices* 7: 469-479.
- Son JS, Appleford M, Ong JL, Wenke JC, Kim JM, Choi SH, Oh DS Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release* 153: 133-140.
- Uskoković V, Uskoković DP (2011) Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 96: 152-191.
- von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J (2006) In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27: 5186-5198.
- Willmann G (1996) Medical grade hydroxyapatite: state of the art. *British ceramic transactions* 95: 212-216.

3.1.3. Compléments et discussion sur l'étude comparative

Les résultats de la comparaison entre les granules apparentés, ronds-creux et ronds-denses, sont nets concernant la quantité de cellules adhérentes en surface. Les images de microscopie confocale montrent que les cellules adhèrent massivement dans les concavités des granules creux tandis que les surfaces convexes des granules ronds denses présentent moins de cellules. Les analyses histologiques font ressortir une différence non seulement en termes de quantité d'os néoformé en présence des granules creux, mais également les coupes histologiques colorées font ressortir que l'intérieur des granules creux est le siège d'un envahissement par l'environnement médullaire hôte. L'os néoformé se forme à la fois sur les convexités des granules creux mais également sur les concavités. L'épaisseur des granules creux étant très faible, de l'ordre de 20 μ m, cela leur donne une masse volumique plus faible que les granules ronds-denses, et donc la masse de granule creux nécessaire pour une même quantité d'os néoformé est 40% plus faible. De plus le contraste entre ces cloisons de faibles épaisseurs des granules creux et la forte compacité des granules ronds-denses apparaissent clairement en histologie où l'on peut observer la pénétration de fluide biologique au travers des cloisons des granules creux qui les absorbent grâce aux microporosités. Cette étude démontre que les cellules peuvent néanmoins adhérer sur des surfaces convexes et s'y développer, comme le montre le cliché de la figure 49 de confocale complémentaire à l'article du paragraphe précédent, réalisé dans les mêmes conditions. On peut y distinguer des cellules communicantes par la présence d'extensions cellulaires couvrant une grande partie de la surface, prouvant l'aptitude de ces dernières à parcourir une surface convexe microporeuse. Sur la même figure se trouve une image 3D confocale également complémentaire, démontrant quant à elle la pertinence d'utiliser des granules creux comme porteurs de cellules notamment pour le projet GAMBA (Daculsi *et al.* 2011), au vu du grand nombre de cellules visibles, protégées au sein de la concavité.

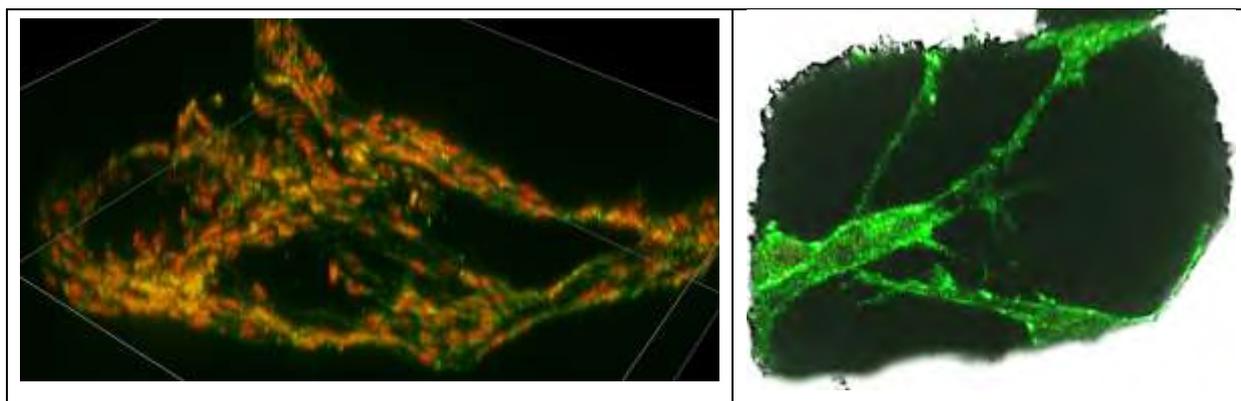


Figure 49 : Complément à l'article, cellules MC3T3 dans la concavité d'un granule creux (gauche) et sur les convexités d'un granule rond et dense (droite) après 3 jours de culture

À l'observation histologique selon laquelle les granules creux présentent de l'os néoformé à la fois à l'extérieur sur les convexités et à l'intérieur dans les concavités, vient s'ajouter l'observation d'un phénomène non-élucidé de concentration de composants médullaires à l'intérieur des granules creux uniquement, comme la figure 50 complémentaire l'illustre.

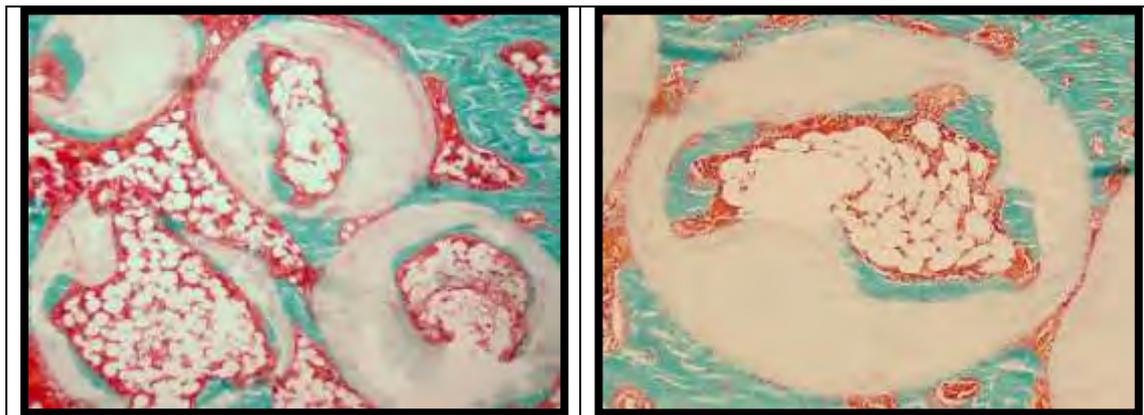


Figure 50 : Concentration de moelle osseuse au centre des granules creux avec cellules adipeuses en blanc

Également la faible épaisseur des cloisons des granules creux et leur forte microporosité constituent un atout pour la résorption, on peut voir sur la figure suivante plusieurs ostéoclastes et leurs lacunes de résorption pénétrant la paroi, dont l'acidité proche de pH égale à 4 accélère la dissolution des cristaux de HA et de β -TCP (Yamada *et al.* 1997). On peut se rendre compte de cette faible épaisseur en comparant la longueur d'un ostéoclaste et la largeur de la paroi le séparant de l'intérieur du granule sur la figure ci-dessous.

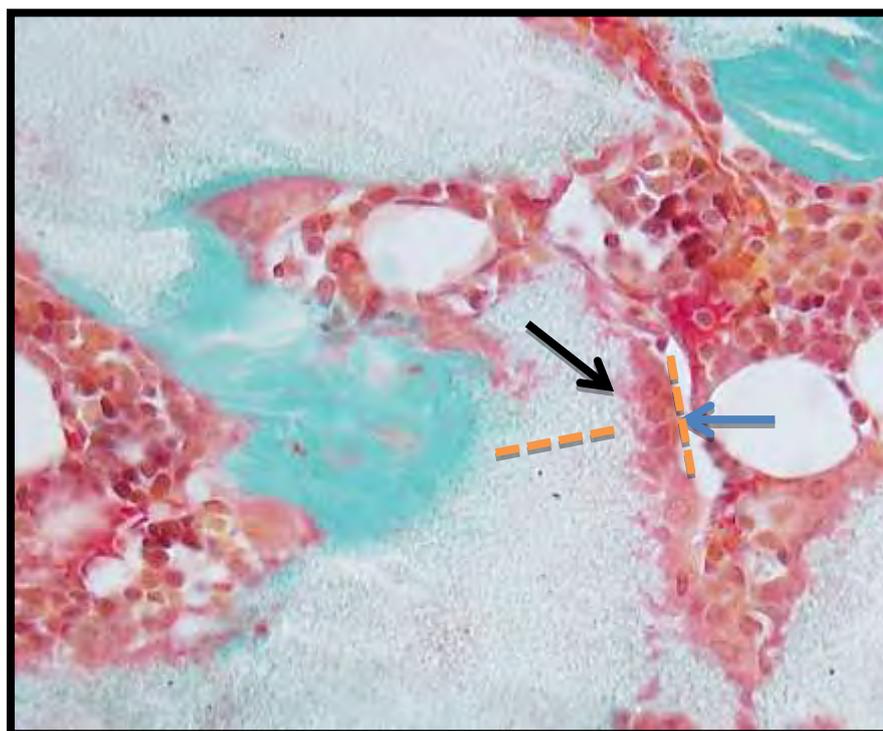
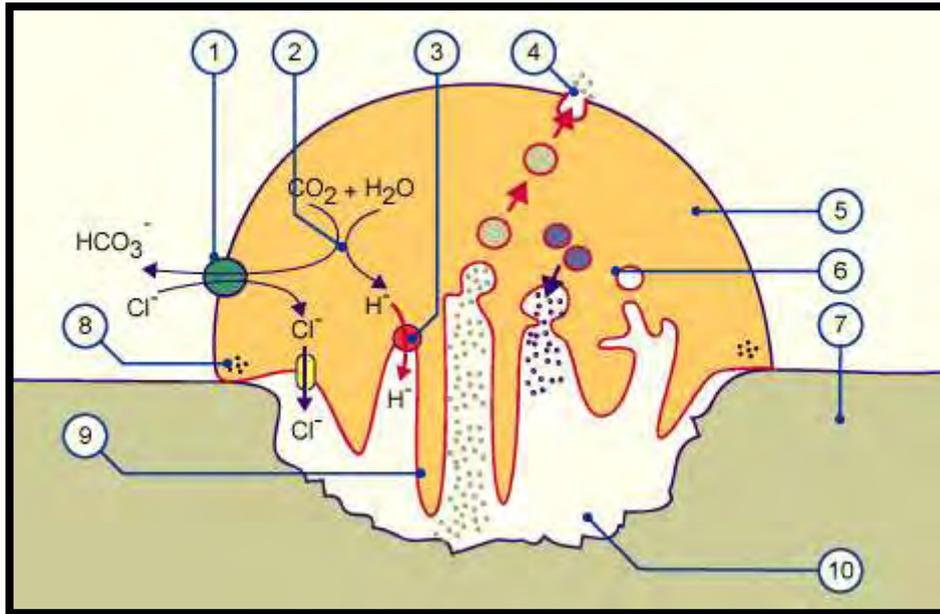


Figure 51 : Résorption ostéoclastique sur paroi fine d'un granule creux. La flèche bleue indique un ostéoclaste multinucléé. La flèche noire la lacune de Howship associée. Les traits en pointillés sont de même longueur, égale à celle d'un ostéoclaste.

L'action des ostéoclastes est en effet primordiale dans la résorption des granules de phosphates de calcium, elle est complémentaire à leur dissolution en milieux aqueux. Le principe d'action des ostéoclastes est de libérer des ions H^+ localement (entre eux et le biomatériaux) après leur adhésion à la surface du matériaux par un système de pompe à proton grâce à un mécanisme chimique de carboanhydrase (Gartner *et al.* 2000) formant alors une lacune de résorption dite lacune de Howship. Le schéma de principe de cette résorption ostéoclastique est représenté sur la figure ci-dessous.



1.	Pompe à proton de HCO ₃	6.	Vacuoles
2.	Carboanhydrase	7.	Granule de BCP
3.	Libération de H ⁺ acide	8.	Zone d'ancrage
4.	Exocytose des débris de CaP	9.	Bordure plissée
5.	Ostéoclaste	10.	Lacune de Howship acide

Figure 52 : Principe de l'ostéoclasie (image du site web www.unifr.ch)

L'absorption des fluides biologiques par les parois poreuses est également bien visible dans le cas des granules creux alors que les parois plus denses des granules ronds ne laisse pas entrevoir une telle absorption. La figure ci-dessous illustre ce propos en comparant une paroi d'un granule creux dont les micropores sont distinguables et dont les teintes rouges dénotent la pénétration des fluides en comparaison avec celle intact ou presque d'un granule rond-dense. Ceci constitue un atout pour l'amélioration de la signalisation cellulaire pouvant atteindre l'intérieur et l'extérieur des granules creux et permettre la différenciation des cellules souches en ostéoblastes par la présence homogène de facteurs de croissance.

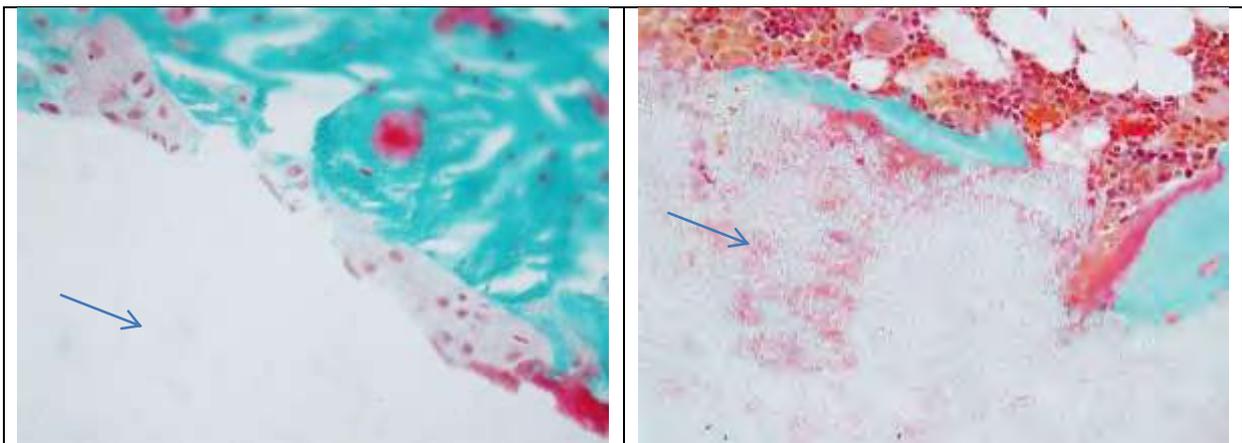


Figure 53 : Paroi dense d'un granule rond classique (blanc, gauche) et paroi poreuse fine d'un granule creux absorbant les fluides biologiques (gris, droite)

Ces résultats sont très prometteurs et confirment le fort potentiel au moins ostéoconducteur de ces nouveaux granules creux possédant les mêmes avantages biomimétiques et bioactifs des granules de la gamme MBCP®, qui ont fait leurs preuves en matière de promotion de la

repousse osseuse, auxquels viennent s'ajouter la capacité de porter une grande quantité de cellules tout en les protégeant des frottements intergranulaires responsables du détachement ou de l'arrachement de cellules sur des surfaces convexes propices à ces phénomènes.

3.2. État de l'art des formulations composites à base de PCa

Comme nous l'avons vu au travers de la présentation du projet GAMBA, les granules phosphocalciques seront intégrés au sein de gels. En effet les exigences cliniques de simplicité de manipulation associées aux besoins de résorption des biomatériaux implantés au profit de la repousse osseuse, évoquent en effet la pertinence de conjuguer les propriétés uniques des granules macroscopiques de phosphate de calcium à la fois ostéoconducteurs et ostéoinducteurs avec des matrices polymères tridimensionnelles mécaniquement cohérentes permettant un espacement des granules en gardant un ensemble cohésif et malléable. L'option d'aisance d'utilisation par les chirurgiens implique en effet l'emploi de polymères sous forme de gels ou de membranes non friables pouvant être modelées ou taillées extemporanément. Ce paragraphe présente brièvement les trois grandes familles de matrices composites injectables que sont les ciments, les pâtes, et les mastics. Nous en évaluerons leurs avantages et inconvénients respectifs au regard du cahier des charges du projet GAMBA.

3.2.1. Les ciments phosphocalciques

Ce sont des ciments hydrauliques dont la synthèse repose sur une réaction de prise entre deux phosphates de calcium complémentaires, un acide et l'autre basique. Les phosphates de calcium rentrant dans la composition de ces ciments sont variables et peuvent comprendre entre autres l'hydroxyapatite (HA), l'apatite déficiente en calcium (CDA), l'apatite carbonatée, le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) et le phosphate de calcium amorphe (ACP). Leurs propriétés mécaniques fortes dues à une densité élevée constituent à la fois une force et une faiblesse. Leur manque de microporosité et de macroporosité interconnecté rend ces ciments pertinents dans le cas d'applications cliniques nécessitant des résistances importantes aux sollicitations mécaniques. C'est pourquoi les substituts osseux injectables, dont font partie les ciments phosphocalciques, sont les plus étendus en chirurgie du rachis pour leur capacité de comblement dense grâce à des propriétés de mise en forme et d'auto-durcissement (Bohner 2000). Cependant dans le cas d'applications de régénération osseuse impliquant une forte invasion cellulaire et une pénétration en profondeur des fluides biologiques, permettant un apport nutritionnel aux cellules et favorisant une signalisation intercellulaire avec interventions du rôle des facteurs de croissance comme c'est le cas dans le projet GAMBA, l'utilisation de ciments ne peut être pertinente à cause de cette densité structurelle (Frayssinet *et al.* 1998).

Afin d'illustrer ces propos, une étude comparative concernant l'analyse de la distribution de pores de ciment de la gamme MCPC® (Biomatlante SA, France) et leur évolution sur 6 mois, a été réalisée avec un autre ciment phosphocalcique du marché (Norian SRS®, DepuySynthes, Suisse).

Matériels et Méthodes

Les ciments sont moulés sous forme d'éprouvettes parallélépipédiques puis immergés dans une solution tamponnée phosphate (DPBS) à 37°C afin d'être en condition proche de celle rencontrée *in vivo*. Les ciments ont ensuite été analysés par porosimétrie mercure (Autopore IV, Micromeritics) après un délai de 1 mois, 3 mois et 6 mois.

Résultats

Les résultats donnent la distribution des pores selon leurs diamètres. Les résultats sont regroupés dans la figure ci-dessous.

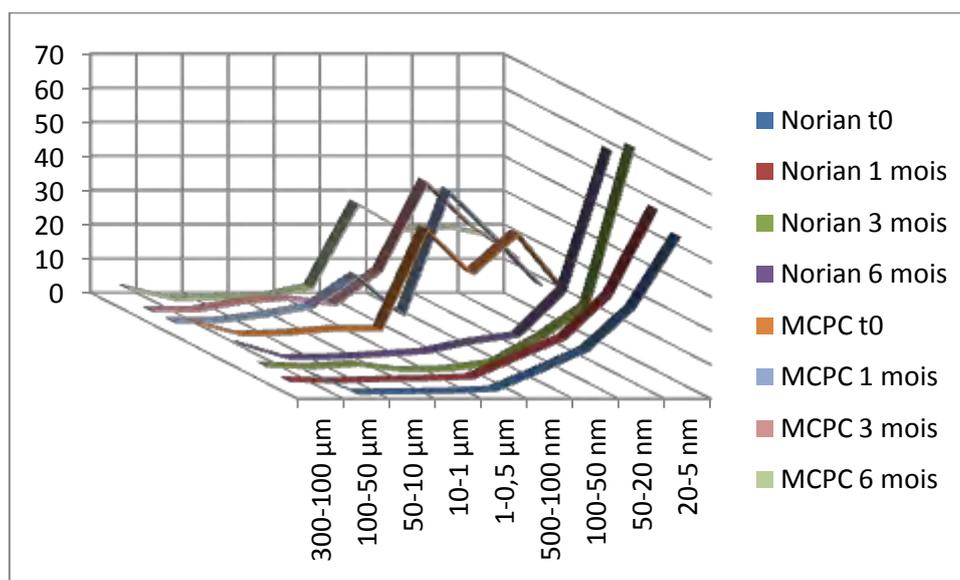


Figure 54 : Distribution de porosité relative des ciments MCPC et Norian SRS dans le temps

Discussion et Conclusion

Les 2 ciments phosphocalciques ne présentent en effet qu'une quantité négligeable de macropores en surfaces (moins de 2%). La porosité n'est dans les deux cas que submicronique, et ne se trouve en quantité importante qu'à partir de 500nm pour les deux ciments. Avec des nuances cependant, en effet le MCPC possède initialement (t0) environ 50% de nanopores compris entre 500nm et 50nm contre environ 20% pour le Norian (t0). La porosité des ciments Norian possédant quant à eux des nanopores compris entre 50nm et 5nm à hauteur de 70% à t0 pour augmenter jusqu'à 80% à partir de 3 mois, contre 40% pour le MCPC. On remarquera ainsi une plus grande stabilité dans le temps des ciments MCPC dont les profils de distributions ne varient que très faiblement. En revanche la porosité des ciments Norian se resserre sensiblement après 3 mois, comme la figure ci-dessus le démontre. Globalement la microporosité des MCPC est constituée de pores plus grands que ceux du ciment Norian et se resserrent moins au cours du temps, ce qui est l'avantage du MCPC par exemple pour des applications de diffusion de molécules de principes actifs (médicaments, facteurs de croissance...) pouvant être ainsi graduellement relargués *in vivo* (Ginebra *et al.* 2006).

Ces deux exemples représentatifs des ciments phosphocalciques montrent que leurs intérêts résident dans les applications nécessitant une stabilité mécanique sur de longues durées avec une porosité exclusivement nanométrique. En revanche ce manque de macroporosité et de micropores au-dessus de 500nm constitue un critère de rejet au regard des enjeux du projet GAMBA impliquant une colonisation cellulaire profonde et une absorption des protéines d'intérêt dans le volume pour une repousse osseuse simultanée à la résorption de l'implant.

3.2.2. Les hydrogels, pâtes et mastics phosphocalciques

Le développement de nouveaux biomatériaux composites se base aujourd'hui sur le panel étendu des polymères accessibles. Que ce soient les polymères issus de l'industrie pétrochimique, comme le polycaprolactone (PCL) et les dérivés du polyéthylène, ou les biopolymères d'origine naturelle végétale comme les polysaccharides* (cellulose...), animales comme le collagène ou la fibrine* ou bactérienne (dextrane*, PLA...).

Le tableau ci-dessous répertorie les polymères d'usages biomatériaux les plus répandus.

Polymères de l'industrie pétrochimique	Biopolymères
PE	PLA
PET	PGA
PEG	Cellulose
PTFE	Dextrane
PV	Chitosane
PMMA	Collagène
PS	Fibrine
PCL	PU
Polyisoprènes	PA

Tableau 17 : Liste des principaux polymères utilisés en ingénierie tissulaire

Les hydrogels

Un intérêt particulier est accordé aux polymères hydrosolubles, permettant d'obtenir après réticulation des hydrogels présentant des propriétés rhéologiques très variées entre solide et liquide dont les principaux paramètres sont la viscosité, l'hydrophilie, la plasticité ou encore pour certains la thixotropie*, comme c'est le cas par exemple pour l'hydrogel hyaluronique thermosensible, cité au début de ce chapitre comme candidat retenu du projet GAMBA (Drury et Mooney 2003).

Les biomatériaux composites utilisent les propriétés de ces hydrogels de malléabilité, de cohésion spatiale permettant par exemple un espacement de granules phosphocalciques dispersés en leur sein et bien sûr leur biocompatibilité en site osseux (Rezwan *et al.* 2006).

Au contraire des ciments, les hydrogels ne présentent pas de durcissement et restent visqueux *in situ*, leur application n'est donc pas adéquate lorsqu'il s'agit de maintenir ou remplacer une tenue mécanique forte, comme par exemple dans le cas de défauts osseux de taille critique des os longs (Metters *et al.* 1999).

Parmi les hydrogels les plus utilisés, et reconnus pour leur efficacité en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage, se trouvent les hydrogels de cellulose tel l'hydroxy-propyl-méthyl-

cellulose (HPMC) (Weiss *et al.* 1999), les hydrogels hyaluroniques (Mortisen *et al.* 2010) ou encore les hydrogels de poloxamères qui sont des copolymères à blocs de polyéthylène glycol (PEG) et de polyéthylène (PE) (Jeong *et al.* 2002).

La réticulation tridimensionnelle des hydrogels, leurs propriétés de gonflement et leur forte teneur en eau font d'eux des matrices innovantes et biomimétiques particulièrement envers le cartilage nécessitant des matériaux non friables, dont la forme ductile s'adapte en fonction des contraintes propres aux articulations, et au pouvoir lubrifiant (Freeman *et al.* 2000).

La possibilité d'encapsulation des cellules dans les mailles polymériques des hydrogels, le maintien de leur viabilité et de leur prolifération *in situ*, ainsi que la faisabilité d'intégrer des facteurs de croissance se libérant par diffusion lors du gonflement hydraulique a été démontrée notamment dans le cas des hydrogels d'HPMC (Vinatier, 2009).

On voit donc ici que les propriétés uniques des hydrogels répondent parfaitement aux enjeux du projet GAMBA, néanmoins pour le niveau désignant la régénération osseuse, les hydrogels seuls ne possèdent pas de propriétés ostéoinductrices (Weinand *et al.* 2006), c'est pourquoi sont mises au point des matrices composites hydrogels/céramiques aux caractéristiques synergiques.

Les pâtes et mastics phosphocalciques

Les biomatériaux phosphocalciques composites injectables, se servant de ces propriétés spécifiques des polymères, sont appelés pâtes (« paste » en anglais) ou mastics (« putty » en anglais). La différence entre pâtes et mastics est subtile et parfois confuse puisqu'elle désigne deux comportements visqueux. Il n'existe pour le moment pas de consensus autour de définitions précises de ces appellations dans le registre de l'ingénierie des biomatériaux.

Les pâtes sont ainsi plus proches des ciments que des hydrogels, ayant une plus forte teneur en céramiques leur procurant des propriétés d'étalement et un aspect plus granuleux. Leur teneur en eau est plus faible que pour les mastics. Ce type de comportement les rend pratique lors d'applications comme le comblement de défauts peu profonds des os pariétaux* comme en chirurgie de réparation crânienne. Leur injectabilité est correcte mais peut-être gênée par des phénomènes de filtration des granules ou particules phosphocalciques lors de la pression sur la seringue d'injection (Bohner 2000).

Les mastics en revanche possèdent des propriétés plus proches de celles des hydrogels que des ciments, avec une proportion de polymères et d'eau plus élevée que dans les pâtes et une composition en céramique moins importante, leur conférant des propriétés de malléabilité et de viscosité très supérieures. Leur injectabilité est facilitée par la forte teneur en fluide aqueux des hydrogels les composant les rendant particulièrement appréciés par les chirurgiens.

Domaines de prédilection	Avantages	Inconvénients	Application possible au
--------------------------	-----------	---------------	-------------------------

				projet GAMBA
Hydrogels	Réparation du Cartilage	Malléabilité Thixotropie Gonflement	Pas de potentiel ostéoinducteur	oui
	Encapsulation de cellules, de facteurs de croissance, de médicaments	Injectabilité Biorésorbabilité	Porosité faible	
Ciments phosphocalciques	Vertébroplastie	Propriétés mécaniques fortes Autodurcissement	Nanoporosité uniquement Non résorbable	non
Pâtes phosphocalciques	Défauts osseux des os pariétaux	Étalement Injectabilité Ostéoconduction Potentiel d'Ostéoinduction Biodégradable Espacement intergranulaire	Problèmes possibles de « pression-filtration » lors de l'injectabilité nécessitant une optimisation de la formulation galénique de la partie céramique	non
		Microporosité des céramiques	Porosité faible de l'hydrogel	
Mastics phosphocalciques	Défauts osseux des os long	Gonflement Malléabilité Injectabilité Biorésorbabilité Micro-macroporosité des céramiques	Porosité faible de l'hydrogel	oui

Tableau 18 : Synthèse des caractéristiques des hydrogels, des ciments, mastics et pâtes dans le cadre du cahier des charges du projet GAMBA

D'après ces critères de sélection répertoriés dans le tableau ci-dessus, il en sort un intérêt particulier des mastics phosphocalciques comme candidats potentiels à l'intégration au projet GAMBA pour le niveau de bioactivité de l'os sous-chondral. Dans ce contexte, nous présenterons au paragraphe suivant le mastic In'Oss développé par les ingénieurs R&D de Biomatlante au travers d'une étude comparative avec un autre mastic disponible sur le marché.

3.2.3. Étude *in vivo* comparative entre 2 mastics phosphocalciques

Une étude *in vivo* comparative sur la qualité de la repousse osseuse a été menée entre le mastic développé par l'entreprise Biomatlante dénommé In'Oss® et un autre mastic du marché, Actifuse ABX® (Baxter/Apatech). Le modèle choisi fut celui du défaut de taille critique réalisé en épiphyse fémorale chez le lapin. L'analyse histologique a été faite sur les explants à 3 semaines, 6 semaines et 9 semaines. La résorption des matériaux a également été

quantifiée par microtomographie X. Cette étude est annexée ci-après et sera complétée et discutée au paragraphe suivant.

La figure suivante reflète le plan de l'étude.

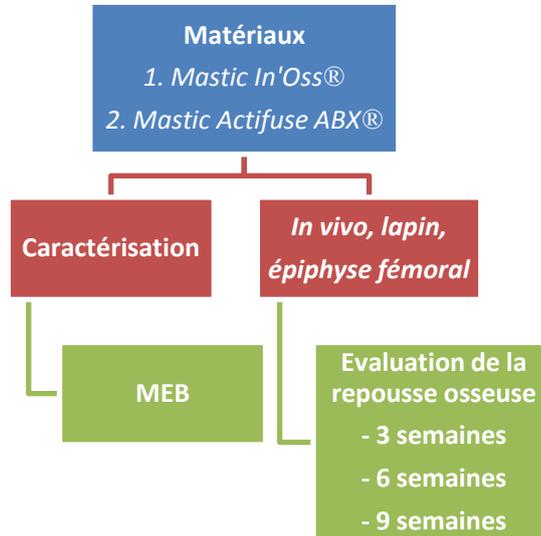


Figure 55 : Plan général de l'étude comparative in vivo de 2 mastics phosphocalciques

“In vivo Comparative study of two injectable/moldable Calcium phosphate Bioceramics”

Key Engineering Materials 529-530: 291-295, 2013

***In vivo* Comparative study of two injectable/moldable Calcium phosphate Bioceramics**

T. Miramond^{1,2a}, E. Aguado^{3b}, E. Goyenvalle^{3c}, P. Borget^{2d}, S. Baroth^{2e}, and G. Daculsi^{1f}

¹INSERM Nantes University, Dental Faculty, place A. Ricordeau 44042 Nantes France;

²Biomatlante SA, 5 rue Edouard Belin, 44360 Vigneux de Bretagne France

³LUNAM Université, Oniris National Veterinary School of Nantes LBBTOCex, Route de Gachet, Nantes France,

^a thomas.miramond@etu.univ-nantes.fr, ^b aguado@oniris-nantes.fr, ^c goyenvalle@oniris-nantes.fr, ^d pascalborget@biomatlante.com, ^e sergebaroth@biomatlante.com, ^f guy.daculsi@univ-nantes.fr

Keywords: Injectable bone substitute, MBCP, HA-Si, putty, bioceramic, *in vivo* study

Abstract. Calcium phosphate bioceramic granules associated with hydrosoluble polymers formed putties currently more used in clinical applications as they are easy to handle (injectability, moldability). In this study, 2 kinds of materials were tested in rabbit bone defects. The first one is In'Oss™ (Biomatlante), a microporous biphasic CaP granules (BCP, HA/TCP mixture) with polysaccharidic hydrogel; and the second one is Actifuse ABX™ (Baxter/Apatech), pure hydroxyapatite granules containing silicate (HA-Si) with blocks copolymer hydrogel (poloxamer), .

The aim of this study was to compare osteogenic properties of two kinds of CaP putties containing HA-Si versus BCP and the kinetic of resorption of their hydrogel. Data have demonstrated that both hydrogels increase the handling properties. Bone regeneration was observed in the two types of sample, however at 3 weeks, Actifuse ABX hydrogel was not totally absorbed, while In'Oss hydrogel was no longer observed. The second difference observed was osteoconduction. Newly formed bone over the time period studied was moreover in close contact with BCP granules than with HA-Si granules. Larger granules resorption on time was observed for BCP compared to HA-Si. Resorption of Actifuse ABX remains limited and explains the faster kinetic of absorption for In'Oss. This study demonstrates biocompatibility, absorbability and bone ingrowth at the expense of the two types of putty injectable/moldable bioceramic used for bone regeneration.

Introduction

Calcium phosphate bioceramic granules associated with hydrosoluble polymers are currently more used. Different combination were proposed with polymers as gelatine, collagen, fibrin, DBM, hyaluronic acid or synthetic polymer like poloxamer, cellulose derivative etc.

To date, several injectable biomaterials have been developed. Some of these injectable bone substitutes are made of CaP hydraulic cements that harden in the bone defect [1, 2]. Others are composed of CaP granules suspended in hydrogel as they are the most interesting carriers actually used for the development of injectable bone substitute. The first material tested in this study is an injectable resorbable bone substitute consisting of microporous BCP granules in suspension associated with a hydrosoluble polymer of derivative cellulose [3, 4]. The second one is based on a suspension of hydroxyapatite containing silicate granules and a hydrogel poloxamer [5]. The purpose of this study was to compare the biocompatibility and the kinetic of absorption in critical size defect in rabbit long bones.

Materials and Methods

Both putty materials were implanted in rabbit bone defect femoral epiphyses according ISO10993.

The first putty (P1) is In'Oss™ (Biomatlante), a microporous biphasic CaP granules (BCP, HA/TCP intimate nanoscale melting of hydroxyapatite and beta tri calcium phosphate) with a polysaccharidic hydrogel carrier. The second putty (P2) is Actifuse ABX™ (Baxter/Apatech),

pure hydroxyapatite granules containing silicate (HA-Si) with blocks copolymer hydrogel (poloxamer).

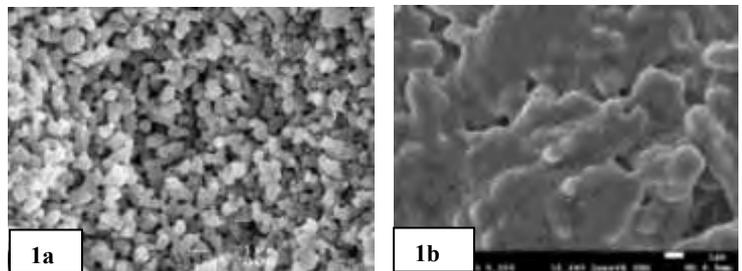
	In'Oss (Putty 1)	Actifuse ABX (Putty 2)
Granules size	0.08-1 mm	1-2 mm
Macropores	yes	yes
Micropores	Yes > 70%	No
Chemical nature	HA 60%, β -TCP 40% molecular mixture	HA with Si content
Polymer	Polysaccharidic hydrogel hydrosoluble	copolymer hydrogel (poloxamer)
Granules/hydrogel weight ratio	1/1	1/1
Polymer % in hydrogel (weight)	4%	25 to 30%

Nine New Zealand rabbits were implanted in femoral epiphysis (critical size defects of 6 mm in diameter and 8 mm length). The animals were maintained during 3, 6, and 9 weeks. The epiphyses were processed for microtomography μ CT (Microscanner SkyScan 1072). 3-D qualitative imaging and quantitative image analyses of the bone ingrowth was performed.. After μ CT acquisition, the implants were embedded in PMMA resin, sectioned and polished, coated with gold palladium and examined in scanning electron microscopy (SEM) using backscattered electron (BSE) (LEO 1450VP). 2-D image analyses were performed using specific software Quantimet Leica Q500. Sections prepared with a diamond saw microtome were observed with light microscopy using polarized light. Thin sections of 7 μ m were stained with Movat's pentachrome and observed in light microscopy.

Results

Before implantation the BCP granules of P1 showed grain size < 1 μ m and high micropore content (fig 1a). The HA-Si granules of P2 showed less micropores and higher density with numerous grain boundaries (fig 1b).

Figure 1: SEM In'Oss (1a) and Actifuse ABX (1b) CaP granule microporosity



At 3 weeks, bone regeneration was observed in both materials. In putty 1, the hydrogel was no longer observed but only bone trabeculae MBCP granules and bone marrow (fig 2a). On the contrary (fig.2b), in Putty 2 hydrogel was not totally absorbed.

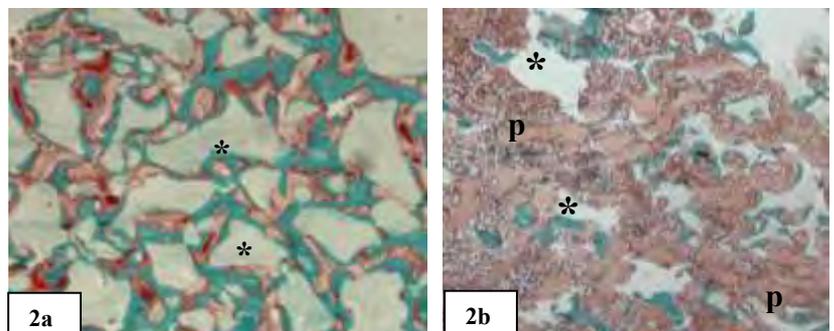


Figure 2: a, In'Oss, bone trabeculae (green) appeared in direct contact with the MBCP granules (*) and in all intergranular spaces. b, Actifuse ABX polymer is still present (p) between bone trabeculae (green) and cellular bone marrow, HA Si granules (*)

SEM observation (only mineralized tissue can be visualized) indicated large differences on osteoconduction of the bioceramic content. Newly formed bone was largely in close contact with BCP granules while numerous HA-Si granules remain without direct bone apposition (fig. 3a, 3b)

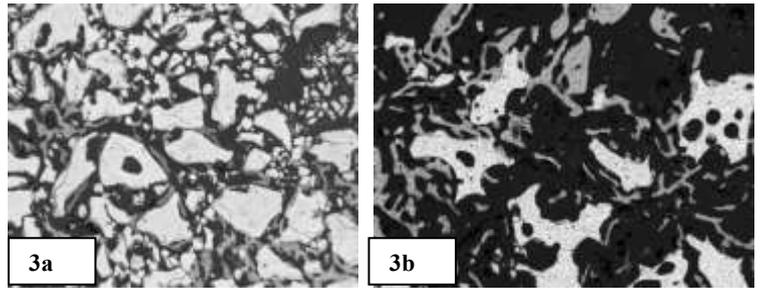


Figure 3: a, P1 BCP granules were closely associated to bone. b, less direct contact was observed for P2 HA Si.

After 6 weeks, the P2 polymer was no longer observed; the intergranular spaces were occupied by bone trabeculae (fig. 4b). For P1, bone regeneration appeared both into the intergranular spaces and in close contact to the BCP granules surface (fig. 4a).

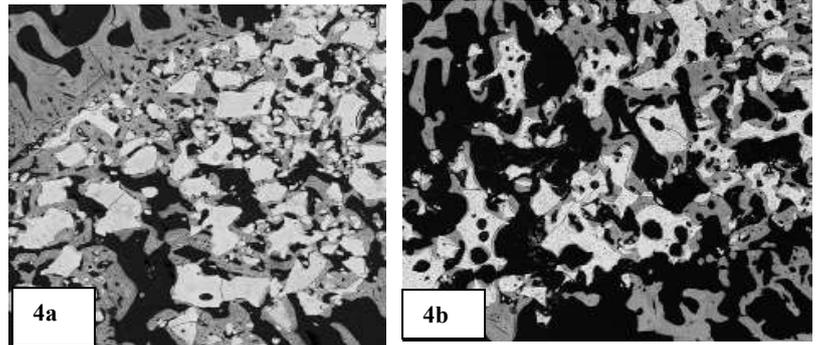


Figure 4: a, P1 . b, P2

In polarized light microscopy, we evidenced lamellar bone architecture essentially (no woven bone) in both samples. Higher bone inter granular trabeculae was observed in P1 with macroporous BCP granules (fig. 5a). For P2 with HA-Si granules, not all the macropores were invaded by newly formed bone (fig. 5b).

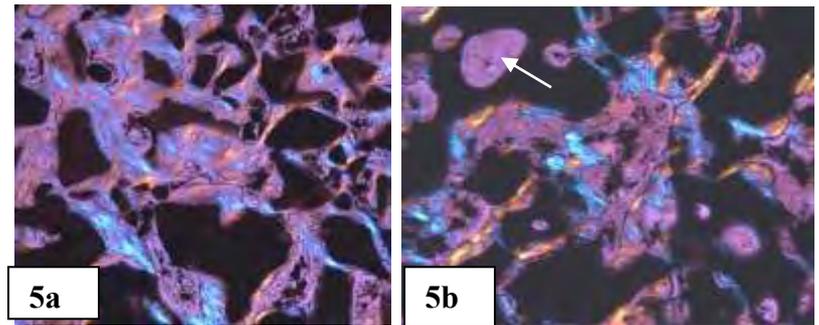


Figure 5: Polarized microscopy, bone ingrowth (blue or yellow) . a, P1 . b, P2 macropores (arrow)

At twelve weeks, bone remodelling was observed in both samples. MicroCT evidenced the bone ingrowth at the expense of the putties, with a regeneration of the spongy bone or the cortical bone at the surface. (fig. 6a and 6b). The radio density of the HA-Si of Actifuse ABX appeared higher compared to MBCP granules.

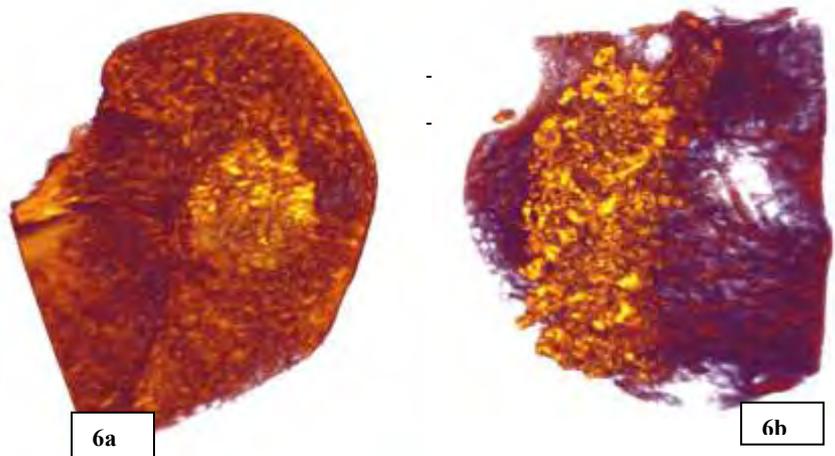


Figure 6: a, P1, b, P2

After 9 weeks, the absorption of the BCP granules for P1 was 76% and 40% for HA-Si of P2. The bone ingrowth was 46% at the expense of IP1 and 29% for P2. The kinetics from 0 to 9 weeks are reported on figure 7. The evolution of absorption (resorption of the bioceramic content and polymer) are faster for In'Oss compared to Actifuse ABX.

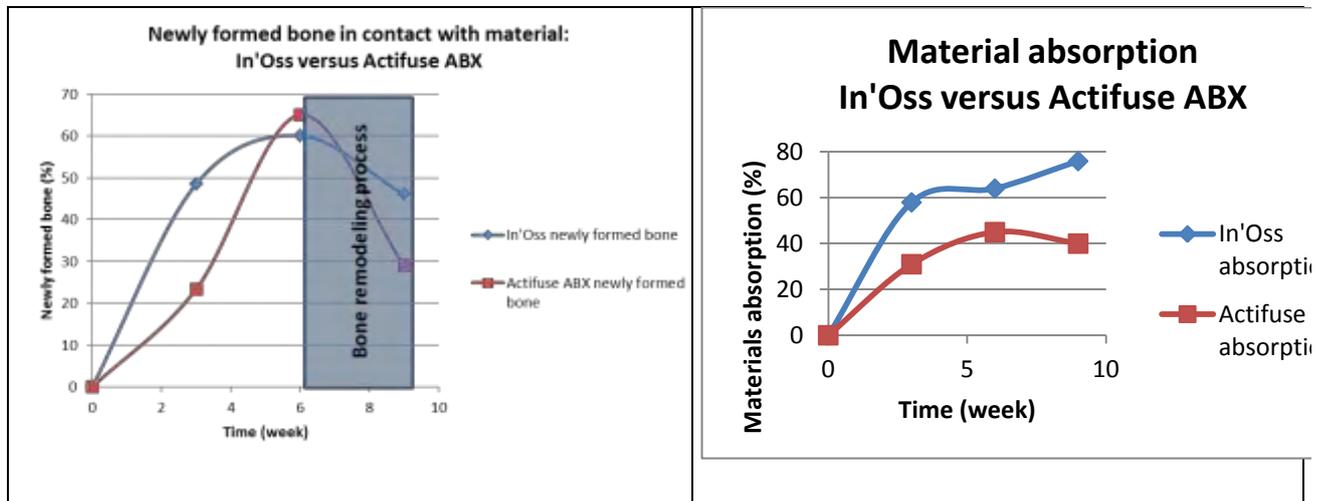


Figure 7: Newly formed bone and absorption of In'Oss and Actifuse ABX

Discussion

Both biomaterials In'Oss and Actifuse ABX are produced in a sterile ready-to-use cartridge form, as the products are not prepared during surgery, the risk of infection is minimal. The addition of polymers to bioceramics granules improved the handling properties. The initial plasticity makes it possible to fill complex shaped bone defects very easily. The materials does not have mechanical strength like the hydraulic calcium phosphate cements but it leads to have rapid and abundant bone growth due to theirs intrinsic porosity. In this concept of Injectable Bone Substitute, bone cells are able to invade the spaces created by the disappearance of the polymer carrier. Bone ingrowth can take the place all around the granules, and at the expense of their resorption. However the kinetic depends on the dissolution of the polymer carrier and the resorption of the bioceramic granules [6, 7]. This study revealed differences on the absorbability and kinetic of bone ingrowth at the expense of the both putties tested.

HA bioceramics are well known for their low kinetic of resorption and very limited ability to be absorbed and re-used by the osteoblast for promoting bone mineralization [7]. Silicate ions were suspected from the Bioglass concept of Larry Hench to be involved in mineralization and osteoblastic activation, however any relevant study have proven this hypothesis. Si content in HA decrease the crystal size, and was considered to have a better kinetic of resorption than pure HA. However there is contradictory literature on this matter [8, 9].

On the contrary, β -TCP is largely recognized for his resorption and adsorption properties compared to HA [7]. BCP, mixture of HA and TCP at the molecular level have high properties of adsorption as it was demonstrated in preclinical studies and human application [10, 11], also osteoinductive property have been reported [12]. Combined with HPMC, the properties of resorption and promotion of bone ingrowth were enhanced [13, 14]

The concentration of the polymer represent an important property to prevent washed out after implantation in bleeding site for injectable bone substitute, to maintain the bioceramic granules on site in unclosed cavities, however the reticulation, too high concentration or gelling delayed the biological fluid diffusion and cell colonization [6]. Similar results have been described with fibrin glue combined to BCP granules [15], hydrogel cross linked by silane [6].

Bone regeneration was observed in the two types of putties, however at 3 weeks, Actifuse ABX hydrogel was not totally absorbed, while In'Oss hydrogel was no longer observed. The second difference observed was osteoconduction. Newly formed bone over the time period studied was largely in close contact with BCP granules than with HA-Si granules. Larger granules resorption on time was observed for BCP compared to HA-Si. Resorption of HA-Si remains limited and explain the faster kinetic of absorption for HA/TCP granules of In'Oss concept. The difference with Actifuse ABX will be due to the high temperature of sintering of HA Si reducing the microporosity as evidenced in SEM (figure 1b), in addition the high amount of hydrogel (granules/polymer ratio) of P2, reducing the kinetic of absorption, then cells, tissue and vascularization colonization comparing to the P1 polysaccharidic polymer content. The kinetic of bone ingrowth was higher and faster for IN'OSS compared to Actifuse ABX. Explanation was the lower kinetic of resorption of the polymer (high concentration of polymer into the hydrogel) and less resorbability of HA bioceramics compared to BCP concept containing high amount of TCP. The comparative study demonstrates good biocompatibility and bone ingrowth at the expense of the two types of materials.

Conclusion

This study demonstrates biocompatibility, absorbability and bone ingrowth at the expense of the two types of putty injectable/moldable bioceramic used for bone regeneration. Some differences were observed such as osteoconduction property. Newly formed bone over the time period studied was largely in close contact with BCP granules than with HA-Si granules. Kinetics of cell colonization and bone tissue ingrowth was faster with In'Oss due to faster absorption of the polymer carrier and the greater resorption/absorption of the BCP (HA/TCP) granules.

References

1. Stankewich C.J., Swionthowski M.F., Tencer A.F., (1996) *J. Ortho Res* 4:786-793.
2. Ishikawa K, (2008) *In Bioceramics and their clinical applications*, ed Kokubo T., Woodhead publishing in materials, Boca Raton USA, p438-463.
3. Daculsi G *et al* (1999) *Bone* 25:59-61.
4. CNRS patent, WO 95/21634 "GR3034590 (T3)", "2001-01-31.
5. Hing K. *et al.* *Biomaterials* 2006; 27: 5014-5026.
6. Daculsi G *et al.* (2010). *J Mater Sci Mater Med.* Mar;21(3):855-61.
7. Dorozhkin S. (2010) *J. Funct. Biomater.* 1, 22-107.
8. Samizadeh S *et al.*, (2012) 9th world Biomaterials Congress, proceeding, Chengdu China.
9. Bohner M. (2009) *Biomaterials* 30(32):6403-6.
10. Legeros R. *et al* (2009) *Bioactive Bioceramics, Orthopaedic Biology and Medicine: Musculoskeletal Regeneration, Biological materials and methods.* Ed W.S. Pietrazak Humana press, Totowa NJ USA, 153-181.
11. Daculsi G., LeGeros R., *Bioceramics and theirs clinical applications*, T. Kokubo editor, Woodhead publishing, 2008, pp 395-424.
12. Le Nihouannen D, *et al.* *Bone.* 2005 Jun;36(6):1086-93.
13. Gauthier O. *et al.* (1999) *J Of Mater Sc : Mat In Med*,1999,10:199-204.
14. Gauthier O. *et al.* (1999). *J Biomed Mater Res*, 1999,47(1) : 28-35.
15. Le Guehenec L. *et al.* (2004). *Eur Cell Mater.* 2004 Sep 13;8:1-11.

Acknowledgments:

This study was supported by 7th PCRD Health, Grant agreement no: 241879 (Layrolle P. coordinator)

3.2.4. Compléments et discussion sur l'étude comparative

Dans cet article est ressortie tout d'abord la praticité d'injectabilité des 2 mastics. Aucune préparation n'est nécessaire avant leur injection et aucune complication particulière d'utilisation n'a été rapportée pendant l'implantation. La malléabilité des produits a permis de remplir et d'épouser parfaitement la forme cylindrique des défauts osseux provoqués. Les photos de la figure ci-dessous montre les 2 procédés d'injection, In'Oss par seringue et Actifuse par pistolet-seringue.

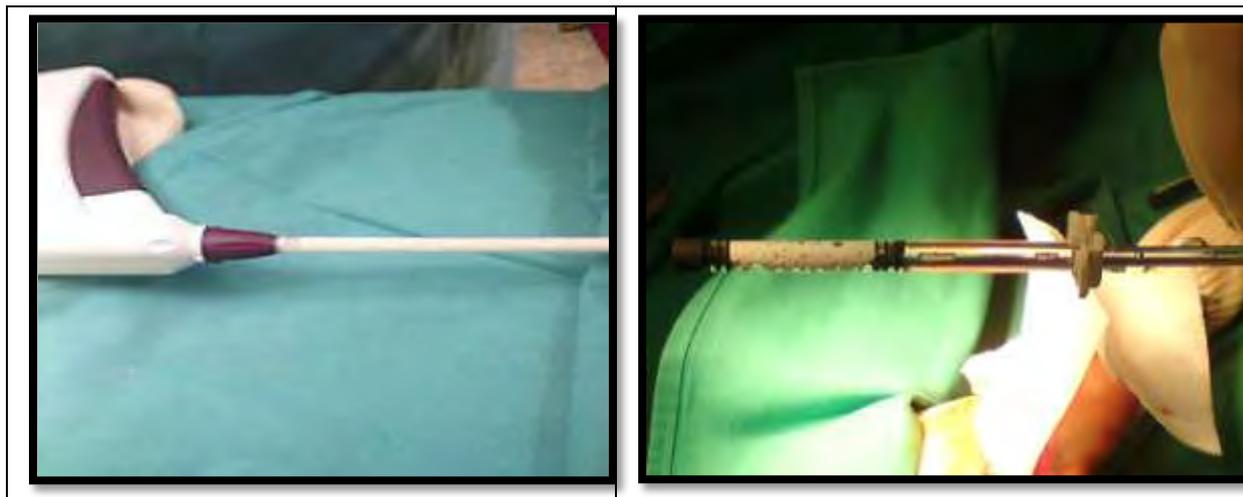


Figure 56 : Macrographie du pistolet d'injection Actifuse® (gauche) et de la seringue In'Oss® (droite)

En complément des résultats présentés dans l'article annexé au paragraphe précédent, nous présentons ici les résultats d'histomorphométrie quantitative réalisés à partir d'image MEB traité par analyse d'image (Quantimet 500, Leica) des blocs en résine contenant les explants.

Résultats et discussion complémentaires d'analyse d'images histomorphométriques 2D

L'analyse d'image a permis de quantifier deux paramètres, l'un dénotant la qualité de la repousse osseuse par le calcul du ratio de la surface de l'os néoformé par rapport à la surface du défaut osseux, l'autre faisant ressortir la résorption des mastics par le calcul de la surface des biomatériaux par rapport à la surface de l'os néoformé. Des images MEB représentatives de chaque délai (3, 6, 9 semaines) et traitées par analyse d'images sont montrées en Figure . On s'aperçoit d'après les images MEB que la teneur en granules de céramiques est inférieure dans les mastics Actifuse. Cette faible densité engendre la présence de zones sans repousse osseuse comme l'indiquent les images MEB des explants implantés avec Actifuse. Cette hétérogénéité n'est pas rencontrée avec les explants implantés avec In'Oss, ce qui donne à ce dernier ce premier avantage qualitatif. À 3 semaines la repousse osseuse est déjà avancée mais ne forme pas de travées osseuses denses comme c'est le cas à partir de 6 semaines et en larges quantités après 9 semaines, et cela pour les 2 types de mastics. L'analyse quantitative rendant compte des ratios Os/Surface de la Figure (a) montre une progression rapide de la repousse osseuse de 15% à 3 semaines à 25% à 6 semaines, pour les 2 mastics puis une croissance moins rapide entre 6 et 9 semaines passant de 25% à 30% pour In'Oss, mais une stagnation pour Actifuse ABX autour des 25%. Ce constat constitue le second point positif pour In'Oss.

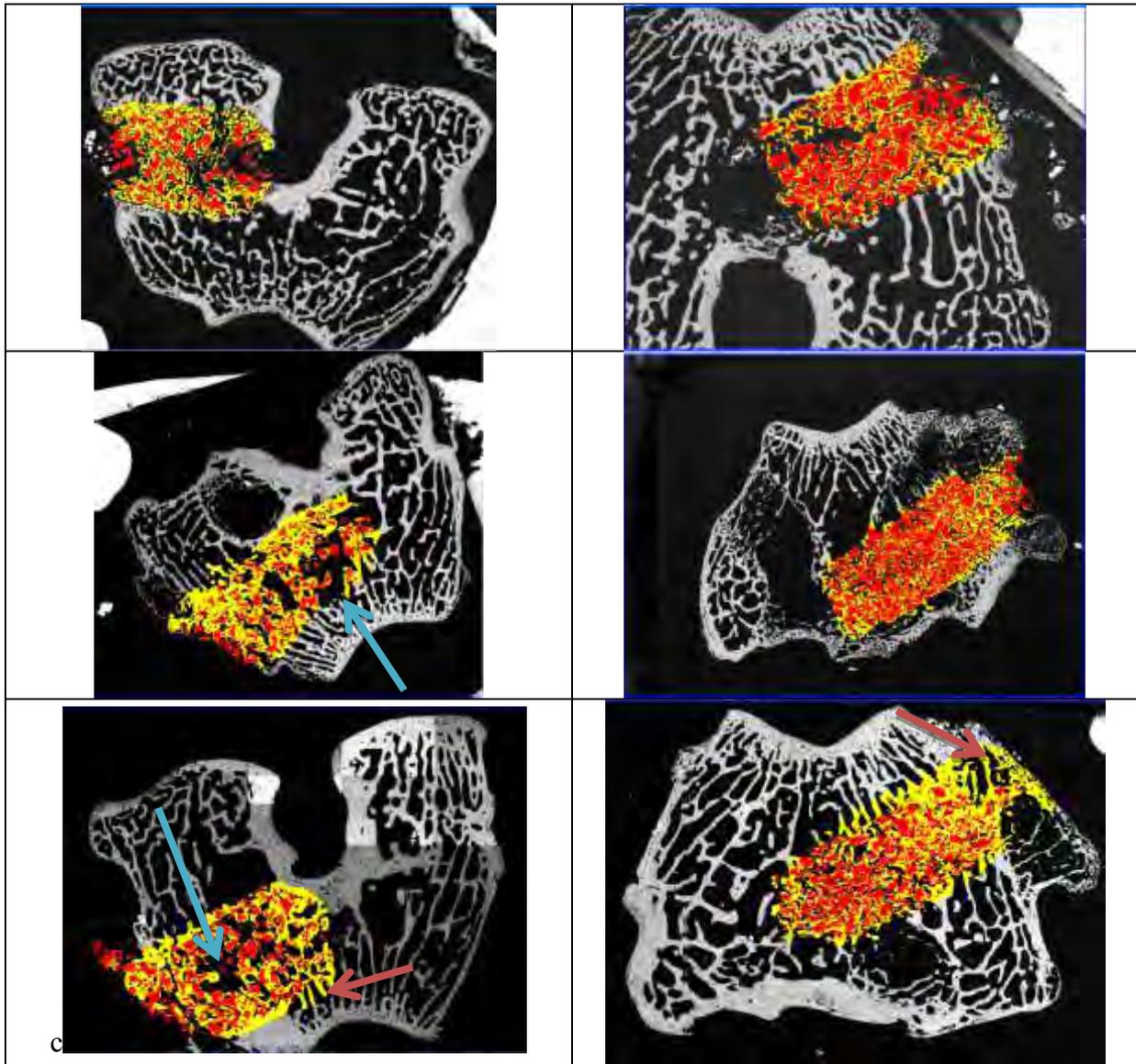


Figure 57 : Images MEB d'analyses d'images des explants de lapins (épiphyses fémorales). Colonne de gauche : Actifuse, colonne de droite : In'Oss. 21 jours (haut), 42 jours (milieu), 70 jours (bas). Flèches bleues : hétérogénéités ; flèches rouges : trabécules.

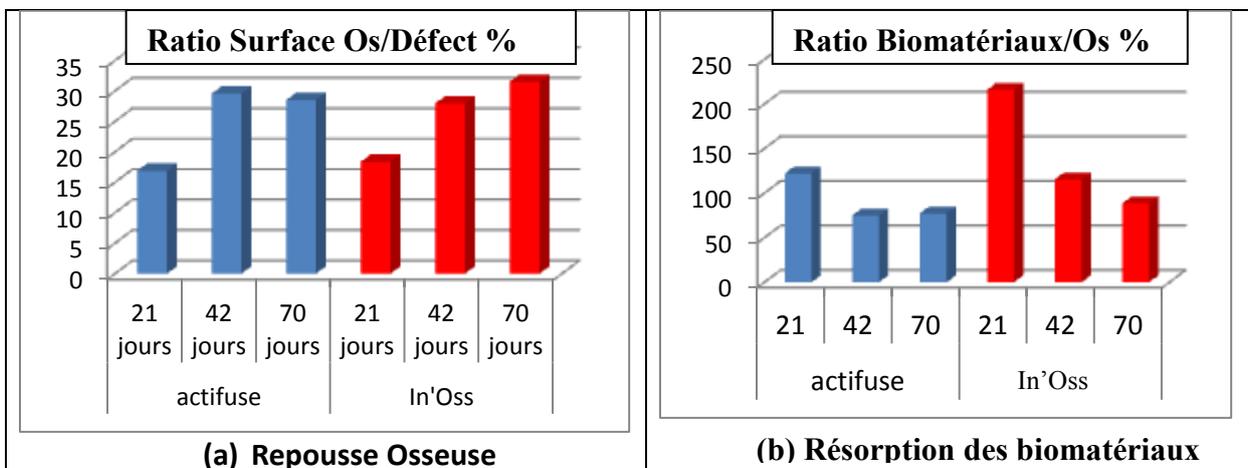


Figure 58 : Diagramme de repousse osseuse et de résorption des biomatériaux d'après les calculs réalisés par analyses d'images

Enfin le troisième critère est la résorption des céramiques dont la cinétique est plus rapide pour In'Oss comme le montre la figure 58(b), puisque malgré la densité en granule plus élevée avec In'Oss (comme nous l'avons noté ci-dessus), le ratio surface des biomatériaux par rapport à la surface de l'os néoformé diminue beaucoup plus rapidement. Il passe ainsi de 200% à 3 semaines contre 100% pour Actifuse, chute ensuite à 6 semaines à 100% pour In'Oss contre 60% pour Actifuse, pour atteindre finalement un ratio équivalent à celui obtenu avec Actifuse à 9 semaines qui est d'environ 60%, le ratio de résorption obtenu avec Actifuse stagnant entre 6 et 9 semaines. Cette résorption continue et deux fois plus rapide du mastic In'Oss constitue son 3^{ème} avantage comparé au mastic Actifuse ABX, corroborant les résultats d'analyse microtomographique 3D présentée dans l'article annexé ci-avant.

Conclusion sur l'étude comparative des 2 mastics

Les performances d'ostéoconduction des 2 mastics sont remarquables avec une repousse après 9 semaines allant jusqu'à 25% et 30 %, respectivement pour Actifuse ABX et In'Oss, du défaut osseux de taille critique provoqué dans l'épiphyse fémorale. Une analyse histomorphométrique 2D combinée à une analyse microtomographie 3D ont ainsi permis de constater 3 avantages au mastic In'Oss :

- Une meilleure homogénéité des granules de BCP au sein de l'hydrogel pour In'Oss, contre une hétérogénéité avec des zones sans repousse osseuse pour Actifuse.
- Repousse osseuse en constante augmentation pour In'Oss alors que pour Actifuse la repousse stagne entre 6 semaines et 9 semaines.
- Une résorption des granules de BCP au profit de l'os néoformé continue et deux fois plus rapide pour In'Oss que pour Actifuse, dont la résorption stagne entre 6 et 9 semaines.

Le mastic In'Oss serait donc a priori un candidat prometteur pour le projet GAMBA, à la fois pour sa malléabilité et l'espacement des granules de BCP grâce à l'hydrogel, ses performances d'ostéoconduction démontrées ici, mais également pour son potentiel en tant que porteur de cellules. En effet les granules micro-macroporeux de BCP le composant sont équivalents aux granules de la gamme MBCP®, dont nous avons vu le potentiel d'adhésion des cellules au sein de leurs macropores au chapitre 2 ainsi que leur potentiel d'ostéoinduction pouvant s'ajouter à l'effet de la transfection des cellules.

Perspectives et discussion

Le projet GAMBA est un projet ambitieux mêlant les dernières technologies de la thérapie génique et les dernières avancées de l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage pour soigner l'arthrose par différenciation guidée de cellules souches transfectées par mécanisme autocrine et paracrine. L'intégration dans les articulations d'un matériau composite hydrogel/granules de céramiques, à la fois porteur de cellules et de vecteurs de transfections favorisant la repousse de l'os sous-chondral, est un défi dont les préludes présentés dans ce manuscrit sont prometteurs. Des études physico-chimiques, *in vitro* et *in vivo* sont actuellement en cours au sein du consortium GAMBA réunissant une dizaine de partenaires académiques et industriels.

Nous avons en effet évalué le potentiel d'adhésion de vecteurs de transfections non-viraux de deux types, liposomiques et polymériques, sur les granules micro-macroporeux de phosphate de calcium biphasiques HA/ β -TCP de la gamme MBCP® développés par Biomatlante. Ce premier test indique une éventuelle faisabilité de transfection des cellules souches en une seule étape directement sur les granules avant implantation.

Nous avons également développé un nouveau type de granule creux dont la taille peut descendre jusqu'à 50 μm et aller jusqu'à 1mm environ. Ces granules ovoïdes présentent des concavités internes pouvant accueillir et protéger les cellules souches des forces de frottements entre granules (Davis 2001). Le potentiel ostéoinducteur des concavités associé aux microporosités des granules de phosphate de calcium est de plus supposé dans certaines études récentes (Ripamonti et Roden 2010). L'étude *in vivo* réalisé en site orthotopique chez le rat a démontré une repousse osseuse plus productive et plus invasive avec les granules creux qu'avec les granules ronds et denses auxquels ils s'apparentent le plus. L'os néoformé apparaissant à la fois à l'extérieur et à l'intérieur des granules creux. L'avantage également de ces nouveaux granules creux est une paroi microporeuse de faible épaisseur qui favorise la pénétration des fluides biologiques et donc la circulation homogène des cellules et des facteurs de croissance, tout en accélérant la résorption par les ostéoclastes.

Enfin les avantages et inconvénients vis-à-vis du cahier des charges du projet GAMBA des propriétés des ciments, des pâtes et des mastics phosphocalciques a permis de mettre en avant le fort potentiel des mastics tel In'Oss développés par Biomatlante. Ces derniers sont en effet pratiques pour les chirurgiens puisqu'ils ne nécessitent aucune préparation particulière, sont injectables grâce aux propriétés de viscosité des hydrogels le composant et prennent la forme des défauts osseux grâce à leur malléabilité. De plus dans ces mastics les granules de BCP sont espacés dans la matrice de l'hydrogel, offrant ainsi une répartition homogène des granules dans les défauts osseux. Les excellents résultats à la fois de repousse osseuse et de résorption des mastics observées lors de l'étude *in vivo* menée chez le lapin en site orthotopique confirment ce fort potentiel des mastics pour leur intégration dans le projet GAMBA.

Cependant les techniques très innovantes de transfection des cellules souches et d'activation de la synthèse protéiques par stimuli des gènes d'intérêt utilisés dans ce projet européen ne peuvent pas encore bénéficier de recul clinique car elles sont trop récentes. Des interrogations subsistent quant aux effets à long terme par exemple des nanoparticules magnétiques dédiées à l'activation génique par augmentation locale de température ou encore sur le taux de cellules souches, dont la différenciation a été induite par la signalisation des facteurs de croissance, pouvant se différencier et dégénérer en cellules cancéreuses (Bjerkvig *et al.* 2005).

Chapitre 4

Matrices composites fibreuseuses synthétisées par electrospinning

*Développement de matrices céramiques et composites pour
l'ingénierie tissulaire osseuse*

Chapitre 4, les grandes lignes :

La création de ce projet de thèse a en outre été l'occasion de mettre en place au sein du LIOAD une unité de synthèse de membranes fibreuses polymériques par la méthode de l'électrospinning pour la création de biomatériaux composites novateurs comprenant l'incorporation des nouveaux granules creux au sein des mailles des microfibrilles d'acide polylactique.

4.1. Le rôle des membranes fibreuses

Alors que nous avons vu au premier chapitre le rapprochement de composition entre les BCP et la partie minérale de l'os, il en va tout autrement lorsque l'on compare certaines propriétés mécaniques. Car même si l'observation d'un plan d'Ashby croisant les propriétés d'élasticité et de densité (Figure 59) laisse entrevoir une similarité entre l'hydroxyapatite et l'os compacte en valeurs absolues, ce n'est pas le cas avec l'os spongieux (Akao *et al.* 1981). Quant à l'observation d'un plan de Ashby concernant les caractéristiques en résistance à la rupture croisé avec l'élasticité, on s'aperçoit en revanche que l'os est bien plus proche des propriétés du collagène qui le compose que de l'hydroxyapatite. C'est en effet le maillage directionnel des fibres de collagène qui procure à l'os sa résistance à la fracture sous contrainte coaxiale (Shin *et al.* 2003).

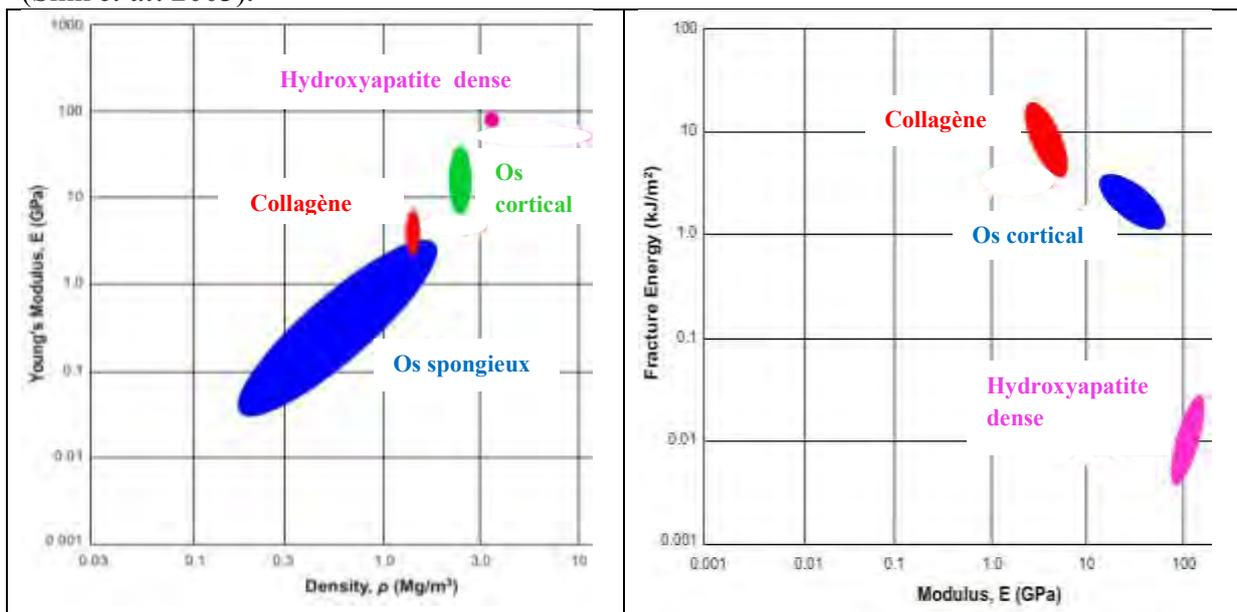


Figure 59 : Plans d'Ashby de propriétés croisées Module d'Elasticité-Densité (gauche) et Résistance à la fracture-Module d'Elasticité (droite), adaptés de www.doitpoms.ac.uk

C'est en partie pour cette première raison mécanique que la mise au point de matériaux composites, comprenant des fibres polymères et des céramiques phosphocalciques constitue une perspective intéressante pour reproduire plus fidèlement les propriétés mécaniques hybrides de l'os tant dans sa composante apatitique que dans sa composante fibreuse collagénique (Reddi 2000).

Une seconde raison biologique cette fois-ci, est justement de pouvoir mimer la structure de la matrice extra-cellulaire biologique avec des fibres synthétiques afin d'offrir aux cellules un environnement tridimensionnel poreux similaire à celui que les cellules rencontrent *in vivo* pour pouvoir adhérer, proliférer et communiquer par voie de signalisations protéiques (Lutolf et Hubbell 2005).

L'utilisation directe de collagènes comme biomatériaux est possible mais elle nécessite une isolation des fibres de collagènes à partir d'êtres humains ou d'animaux, étant inexistantes dans le monde végétal. Or cette extraction et isolation de collagène présente des inconvénients majeurs comme les hétérogénéités intra- et inter-lots dues aux différences et les possibles anomalies dépendant de chaque source vivante. De plus, l'utilisation de matériaux issus de l'Homme ou de l'animal pose le problème de la transmission de virus ou d'incompatibilité immunitaire pouvant amener des réactions allergiques chez les patients implantés (Mullins *et al.* 1996).

C'est pourquoi le développement de matrices fibreuses synthétiques connaît aujourd'hui un engouement particulier notamment autour du procédé d'électrofilage dont l'anglicisme « electrospinning » est communément utilisé en France.

4.2. Les polymères d'intérêt en ingénierie tissulaire osseuse

La collaboration entre le laboratoire du LIOAD et la compagnie Biomatlante a résulté en une étude de faisabilité concernant la valorisation de matières non-transformées industrielles liées à la production de vis orthopédiques à base d'acide polylactique (PLA), ou plus précisément du copolymère à blocs poly(L-lactide-co-D,L-lactide)(PLDLLA).

L'acide polylactique

En effet le monomère du PLA est une molécule chirale* possédant deux énantiomères* en fonction de la position spatiale du groupement méthyle (CH₃), comme la figure suivante l'indique. D'où la forme dite (L) lévogyre (« qui tourne à gauche ») et la forme dite (D) dextrogyre (« qui tourne à droite »).

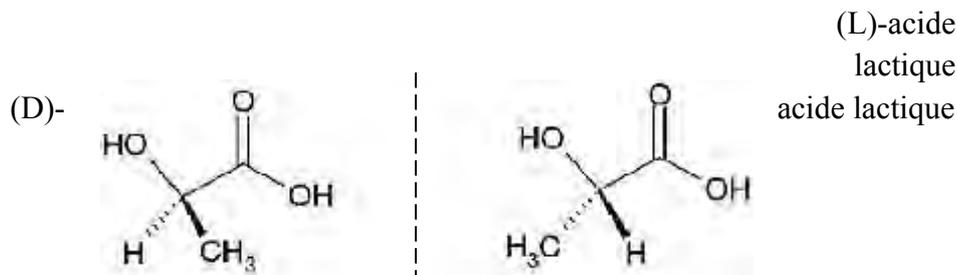
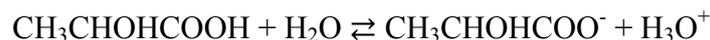


Figure 60 : Les 2 énantiomères de l'acide lactique

L'acide lactique est soluble dans l'eau ce qui le rend biorésorbable et constitue un atout pour son utilisation en ingénierie tissulaire osseuse (Ma *et al.* 2005). Il est considéré comme un acide faible (pKa=3,90), c'est-à-dire que la réaction de dissociation dans l'eau n'est pas totale :



Équation 3 : Hydrolyse de l'acide lactique

Ce monomère a été isolé pour la première fois en 1780 à partir de lait coagulé et a été produit commercialement dès 1881 (Garlotta 2001).

Le PLA peut être obtenu par deux voies totalement différentes. La première se fait à partir de la fermentation des sucres ou de l'amidon sous l'effet de bactéries synthétisant l'acide lactique

et al. 2005 ; Ren *et al.* 2005) tandis que le PCL, le PLA ou le PGA subissent les mécanismes d'hydrolyse plus lent (Yang *et al.* 2001) surtout en ce qui concerne le PCL qui ne se dissout qu'après plusieurs années (Holmbom *et al.* 2005). Il est ainsi intéressant de comparer ces propriétés avec celles des phases cristallines d'hydroxyapatite (HA) et β -TCP, qui sont quant à elles à la fois résorbées par l'action des ostéoclastes et par dissolution en milieux aqueux comme nous l'avons déjà décrit dans les précédents chapitres (Dellinger *et al.* 2006 ; Yamada *et al.* 2007). Le Tableau 19 fait état de ces caractéristiques de dégradation *in vivo*. Les chiffres ne sont pas des valeurs absolues mais indicatives, la dégradation dépendant de nombreux facteurs comme la morphologie de l'implant, sa densité ou sa cristallinité.

	Cinétique de dégradation <i>in vivo</i>	Mécanisme de dégradation <i>in vivo</i>
Collagène	2 semaines à 6 mois	Enzymatique
Chitosane	2 semaines à 3 mois	Enzymatique
PLA	2 mois à 1 an	Hydrolytique
PGA	4 à 6 mois	Hydrolytique
PCL	1 à 2 ans	Hydrolytique
HA	> 2 ans	Dissolution et résorption ostéoclastique
β -TCP	2 à 6 mois	Dissolution et résorption ostéoclastique

Tableau 19 : Cinétiques et mécanismes de biodégradation des principaux biomatériaux de l'ingénierie tissulaire osseuse, adapté de (Regis 2011)

L'électrospinning comme technologie de choix

Afin de réaliser ces matrices fibreuses nous avons donc utilisé la méthode de l'électrospinning, dont le premier brevet d'invention remonte à 1934 (Formhals 1934). Cette méthode consiste à appliquer un champ électrique de haute tension entre l'aiguille d'une seringue contenant la solution polymérique et un collecteur conducteur. La solution polymérique ainsi chargée subit les forces électrostatiques opposées entre celles du champ haute tension imposée (forces de Coulomb*) et les forces de répulsion des charges de surface des gouttes polymériques en bout de seringue (Yu 2007). Une fois une tension critique atteinte, les gouttes se déforment en un cône, dit cône de Taylor, et les forces électrostatiques extérieures surmontent les forces de tension de surface de la solution polymérique, un filin est alors éjecté de façon spiroïdale formant des fibres d'élongations de polymères par évaporation du solvant pendant le temps de vol entre l'aiguille et le collecteur métallique (Huang *et al.* 2003). La figure ci-dessous illustre ce mécanisme.

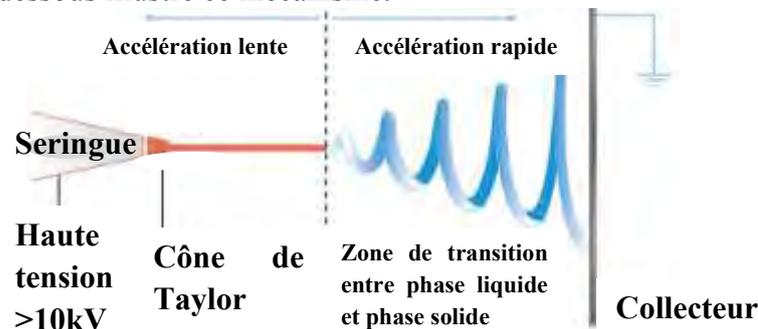


Figure 63 : Principe général de l'électrospinning

Dans notre cas, nous avons dissous le PLDLLA avec différents type de solvants et différentes concentrations afin de déterminer quel solvant et quelle concentration minimale en polymère nous pourrions utiliser.

Matériels et méthodes

Environ 1g de PLDLLA dont la proportion molaire en isomères est de 70% en (L)-acide lactique et 30% en (D,L)-acide lactique ont été plongées sous agitation dans des bains de quatre types de solvant : le chloroforme, le dioxane, le toluène et l'acétone.

Les concentrations en PLDLLA ont été testées entre 1 à 10 % massique par pas de 1%.

Les paramètres de routine employés pour réaliser l'électrospinning (Linari Biomedical Engineering, Italie) étaient de 25 kV pour la tension, de 20 cm pour la distance entre l'aiguille et le collecteur (feuille d'aluminium), et un flux de 5 mL/heure.

Résultats et discussion

La concentration minimale, et donc la plus économique, pour laquelle nous avons pu obtenir des fibres fut de 4% massique avec comme meilleur choix de solvant le chloroforme dissolvant les vis en 24 heures. Les autres solvants ne parvenant soit à compléter la dissolution des vis qu'après plusieurs jours soit à ne jamais les dissoudre complètement. Entre 4 et 8 % de PLDLLA dans le chloroforme nous avons obtenu des fibres de façon homogène, en revanche en dessous de 4% et au-dessus de 8% des gouttes et des hétérogénéités subsistaient (Zong *et al.* 2002). Le tableau ci-après résume ces résultats :

Solvants	<i>chloroforme</i>		<i>dioxane</i>	<i>toluène</i>	<i>acétone</i>	
Dissolution après 24h sous agitation	complète		incomplète	incomplète	incomplète	
Concentration massique en PLDLLA	< 4%	4 à 8%	8 à 10%	-	-	-
Possibilité de faire des fibres de façon homogène	non	oui	non	-	-	-

Tableau 20 : Dissolution du PLDLLA en fonction du solvant et obtention de fibre par électrospinning

Conclusion et perspectives

Le PLA, et en particulier le PLDLLA, ont très souvent été étudiés en électrospinning (Li *et al.* 2002 ; Liu et Ma 2004) et ces résultats préliminaires s'intègrent sans contradiction avec les études de la littérature (Ma *et al.* 2005; Leach *et al.* 2011). Nous avons donc pu vérifier que le polymère spécifique utilisé, provenant d'un cycle de production industrielle, n'avait pas été endommagé ou contaminé par des agents extérieurs pendant les procédés de fabrication et de récupération pouvant empêcher une bonne dissolution et leur électrofilage. Ces résultats attendus nous ont par la suite permis d'envisager la synthèse de membranes fibreuses composites en intégrant les nouveaux granules creux de BCP que nous avons décrits au chapitre précédent afin d'obtenir une matrice tridimensionnelle innovante.

4.3. Étude de faisabilité sur la mise au point de composites granules creux/fibres de PLDLLA

Les études à propos d'associations de fibres de PLA avec des nanoparticules ou microparticules d'hydroxyapatite (Kim *et al.* 2006), de β -TCP (Fan *et al.* 2005) ou de BCP (McCullen *et al.* 2009) sont répandues et relèvent cette faisabilité technique. Quelques études réfèrent à l'intégration de fibres de PLA dans des ciments phosphocalciques (Zuo *et al.* 2010) mais aucune à notre connaissance avec des granules creux de BCP. L'article annexé ci-après présente cette étude de faisabilité prometteuse contenant des caractérisations physicochimiques et des tests d'adhésion cellulaire, en comparant les membranes de PLDLLA avec les composites PLDLLA/microparticules de BCP et PLDLLA/granules creux. Le plan général de l'étude est établi dans la figure ci-dessous.

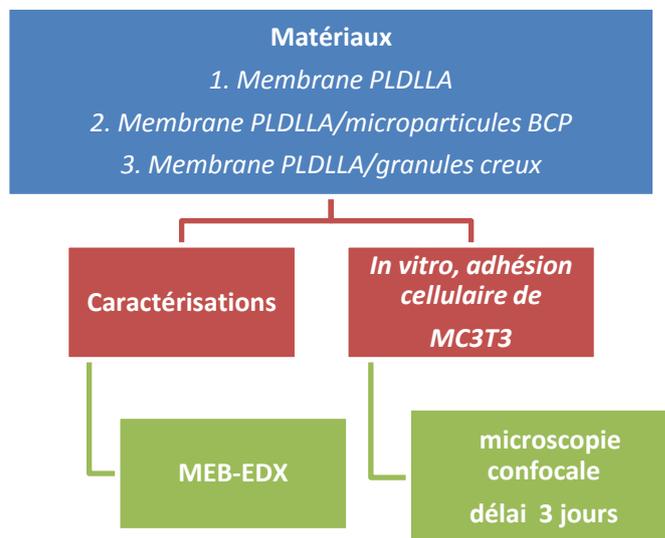


Figure 64 : Plan général de l'étude de faisabilité du développement de composite fibres de PLDLLA et de granules creux

“Composite bioceramics/polymer electrospun scaffolds for regenerative medicine”

Key Engineering Materials, 529-530: 441-446, 2013

Composite bioceramics/polymer electrospun scaffolds for regenerative medicine

T. Miramond^{1,2a}, P. Borget^{2b}, C.Colombeix^{1c}, S. Baroth^{2d}, and G. Daculsi^{1e}

¹INSERM Nantes University, Dental Faculty, place A. Ricordeau 44042 Nantes France;

²Biomatlante SA, 5 rue Edouard Belin, 44360 Vigneux de Bretagne France'

^athomas.miramond@etu.univ-nantes.fr, ^bpascalborget@biomatlante.com, ^ccaroline.colombeix@univ-nantes.fr, ^dsergebaroth@biomatlante.com, ^emailto:guy.daculsi@univ-nantes.fr

Keywords: Fibers, biphasic calcium phosphate, composite, scaffold, cell adhesion

Abstract

The main goal of this study was to succeed in the relevant association of well-known osteoconductive biphasic calcium phosphate (BCP) made of Hydroxyapatite (20% HA) and β -Tricalcium Phosphate (80% β -TCP) crystallographic phases and resorbable poly(L-lactide-co-D,L-lactide)(PLDLLA) 3D matrices synthesized by electrospinning. Two types of mineral particles were obtained, BCP new hollow granules, and classical BCP particles. It appeared that hollow shells/PLDLLA composite 3D matrices allowed higher cell adhesion *in vitro*, thanks to internal concavities and are promising scaffolds in terms of cell carrying.

Introduction

The need of both bioresorbable and osteoconductive 3D scaffolds able to recruit stem cells and enhance their differentiation to new bone, lead to innovative composite biomaterials synthesis for bone tissue engineering and gene therapy [1]. Electrospinning is a room temperature process invented in 1934 [2] involving nano or micro fibers-based scaffolds able to be used for bone ingrowth as literature mentioned it since the late 90s [3, 4]. Its biomimetic properties regarding extracellular matrix microstructure similarities enhanced cell attachment and adhesion [5-7]and justified this method to design fiber-based 3D scaffolds [7, 8]. One-step electrospinning process is then considered as a promising technology for regenerative medicine since it is low-cost, rapid and easy to perform [9]. Among all the available polymers in bone tissue engineering, such as polycaprolactone (PCL) or poly(lactic acid-co-glycol acid) (PLGA) [10, 11], poly(L-lactide-co-D,L-lactide)(PLDLLA) which is part of poly (α -hydroxyacids) family [12], was selected in our development according past studies results dealing with combination of BCP microparticles and PLDLLA for the elaboration of resorbable osteosynthesis with osteogenic properties [13-15].

As fiber -based scaffold need osteoconductive component to match bone tissue engineering specifications[16], addition of microparticles of hydroxyapatite (HA) or tricalcium phosphate (β -TCP) [17]to electrospun scaffolds have been shown to be relevant not only in term of cell adhesion enhancement, but also in cell differentiation involving extracellular matrix mineralization [18-20]. In this study biphasic calcium phosphate (BCP) new galenic formulation, that we called Hollow Shells, with a ratio HA/TCP of 20/80 were synthesized using specific granulation method so as to obtain a composite ceramic granule/3D fibers containing either macroscopic hollow shells or classical microscopic particles.

Osteoconductive properties of these BCP biomaterials have been proven for decades [21, 22] and resorption-precipitation mechanism involved *in vivo* have been explained to be favorable to osteoinduction [23, 24].

Materials and Methods

Poly(L-lactide-co-D,L-lactide) was obtained from Biomatlante SA (Vigneux-de-Bretagne, France).

After synthesis and sintering, hollow shells were passed through sieves in order to obtain granules (400 to 600 μm) and BCP microparticles of size less than 10 μm .

Thus two kinds of BCP were incorporated into the 3D scaffolds in two ways. In the first one, BCP microparticles were mixed with the polymer solution which was PLDLLA dissolved in chloroform at 4% w/v [25], and then projection was realized by electrospinning. The second one consisted on deposition on aluminium conductive support, of macroscopic granules called “hollow shells” being embedded during the electrospinning process.

The electrospinning device (Linarii Bioengineering, Italia) was set at 25kv, with a working distance of 20cm and a flow of 5cc/hour.

Three types of membranes were synthesized using PLDLLA:

- A. Polymer alone
- B. Composite Polymer/Bioceramic with macroscopic BCP hollow shells
- C. Composite Polymer/Bioceramic with microscopic classical BCP particles

Scanning Electron Microscopy (SEM) Fitted with Energy Dispersive X-Ray (EDX) were performed to localize BCP microparticles. Image analysis for fibers diameter was realized by manually measurement of pictures (n=5) for each kind of 3D scaffold. Density calculation were realized.

Cell adhesion assessment on membranes A, B and C was realized using MC3T3 osteoblastic murine cells after 3 days in contact of membranes in alpha MEM culture medium (10% Foetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin, 1% L-glutamin). Cells were fixed with paraformaldehyde (4% in phosphate buffer saline) then the immune-independent actin marker phalloidin (Sigma-Aldrich) have been incorporated to the seeded cells after using a permeabilization buffer (Tween 0.05%, BSA 3% in PBS). Nucleus staining was obtained thanks to Topro-3 DNA dye (Invitrogen). Stained cells were then observed *in situ* using fluorescent and confocal microscopy, in order to determine cells density and cells morphology.

Results

Hollow shells were observed after sintering and before electrospinning process. A large macropore concavity (figure 1a) appeared in each granule with a diameter of between 300 μm to 500 μm and high microporosities content less than 1 μm (figure 1b).

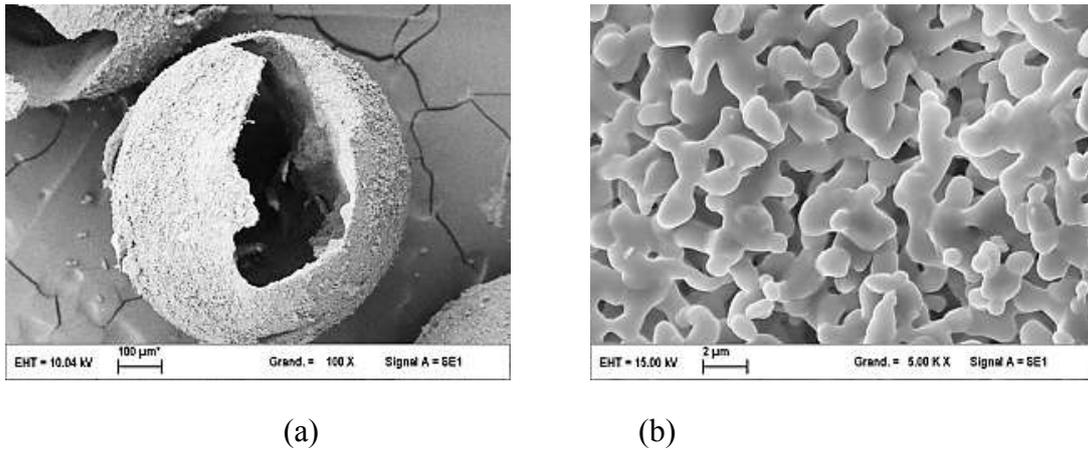


Figure 1: Hollow Shells characterization before electrospinning process

Electrospun fibers of all membranes types (A, B, C) were found to have a bimodal distribution of their diameters, fiber diameters 4 μm (class I) and fiber diameters 1 μm (class II) as seen in figure 2.

Hollow shells of type B scaffolds were embedded in lower density of fibers comparing to the rest of the scaffold (figure 2b), with a round area around hollow shells of approximately 500 μm in diameter.

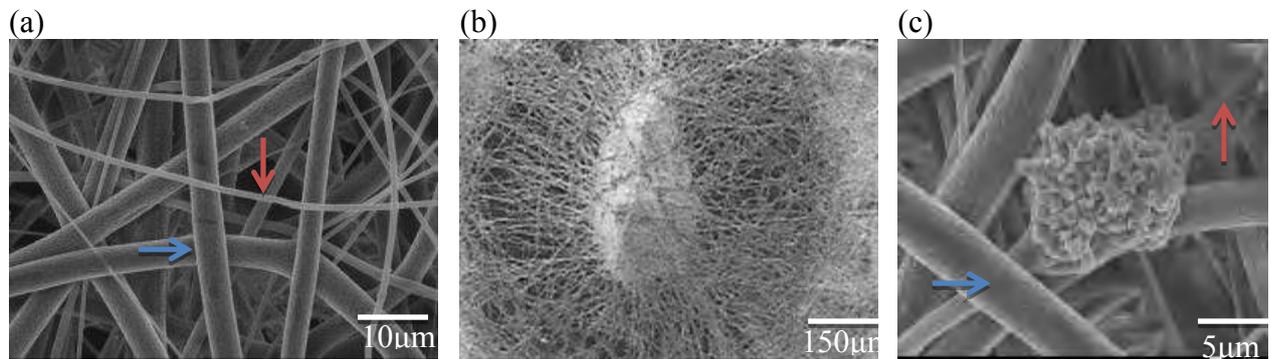
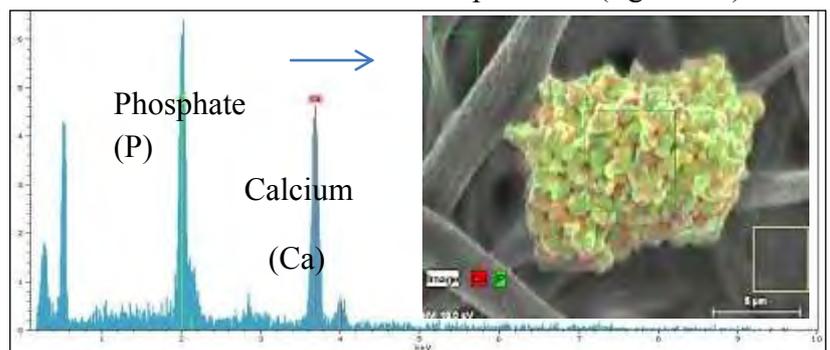


Figure 2: (a) sample A; (b) sample B Hollow Shells; (c) sample C with BCP micro particles. Arrows: class I (blue) and class II (red)

BCP Micro particles of membranes type C were localized by EDX cartography and appeared to be partially encapsulated into fibers leaving the grains and micropores appear (figure 2c). It was pointed out that only fibers of class II contained BCP micro particles (figure 2c). Qualitative EDX spectra of BCP particles confirmed the presence of calcium and phosphate without any contaminants (figure 3).

Figure 3: Qualitative Energy Dispersive X-Ray (EDX) spectra of BCP microparticles (arrow) in scaffold C showed only Ca and P



For all types of scaffolds, only class I fibers were characterized as microporous, and image analysis was performed to evaluate surface porosity of these fibers (figure 2 and figure 4). Surface intraporosity of class I fibers were calculated as between 10 and 15 %. Class II thinner fibers presented almost none porosity. The density of all samples was $0.3 \text{ g/cm}^3 \pm 0.05$, interporosity between the fibers was calculated from density and rounded to 75 % for all scaffolds types.

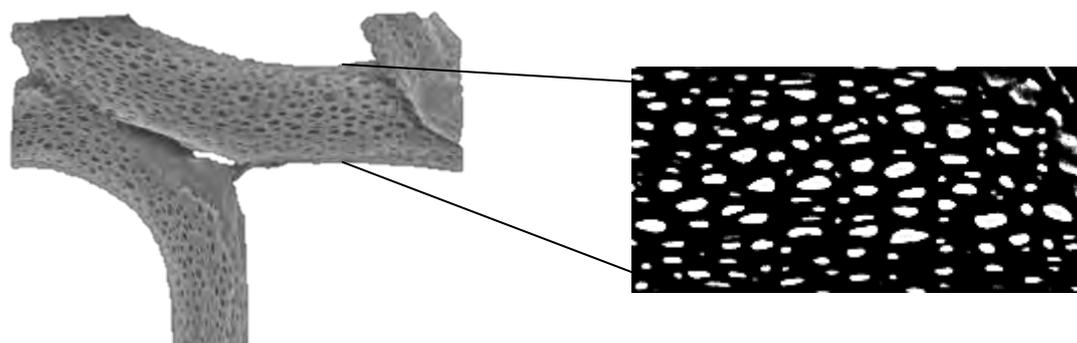


Figure 4: Image analysis of class I fiber surface intraporosity

Confocal microscopy observations of living cells adhering to scaffolds shown two main differences between samples A, C and sample B. The first one was the cell density, which appeared higher inside hollow shells than on fibers (figure 5c). The second one was the cell morphology, filiform cells were extended along the fibers (figure 5a and 5b) while much more spreaded inside hollow shells as shown in figure 5c.

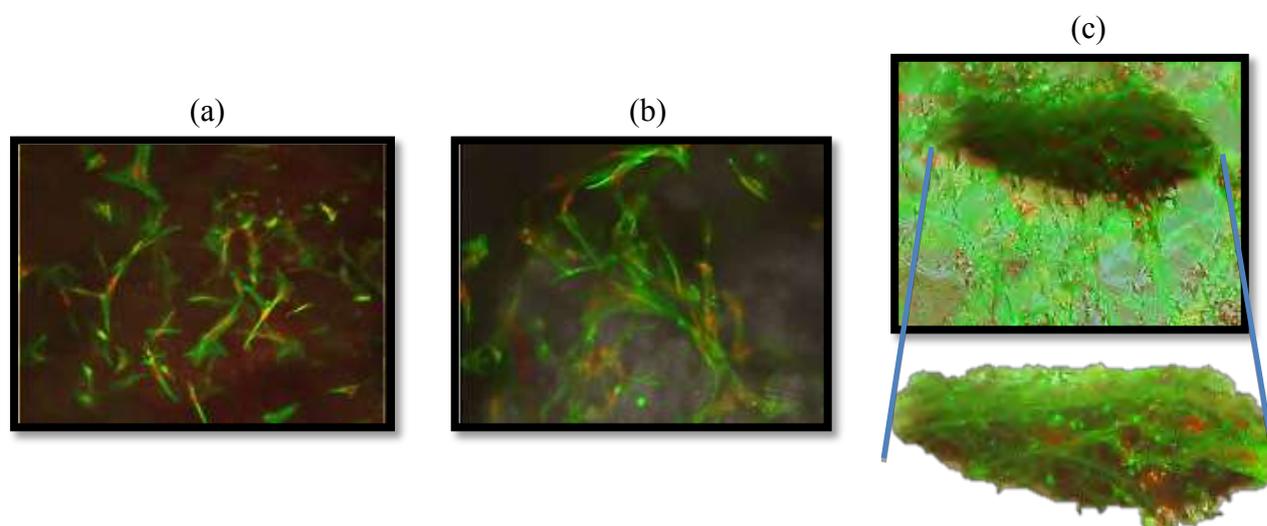


Figure 5: Filiform cells adhering on fibers of sample A (a), sample B (b), and spreading in hollow shells of sample C (c) at day 3

Discussion

Confocal microscopy observations enabled us to conclude PLDLLA fiber scaffolds are favorable to cell adhesion and proliferation with cell guidance along fibers leading to filiform morphology [26].

The incorporation of BCP micro particles in the polymeric solution lead to alter the homogeneity of the latter and thus disrupt the stability of the Taylor cone at the time of

passage of particles through the needle of the syringe. This results in a decrease of the fiber diameter containing the ceramic micro particles. The slight increase in which that did not contain it due to higher magnitude of fluctuation of Taylor cone [27]. This fluctuation phenomenon is the cause of non-homogeneity of fibers diameters observed in this study (class I and class II fibers) [28].

The advantages of embedded BCP hollow granules in PLDLLA electrospun scaffolds are related to the seminal role of macropore concavities in adhesion and cell protection [29-31]. These specific properties combined to microporosity known to enhance proteins adhesion and body fluids penetration [32, 33]. The only matter is to provide better homogeneity around non-conductive ceramic hollow shell which leads to lower fiber density areas as shown in this study. Moreover the high micrometric diameters of obtained fibers involved a better flexibility but a lower tensile strength than nanofibers [34].

Conclusion

Electrospinning has been demonstrated to be a low-cost, fast and easy one-step process to perform promising 3D composite fiber-based scaffolds with cell adhesion and protection enhancement thanks to new Hollow Shells incorporation. All membranes were flexible and easy to handle which are assets to provide relevant scaffolds for clinical purposes particularly in regenerative medicine.

Acknowledgments:

The research leading to these results has received funding from the European Union's 7th Framework Programme under grant agreement no FP7-HEALTH-2009-241879 (REBORNE) and no NMP3-SL-2010-245993 (GAMBA). Authors would like to thank Nicolas Stéphant and Paul Pilet for their help to this work.

References

1. Murugan, R. and S. Ramakrishna, *Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies*. Tissue engineering, 2006. **12**(3): p. 435-447.
2. Formhals, A., *Process and apparatus for preparing artificial threads: US, 1975504*, 1934.
3. Huang, Z.M., et al., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites science and technology, 2003. **63**(15): p. 2223-2253.
4. Laurencin, C.T., et al., *Fiber based tissue engineered scaffolds for musculoskeletal applications: in vitro cellular response*. 1998. **550**: p. 127.
5. Nisbet, D., et al., *Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering*. Journal of biomaterials applications, 2009. **24**(1): p. 7-29.
6. Kim, T.G. and T.G. Park, *Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh*. Tissue engineering, 2006. **12**(2): p. 221-233.
7. Ramakrishna, S., et al., *Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine*. Journal of materials science, 2010. **45**(23): p. 6283-6312.
8. Liao, S., et al., *Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration*. Biomedical Materials, 2006. **1**: p. R45.
9. Li, J., et al., *A one-step method to fabricate PLLA scaffolds with deposition of bioactive hydroxyapatite and collagen using ice-based microporogens*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(6): p. 2013-2019.
10. Khan, N., *Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field*. Studies by Undergraduate Researchers at Guelph, 2012. **5**(2): p. 63-73.

11. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review*. Tissue engineering, 2006. **12**(5): p. 1197-1211.
12. Hollander, A.P. and P.V. Hatton, *Biopolymer methods in tissue engineering*. Vol. 238. 2004: Humana Pr Inc.
13. Jouan, G., et al., *PL DLLA Calcium Phosphate Composite Combined with MBCP Gel® for New Surgical Technologies: Resorbable Osteosynthesis and Bone Substitute*. Key Engineering Materials, 2008. **361**: p. 571-574.
14. Jouan, G., et al., *PL DLLA Calcium Phosphate Composite Combined with Macroporous Calcium Phosphate Cement MCPC® for New Surgical Technologies Combining Resorbable Osteosynthesis and Injectable Bone Substitute*. Key Engineering Materials, 2008. **361**: p. 411-414.
15. Borget.P. *PLA/BCP granules composites for resorbable osteosynthesis: Preclinical and first clinical data*. in *9th World Biomaterials Congress*. 2012. Chengdu, China.
16. Dorozhkin, S.V., *Bioceramics of calcium orthophosphates*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1465-1485.
17. Lam, C., et al., *Mechanical and in vitro evaluations of composite PLDLLA/TCP scaffolds for bone engineering*. Virtual and Physical Prototyping, 2008. **3**(4): p. 193-197.
18. Gupta, D., et al., *Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts*. Biomaterials, 2009. **30**(11): p. 2085-94.
19. Guan, D., et al., *Attachment, proliferation and differentiation of BMSCs on gas-jet/electrospun nHAP/PHB fibrous scaffolds*. Applied Surface Science, 2008. **255**(2): p. 324-327.
20. Chen, J., B. Chu, and B.S. Hsiao, *Mineralization of hydroxyapatite in electrospun nanofibrous poly (L - lactic acid) scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **79**(2): p. 307-317.
21. G. Daculsi, N.P., S. Martin, J.C Le Nihouannen, V. Brulliard, J. Delecrin, B. Kerebel, *A comparative study of bioactive calcium phosphate ceramics after implantation in cancellous bone in the dog*. The French Journal of Orthopaedic Surgery 1989. **3**: p. 43-48.
22. Royal F. Ellinger, E.B.N., Kenneth L. Lynch, *Histological assessment of periodontal osseous defects following implantations hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics : a case report*. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry 1986.
23. Kokubo, T., H.M. Kim, and M. Kawashita, *Novel bioactive materials with different mechanical properties*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2161-2175.
24. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
25. Gizdavic - Nikolaidis, M., et al., *Electrospun Functionalized Polyaniline Copolymer - Based Nanofibers with Potential Application in Tissue Engineering*. Macromolecular bioscience, 2010. **10**(12): p. 1424-1431.
26. Badami, A.S., et al., *Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates*. Biomaterials, 2006. **27**(4): p. 596-606.
27. Theron, S., E. Zussman, and A. Yarin, *Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions*. Polymer, 2004. **45**(6): p. 2017-2030.
28. Sigmund, W., et al., *Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems*. Journal of the American Ceramic Society, 2006. **89**(2): p. 395-407.
29. Richart, O., M. Descamps, and A. Liebetrau, *Macroporous calcium phosphate ceramics: Optimization of the porous structure and its effect on the bone ingrowth in a sheep model*. Key Engineering Materials, 2000. **192**: p. 425-428.
30. O. Gauthier, D.B., G. Grimandi, E. Aguado, J.M. Bouler, P. Weiss, G. Daculsi *Bone-grafting of canine extraction sockets with an injectable calcium phosphate biomaterial*. Bioceramics, 1998.
31. Ripamonti, U. and L. Roden, *Biomimetics for the induction of bone formation*. Expert Rev Med Devices, 2010. **7**(4): p. 469-79.
32. Habibovic, P., et al., *3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3565-75.
33. Le Nihouannen, D., et al., *Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles*. Bone, 2005. **36**(6): p. 1086-1093.
34. Wong, S.C., A. Baji, and S. Leng, *Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly (-caprolactone)*. Polymer, 2008. **49**(21): p. 4713-4722

4.4. Compléments et discussions

A. Compléments directs à l'étude de mise au point de matrices fibreuses composites

L'étude de l'article annexé au paragraphe précédent établit la faisabilité technique d'incorporer par électrospinning des granules creux de BCP dans les mailles des membranes fibreuses de PLDLLA. De plus les tests d'adhésion cellulaire par microscopie confocale ont clairement montré que les cellules adhèrent et prolifèrent en masse à l'intérieur de ces granules creux. Les cellules adhérentes sur les fibres microscopiques des membranes adaptent leur morphologie et la direction de leur prolifération de façon à suivre les prolongements fibreux comme la figure complémentaire ci-dessous le confirme.

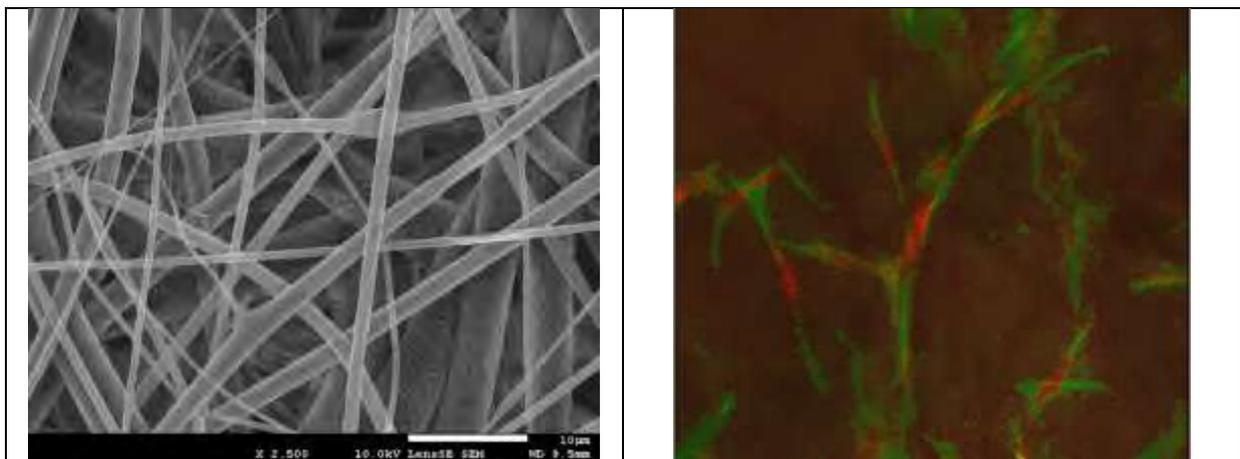


Figure 65 : Image MEB des fibres de PLDLLA avant mise en contact avec des cellules mc3t3 (gauche) et image confocale après 3 jours de culture avec cellules filiformes proliférant le long des fibres (droite)

L'observation au MEB de membranes avec cellules permet de confirmer cette adaptation de la cellule à la morphologie fibreuse, et de percevoir également des extensions cellulaires entre fibres même éloignées prouvant l'élasticité et le caractère tridimensionnel de la prolifération des MC3T3 analysées, comme la figure ci-dessous le démontre.

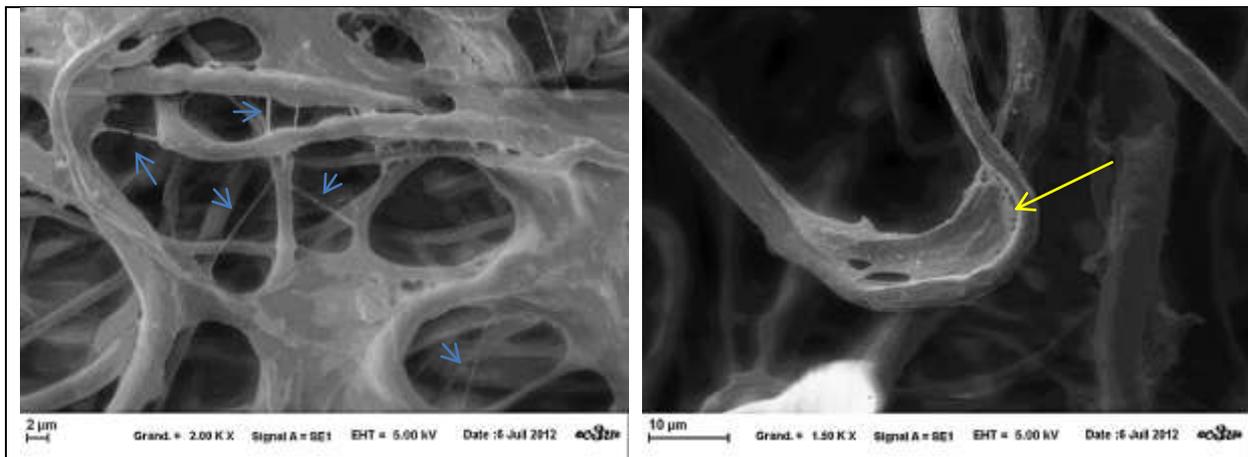


Figure 66 : Extensions cellulaires de mc3t3 entre fibres (flèches bleues, gauche) et une cellule adaptant sa morphologie à celle d'une fibre de PLDLLA (droite). Des filopodes sont discernables (flèche jaune)

En ce qui concerne l'incorporation des microparticules de BCP, nous avons pu remarquer de très rares fois après observation au MEB que certaines particules provoquaient une rupture nette dans la continuité de la fibre. La figure ci-dessous compare une fibre avec une microparticule dont l'intégration est réussie et une fibre avec rupture nette à l'endroit où se trouve la microparticule de BCP.

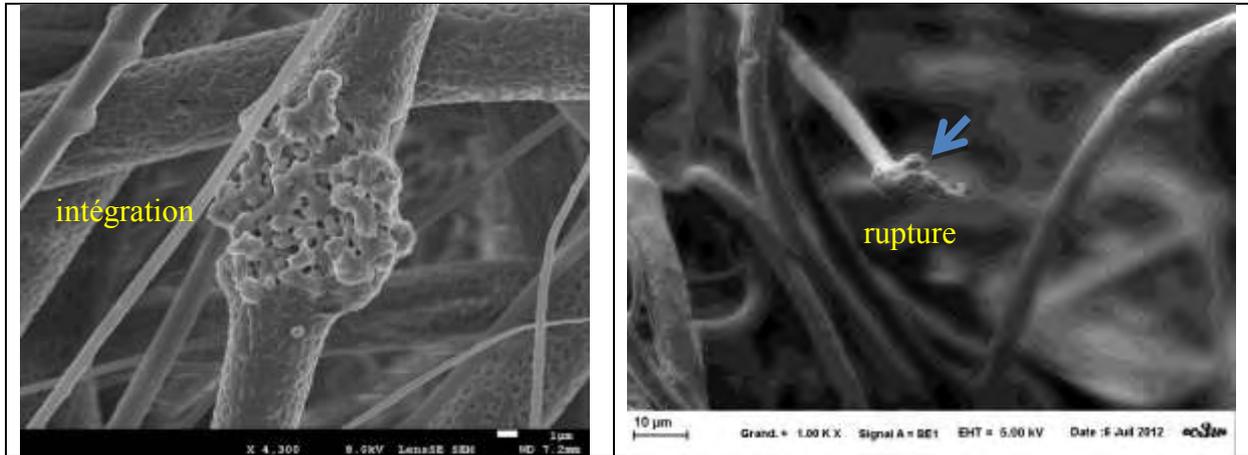


Figure 67 : Intégration réussie d'une microparticule de BCP (gauche), et rupture de continuité provoquée par la présence d'une microparticule de BCP (droite) sur fibres de PLDLLA

Enfin une remarque complémentaire concernant l'intégration des granules creux dans les mailles fibreuses de PLDLLA, nous avons pu constater dans l'article annexée ci-avant que la présence de granules macroscopiques de céramiques non-conductrices n'empêchait pas leur intégration dans les membranes mais provoquaient une hétérogénéité de concentration de fibres autour d'eux. Cependant en augmentant le temps de projection des fibres, et donc leur quantité, ce phénomène peut être réduit voire disparaître comme les clichés de MEB complémentaires présentées ci-dessous le démontrent.

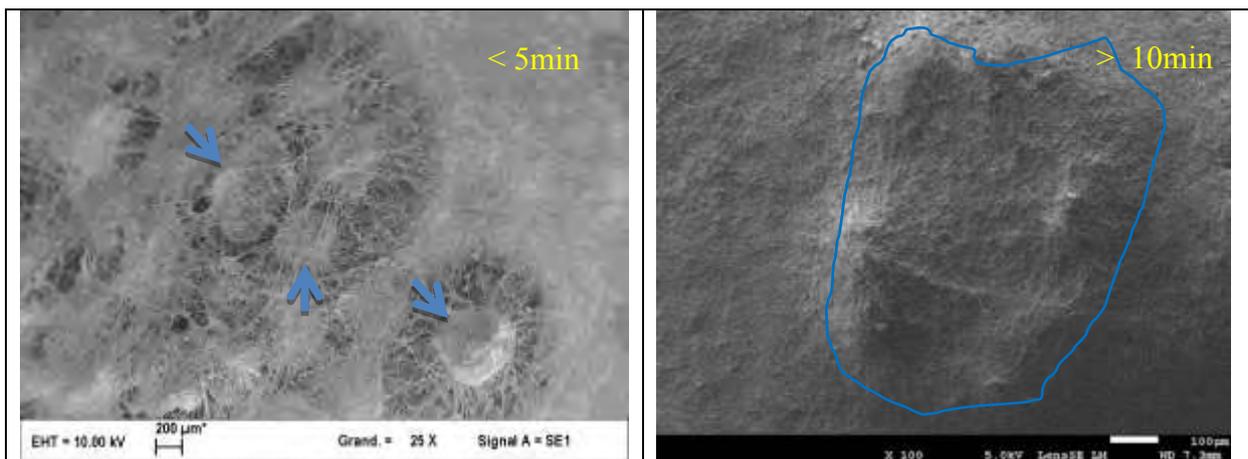


Figure 68 : Granules creux intégrés aux mailles PLDLLA (flèches et contours bleus), avec temps de projection court provoquant des hétérogénéités (gauche) et temps de projection long impliquant une homogénéité (droite)

Enfin il est intéressant de comparer les fibres de PLDLLA obtenues par électrospinning avec les fibres de collagène de la matrice extracellulaire. La similarité d'architecture tridimensionnelle conforte cette approche biomimétique même si ici les fibres obtenues sont

de l'ordre du micromètre alors que les fibres de collagènes de type I d'origine bovine que nous avons observées sont de l'ordre de 150 nanomètres, soit six fois plus petites. La figure ci-dessous illustre ces propos.

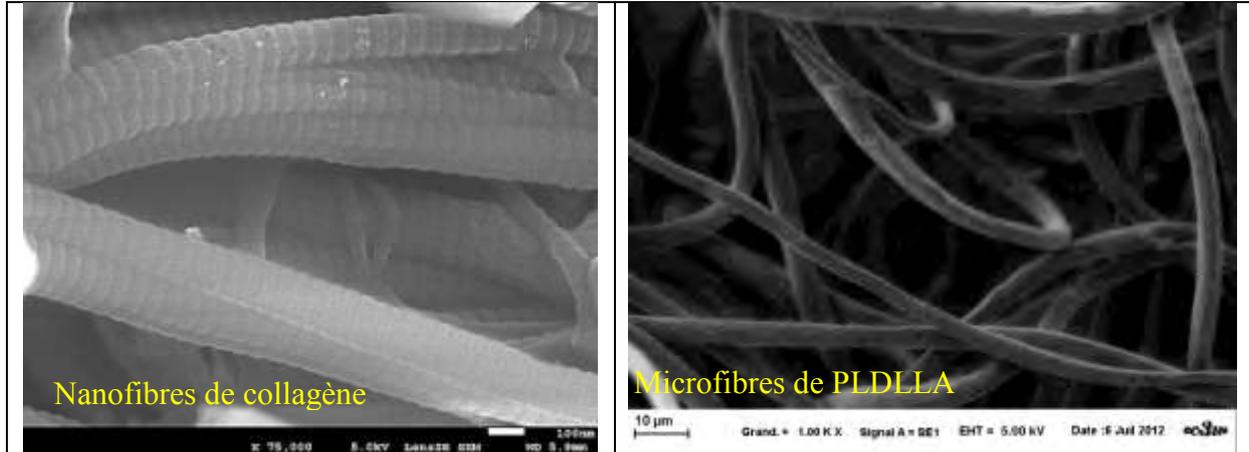


Figure 69 : Fibres de collagène (gauche) et de PLDLLA obtenues par électrospinning (droite). MEB

B. Test de biocompatibilité ectopique et orthotopique des membranes PLDLLA

Une étude de biocompatibilité de ces membranes fibreuses en PLDLLA synthétisées par électrospinning, a été réalisée chez le rat en sous-cutanée et en site orthotopique en comparaison avec une membrane de chitosane d'origine végétale (Kytozyme, Belgique).

Matériels et Méthodes

4 rats Wistar mâles (Janvier, France) âgés de 8 semaines ont été implantés avec des membranes de PLDLLA et des membranes de chitosane en sous-cutanée dorso-latérale et en épiphyse fémorale par la réalisation d'un défaut de taille critique de diamètre de 2 à 3mm et de profondeur de 3mm, selon le plan décrit dans le tableau ci-dessous.

Les membranes de PLDLLA ont été réalisées par électrospinning d'une solution concentrée à 4% massique dans du chloroforme. Les paramètres utilisés étant une tension de 25 kV, une distance de travail de 20 cm et un débit de 5mL/heure. Les 2 types de membranes (chitosane et PLDLLA) ont été découpées afin d'avoir une surface d'environ 1 cm² et ont subi un traitement antiseptique en les plongeant dans un bain d'alcool à 70% pendant 24heures puis séchées à l'air libre 15 minutes avant l'implantation sur un champ stérile.

Les rats ont été explantés après un délai de 2 semaines et 4 semaines. Des photographies ont été réalisées à l'explantation extemporanément. Les explants sous-cutanés uniquement ont ensuite été déshydratés par bains d'alcool en concentration graduellement augmentée puis inclus en paraffine. Des coupes histologiques fines de 60µm ont alors été réalisées puis colorées au trichrome de Masson.

Délai 2 semaines			Délai 4 semaines		
	Ectopique	Orthotopique		Ectopique	Orthotopique
Rat 1	PLDLLA/Chitosan	PLDLLA/Chitosan	Rat 3	PLDLLA/Chitosan	PLDLLA/Chitosan
Rat 2	PLDLLA/Chitosan	PLDLLA/Chitosan	Rat 4	PLDLLA/Chitosan	PLDLLA/Chitosan

Tableau 21 : Plan d'implantation pour le test de biocompatibilité des membranes PLDLLA et chitosane

Résultats et discussion

Les clichés faits à 2 semaines montrent une encapsulation nette des membranes de chitosane (Figure 70 (b)) et une intégration des membranes de PLDLLA électrofilées sans réactivité apparente du tissu hôte en sous-cutané (Figure 70 (a)). Les photos des sites orthotopiques montrent une vive rougeur au niveau du trou d'implantation pour les membranes de chitosane (Figure 70 (d)) et aucun signe apparent de réactivité du tissu hôte pour les membranes de PLDLLA (Figure (c)).

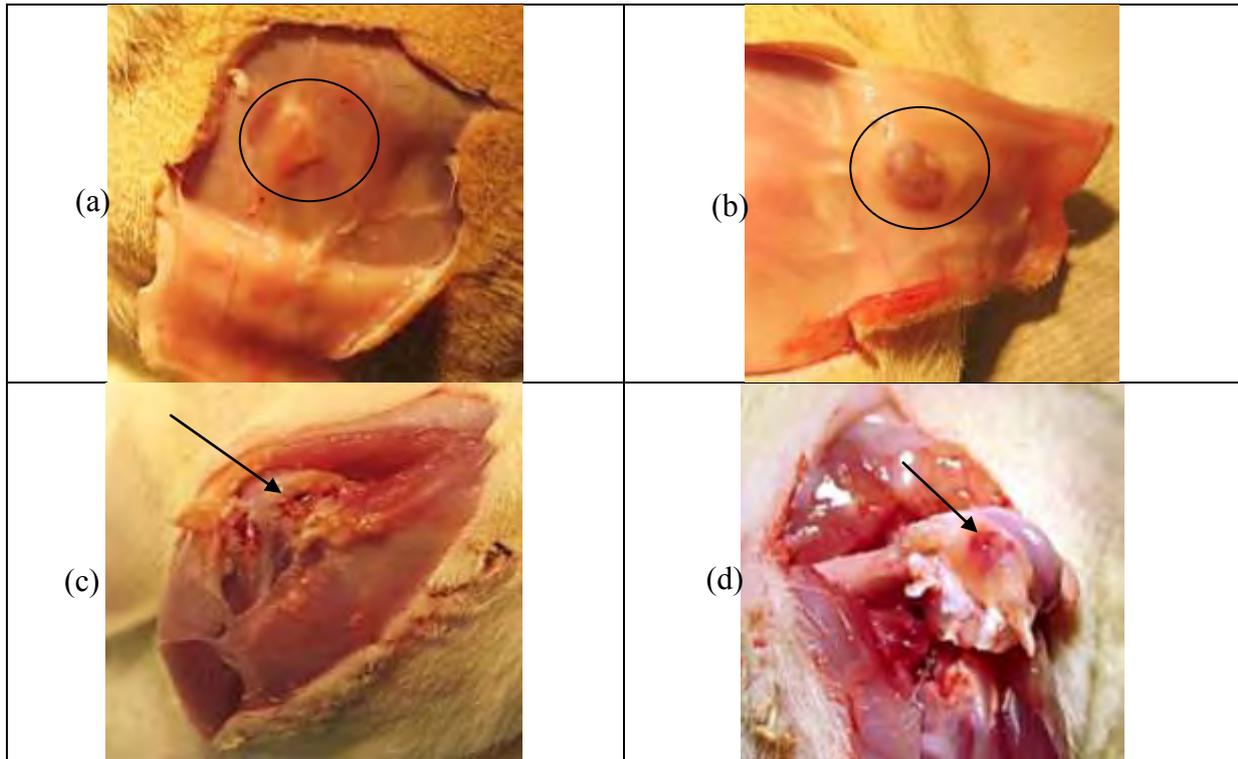


Figure 70 : Macrographies réalisées à l'explantation des rats à 2 semaines. (a) PLDLLA en sous-cutanée ; (b) chitosane en sous-cutanée ; (c) PLDLLA en épiphyse fémorale ; (d) chitosane en épiphyse fémorale

À 4 semaines, on observe une réactivité amoindrie des tissus hôtes en présence des membranes de chitosane en site orthotopique sans rougeurs (Figure 70 (d)) et toujours une encapsulation en site ectopique mais moins prononcée (Figure 70 (b)). Pour les membranes en PLDLLA les résultats de bioinertie observés à 2 semaines avec aucun signe inflammatoire apparent ou d'encapsulation (Figure 70 (a) et (c)).

Les analyses histologiques des coupes colorées des explants en site sous-cutané confirment l'encapsulation des membranes de chitosane avec présence de tissu fibreux (Figure droite) tandis que les membranes de PLDLLA obtenues par électrospinning sont intégrées au tissu hôte sans provoquer ni d'encapsulation ni de tissu inflammatoire (Figure gauche).

Il est difficile de trouver dans la littérature ce genre de réaction avec le chitosan car les applications du chitosane sont extrêmement larges (Ravi Kumar 2000), bien que l'encapsulation soit stipulée dans quelques cas explicites (Ito *et al.* 1999). Les membranes n'ayant pas été stérilisées par irradiations, nous pouvons émettre l'hypothèse que le traitement antiseptique n'a éventuellement pas été suffisant pour éliminer suffisamment de biocharges* ou que ce dernier ait pu induire une réaction d'inflammation (Hare et Gash 1963).

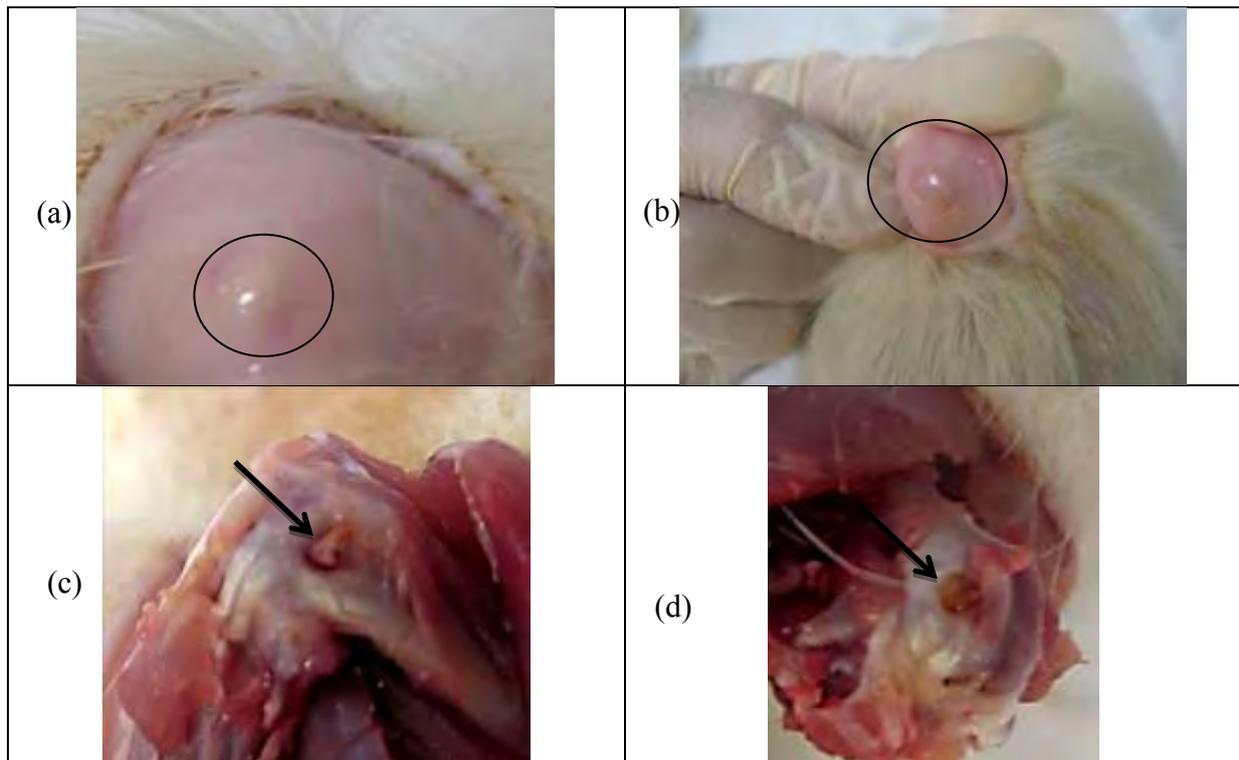


Figure 71 : Macrographies réalisées à l'explantation des rats à 4 semaines. (a) PLDLLA en sous-cutanée ; (b) chitosane en sous-cutanée ; (c) PLDLLA en épiphyse fémorale ; (d) chitosane en épiphyse fémorale



Figure 72 : Coupes histologiques à 4 semaines avec encapsulation (flèches bleues) des membranes de chitosane (filaments rouges, à droite) ainsi que présence abondante de tissu fibreux (flèches orange, à droite).

Conclusion

D'après les critères énoncés au chapitre 1, on peut ici conclure à la bioinertie des membranes de PLDLLA que nous avons synthétisées par électrospinning (Kim *et al.* 2004) et à la biotolérance des membranes de chitosane préparées dans des conditions antiseptiques (Zhang et Zhang 2001). Ces résultats concernant la biocompatibilité inerte des membranes de PLDLLA sont encourageants et devront être étendus à de plus larges études animales en associant les fibres de PLDLLA avec les microparticules de BCP et les granules creux de BCP.

C. Potentiel de différenciation ostéogénique évaluée par RT-PCR en temps réel

Une étude sur l'évaluation du potentiel d'ostéoinduction des membranes composites de PLDLLA avec microparticules d'hydroxyapatite (HA) et granules creux de BCP a été réalisée par la méthode de réactions en chaîne par polymérase après transcription inverse en temps réel (RT-PCR). La différenciation ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses humaines (Lonza) a été suivie par la variation du niveau d'expression des marqueurs codant pour la phosphatase alcaline (ALPL), l'ostéocalcine (OCN), le collagène de type I (COL1A1) et du facteur de transcription RUNX2 (Aubin *et al.* 1995; Zur Nieden *et al.* 2003; Komori 2008).

Matériels et Méthodes

Des granules creux de BCP de 400 à 600 μm de diamètre ont été déposés par quantité de 50mg en en plaques de culture « Ultra-Low Adherence » (puits de 1,9 cm^2) afin de ne favoriser l'adhésion des cellules que sur les granules.

Les membranes de PLDLLA seules, des matrices composites PLDLLA/microparticules d'HA en proportion de 1/500 en masse/volume de CaP et des matrices composites PLDLLA/granules creux de BCP contenant chacune 5mg de granules creux, ont été découpées afin de recouvrir la surface des mêmes puits de culture que ceux décrits ci-dessus.

Sur toutes ces matrices 3D ont été cultivées des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) à une concentration de 10^4 cellules/ cm^2 , en présence soit de milieu standard (CT) (α -MEM, 10%FBS, 1%L-glutamine, 1%Pénicilline/Streptomycine) soit de milieu ostéogénique (OST) (milieu standard supplémenté de 50 μM d'acide ascorbique, 0,1 μM de dexaméthasone, 100mM de β -Glycérophosphate).

Le contrôle est représenté par des cultures en 2D dans les mêmes conditions (CT et OST). Après 7, 14, 21 et 28 jours de culture les ARN sont extraits par la méthode du Trizol et traités à la DNase éliminant l'ADN génomique. Les protocoles détaillés correspondant se trouvent en annexe (annexe 7).

Les ARN ont été quantifiés au Nanodrop (ND-1000, Labtech), le ratio des signaux acquis à 260nm/280nm faisant état de l'intégrité des ARN et le ratio des signaux acquis à 260nm/230nm résultant de la pureté des ARN. Les ratios compris entre 1,8 et 2,1 étant considérés comme ceux correspondant à de l'ARN pur pouvant être exploité par RT-PCR. L'évaluation de l'intégrité des ARN a également été vérifiée sur puce ARN (Agilent Bioanalyzer 2100), les ARN étant considéré intègre pour un RIN (RNA Integrity Number) supérieur ou égale à 7 sur une échelle de 10. Le protocole se situe en annexe (annexe 8). La PCR en temps réel a été réalisé après une étape de transcription inverse des ARN (obtention de cDNA) par la méthode de SYBR Green (MX3000P, Stratagen). Deux gènes de références (PP1A et ACTB) ont permis de normaliser les résultats.

Résultats

Les 3 premiers délais n'ont pas pu être exploités car l'extraction d'ARN sur les matrices 3D fibreuses ou granulaires est difficile, nous n'avons pas assez de recul pour connaître les biais que nos biomatériaux peuvent engendrer tant dans l'analyse de l'intégrité des ARN que celle des résultats du monitoring d'expression des marqueurs géniques. Cependant pour cette étude, le temps à 28 jours permet d'obtenir des résultats concernant l'influence des matrices

(3D vs 2D) et l'induction d'une différenciation en milieu ostéogénique (OST). Ces résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	Contrôles 2D		3D Granules creux		3D Membranes PLDLLA et granules creux		3D Membranes PLDLLA et microparticules de HA		3D Membranes PLDLLA	
	CT	OST	CT	OST	CT	OST	CT	OST	CT	OST
ALPL										
COL1 A1										

Tableau 22 : Résultats d'expression génique ALPL et COL1A1 des CSM par RT-PCR en temps réel
CT: milieu contrôle; OST: milieu ostéogénique.

En rouge apparaît le facteur multiplicatif de l'expression des marqueurs entre milieu CT et OST.

Conclusion de l'étude par RT-PCR en temps réel

En comparaison avec la condition contrôle 2D, seules les matrices 3D contenant des phosphates de calcium (granules creux ; membranes PLDLLA/granules creux ; membranes PLDLLA/microparticules de BCP) présentent à 28 jours une augmentation significative de l'expression génique de l'ALPL et COL1A1. En effet, les membranes PLDLLA seules ne démontrent pas à 28 jours ce potentiel de différenciation des cellules souches humaines, même moins qu'en 2D en ce qui concerne l'expression du COL1A1. Il apparaît une très nette augmentation du potentiel d'induction de la différenciation des cellules en présence des granules creux seuls (x45 pour ALP et x 130 pour COL1A1). Les membranes composites PLDLLA/granules creux présentent une différenciation dix fois moins prononcée qu'avec les granules creux seuls (x4, 5 pour ALPL et x10 pour COL1A1). Ceci peut s'expliquer par la présence justement dix fois inférieure de granules creux dans les membranes (5mg contre 50mg). Ces premiers résultats tendent donc à confirmer que la présence de CaP, sous forme de granules ou sous forme de particules, permet une différenciation des cellules souches en milieu ostéogénique (« 3D avec CaP » vs « 3D sans CaP » et « 3D avec CaP » vs « 2D »). L'étude présentée au chapitre 3 a montré que les cellules adhèrent massivement au sein des concavités des granules creux, ainsi cette différenciation ostéogénique plus prononcée des cellules en présence de granules creux pourraient confirmer l'influence de la morphologie des CaP sur le potentiel d'ostéoinduction (Ripamonti et Roden 2010). La condition contrôle 2D ne montre pas pour l'ALPL de différence entre milieu contrôle et milieu ostéogénique ce qui n'est pas standard. Une réitération de l'étude pourra confirmer ou infirmer ces premiers résultats prometteurs.

Perspectives et discussion

L'obtention de membranes composites composées de fibres PLDLLA intégrant les nouveaux granules creux est prometteuse. Elle permet à la fois de valoriser des matières premières non-utilisées dans les cycles de production de vis orthopédique et d'obtenir une matrice composite tridimensionnelle innovante. Le rôle des fibres est de mimer la structure de la matrice extracellulaire collagénique offrant de nombreux points d'attache aux cellules dans toutes les directions de l'espace. Les granules creux de BCP intégrés aux membranes fibreuses ont montré *in vitro* leur fort potentiel complémentaire d'accueil des cellules dans leur concavité (figure 73A). Notons toutefois que les fibres obtenues sont de l'ordre du micromètre (figure 73B) tandis que la matrice extracellulaire biologique est composée de fibres de collagène nanométriques (73C) offrant plus de points d'ancrage et une surface spécifique supérieure pour l'adhésion des protéines et permettant une meilleure signalisation intercellulaire (Curtis *et al.* 2004).

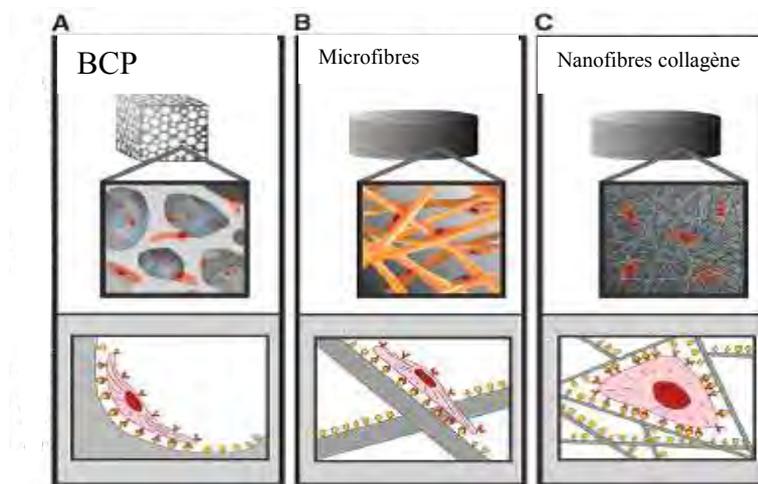


Figure 73 : Les 3 types d'adhésion cellulaire sur matrices

Ces matrices fibreuses composites permettent à la fois d'espacer les granules creux et de rendre l'ensemble mécaniquement cohérent. Ces atouts associés à la bioinertie démontrée du PLDLLA, à la forte bioactivité des BCP que nous avons étudiés tout au long de ce manuscrit et au fort potentiel des granules creux en tant que porteurs et protecteurs de cellules, font également de ces membranes composites des candidats prometteurs pour le projet GAMBA.

Le PLA et ses dérivés ainsi que les BCP sont déjà approuvés depuis plusieurs décennies pour usage clinique par les organismes de sureté médicale tel que l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) ou la FDA (Food and Drug Administration) (Langer 2000). Ceci rend potentiellement ce type de nouveau composite, fait d'éléments complémentaires indépendamment bien connus en clinique mais ici sous une formulation nouvelle, facilement transposable en applications cliniques d'ingénierie tissulaire osseuse de par ses caractéristiques ostéoconductrices et ostéoinductrices, grâce aux BCP micro-macropores.

CONCLUSION GENERALE

L'intérêt biologique des phosphates de calcium et en particulier des biphasés HA/TCP réside comme nous l'avons vu à la fois dans leur composition chimique et cristallographique proche de celle de l'os correspondant à l'approche biomimétique, et dans leur arrangement structural dont la double porosité macroscopique (100 à 500 μm) et microscopique ($< 10 \mu\text{m}$) est un des facteurs de bioactivité le plus important. De nombreuses études cliniques utilisant des BCP ont prouvé leur efficacité (Garrido *et al.* 2011). La porosité est ainsi le paramètre structural le plus important dans le cas des matrices phosphocalciques à destination de la régénération osseuse, dont nous avons vu que les concavités macroporeuses peuvent participer non seulement à l'adhésion massive de cellules mais également aider leur différenciation en lignée ostéoblastique, les rendant alors potentiellement ostéoinducteurs. Les mécanismes de dissolution-précipitation à la surface des BCP jouent un rôle primordial dans leur bioactivité, leur résorption se faisant au profit de l'os néoformé sans perte de volume. Les nouveaux granules creux développés pendant ce doctorat en sont une parfaite illustration, avec l'avantage de pouvoir porter et protéger les cellules de contraintes tribologiques inhérentes à des morphologies plus classiques comme les granules ronds. Cette caractéristique spécifique alliée à la finesse des parois microporeuses favorisant la résorption ostéoclastique et la pénétration des fluides biologiques riches en protéines de signalisation intercellulaire (comme les facteurs de croissance), font des granules creux de sérieux candidats pour leur intégration au projet de thérapie génique GAMBA. Néanmoins un des inconvénients des céramiques phosphocalciques sous forme de granules est le manque de praticité lors de l'intervention chirurgicale avec des granules pouvant s'effriter, tomber et se concentrer au même endroit par effet de gravité. C'est pourquoi le développement de matériaux composites injectables, grâce aux propriétés rhéologiques uniques des hydrogels notamment, constitue un des enjeux pour l'avenir des matrices à destination de l'ingénierie tissulaire osseuse. De plus l'arrivée des techniques mini-invasives et percutanées conforte ce besoin d'injectabilité et de malléabilité des matrices ainsi plus biofonctionnelles. Enfin le développement de matrices fibreuses par électrospinning intégrant justement ces nouveaux granules de BCP creux permet de mimer l'architecture tridimensionnelle de la matrice extracellulaire collagénique offrant une porosité inter- et intra-fibres, de multiplier les points focaux d'adhésion des cellules et de favoriser l'ostéoconduction et l'ostéoinduction par la présence de granules creux porteurs et protecteurs de cellules. La combinaison de fibres de PLDLLA biorésorbables et bioinertes et des BCP également biorésorbables et fortement bioactifs, tous deux sans iatrogénie propre, ouvre la voie des biomatériaux intelligents par leur biomimétisme capable de guider les cellules et d'induire leur changement de phénotype (Hench et Thompson 2010). Résident toujours les questions éthiques à utiliser les cellules souches, en particulier embryonnaires, qui se sont posées dès la naissance de l'ingénierie tissulaire (Freedman 1987). Egalement se posent les questions de risques pour la santé à long terme notamment concernant le projet GAMBA utilisant des nanoparticules magnétiques ou encore à propos des dérives oncogéniques possibles des cellules souches dont on force la différenciation à l'aide de facteurs de croissance ou d'autres stimuli issus des plus hautes technologies actuelles ne pouvant encore bénéficier d'un recul scientifique et clinique suffisant pour en apprécier les tenants et les aboutissants.

GLOSSAIRE

Absorption : en physique et en chimie, l'absorption, est le processus par lequel des molécules de gaz ou de liquide mis en contact avec un matériau solide s'incorporent dans la totalité de son volume.

Adénovirus : La famille des adénovirus regroupe une centaine de variétés, dont une quarantaine environ peut infecter l'Homme. Le pouvoir pathogène des adénovirus s'exerce principalement sur l'appareil respiratoire.

ADN : L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme.

ADN complémentaire (ADNc) : L'ADN complémentaire (ou ADNc, Acide désoxyribonucléique complémentaire) est un simple brin artificiellement synthétisé à partir d'un ARNm, représentant ainsi la partie codante de la région du génome ayant été transcrit en cet ARNm.

Adsorption : processus résultant en une accumulation nette d'une substance. l'interface entre deux phases contigus, selon un arrangement en deux dimensions.

Aliphatique : En chimie organique, un composé aliphatique est un composé organique (carboné) acyclique ou cyclique, linéaire ou branché, saturé ou insaturé, à l'exclusion des composés aromatiques.

Allogreffe : Elles concernent les cas où donneur et receveur font partie de la même espèce biologique mais, étant deux individus distincts.

Alloplastique : se dit d'un matériau synthétique. On parlera de greffe alloplastique lors d'implantation de biomatériaux synthétiques.

Allotropie : L'allotropie est, en chimie, en minéralogie et en science des matériaux, la faculté de certains corps simples d'exister sous plusieurs formes cristallines ou moléculaires différentes.

Anastomose : en biologie cellulaire, une anastomose du noyau avec le réticulum endoplasmique décrit le fait que la membrane externe du noyau peut fixer les ribosomes.

Angiogenèse: processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants.

Anisotropie (contraire d'isotropie) : propriété d'être dépendant de la direction. Quelque chose d'anisotrope pourra présenter différentes caractéristiques selon son orientation.

Apatitique : La structure apatitique a pour formule générique : $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$ avec Me: cation métallique, XO_4 : groupement anionique, Y: anion. La structure apatitique résulte d'un agencement tridimensionnel de tétraèdres XO_4 dont la cohésion est assurée par les cations Me.

Apposition osseuse : Les cellules ostéoblastiques ont une activité d'apposition osseuse en produisant un os tissé. L'apposition osseuse se continue de manière centrifuge (depuis la surface de l'implant en direction de l'os originel) et centripète (depuis l'os originel en direction de la surface implantaire), afin d'assurer une immobilisation de l'implant dans la structure osseuse.

Arthrose : L'arthrose est une maladie qui touche les articulations. Au niveau de l'articulation, la surface du cartilage se fissure, s'effrite et finit par disparaître. Ensuite, des excroissances osseuses se forment et nuisent aux mouvements.

Autocrine : Le terme autocrine qualifie un messenger chimique (hormone, cytokine...) qui agit sur la cellule même qui l'a produit.

Autogreffe : Une autogreffe est une greffe où donneur et receveur sont la même personne.

Biocharge : la biocharge est normalement définie comme le nombre de bactéries vivantes sur une surface qui n'a pas été stérilisé.

Biomatériau: Une définition unique pour les biomatériaux est difficile à trouver, mais voici les deux définitions les plus couramment admises :

- « matières destinées à l'interface avec les systèmes biologiques pour évaluer, traiter, améliorer ou remplacer n'importe quel tissu, organe ou une fonction du corps" (Le Dictionnaire Williams des biomatériaux, Liverpool University Press, Liverpool, 1999).
- Les conférences de consensus de Chester (Royaume-Uni, 1986, 1991) ont proposé la définition suivante : « matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle »

Biomimétique : Le terme 'biomimétisme' est un néologisme qui s'applique à la réalisation d'opérations technologiques, de matériaux et/ou de systèmes artificiels basés sur des structures, des mécanismes ou des fonctions imitant à une échelle quelconque ceux rencontrés dans un organisme vivant.

Biopolymères : polymères issues du vivant (ce sont des cas particuliers de biomolécules).

Biotolérance: un biomatériau biotolééré se dit lorsque ce dernier induit une encapsulation fibreuse l'isolant de l'environnement où il a été implanté.

Calcémie : est un terme médical correspondant au taux plasmatique de calcium.

Canal de Havers : Conduit longitudinal central de l'ostéon, renfermant des vaisseaux sanguins et des nerfs.

Canal médullaire : Cavité centrale cylindrique de l'os contenant la moelle osseuse. Ce canal renferme la moelle jaune qui est riche en graisses.

Canaux de Volkmann : Conduits transversaux de l'os compact renfermant des vaisseaux sanguins et des nerfs, reliant les canaux de Havers entre eux, avec le canal médullaire et le périoste.

Cartilage articulaire: Tissu élastique, lisse et résistant recouvrant l'extrémité d'un os à l'endroit où il s'articule avec un autre os : il facilite le mouvement et amortit les chocs.

Cellules somatiques : Les cellules somatiques, ou soma, sont toutes les cellules animales (uniquement chez les bilatériens) qui ne seront jamais à l'origine de gamètes (spermatozoïdes et ovules). Ces cellules n'étant pas des cellules germinales (à l'origine des gamètes), elles ne transmettront pas à leur descendance les mutations qu'elles ont pu subir.

Compression Isostatique : Une compression isostatique est l'exercice d'une pression isotrope, c'est-à-dire qui a la même valeur dans toutes les directions.

Couche de passivation: couche d'oxyde de surface protégeant le matériau de la corrosion.

Cytotoxicité : La cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

Défaut de taille critique : Défaut dont la taille dépasse le seuil de possibilité de régénération par le processus de remodelage osseux naturel.

Dextrane : Le dextrane est un polymère ramifié de dextrose (glucose) de masse moléculaire très élevée, appartenant au groupe des colloïdes. Il est obtenu à partir de l'action enzymatique de bactéries sur le saccharose.

Différentiation cellulaire : concept de biologie du développement décrivant le processus par lequel les cellules se spécialisent en lignée cellulaire.

Dispositif médical implantable : « tout dispositif médical actif qui est conçu pour être implanté en totalité ou en partie, par une intervention chirurgicale ou médicale, dans le corps humain ou, par une intervention médicale, dans un orifice naturel et qui est destiné à rester après l'intervention ».

Énantiomère : Des énantiomères sont des molécules isomères images l'une de l'autre dans un miroir, mais non-superposables. Une molécule ayant deux énantiomères est dite chirale.

Énergie de surface : À la surface d'un milieu dense (liquide ou solide) ou à l'interface entre deux milieux denses, la matière n'est pas, localement, rigoureusement dans le même état. Ce nouvel état local a une énergie légèrement supérieure. À la surface ou interface est donc associée une certaine énergie par unité de surface (exprimée en joules par mètres carrés - J/m²) dont l'origine est la force de cohésion entre molécules identiques.

Épitaxie: L'épitaxie est une croissance orientée, l'un par rapport à l'autre, de deux cristaux possédant un certain nombre d'éléments de symétrie communs dans leurs réseaux cristallins. On parle d'hétéroépitaxie lorsque ces réseaux cristallins sont différents.

Fibrine : La fibrine est une protéine filamenteuse issue du fibrinogène sous l'action de la thrombine lors de la coagulation sanguine. Il s'agit d'une des matières albuminoïdes du sang, qui en contient normalement 2 à 4 %.

Forces de Coulomb : désignent les forces de l'interaction électrique entre deux particules chargées électriquement. Elles sont régies par la loi de Coulomb « L'intensité de la force électrostatique entre deux charges électriques est proportionnelle au produit des deux charges et est inversement proportionnelle au carré de la distance entre les deux charges ».

Frittage : procédé de fabrication de pièces consistant à chauffer une poudre sans la mener jusqu'à la fusion. Sous l'effet de la chaleur, les grains se soudent entre eux, ce qui forme la cohésion de la pièce.

Hormones : substances chimiques secrétées par une cellule endocrine, agissant à distance et par voie sanguine sur des récepteurs spécifiques situés sur la membrane d'une cellule cible. Elles transmettent un message chimique, ce qui leur confère le nom de "messagers chimiques".

Immunogène : Est dite immunogène une substance douée du pouvoir de provoquer une réaction immunitaire.

Ingénierie tissulaire : L'ingénierie tissulaire est une des sciences du domaine de la médecine régénérative visant à développer des substituts biologiques en vue de restaurer, maintenir ou améliorer une fonction tissulaire biologique.

Inversion remodelage osseux : remplacement des ostéoclastes par des cellules mononuclées de type macrophagiques qui vont lisser le fond de la lacune.

Lamelles concentriques : Feuilletts osseux de l'ostéon faits de fibres de collagène, disposés de façon concentrique autour du canal de Havers et se formant lors de la croissance des os.

Macrophage : Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes.

Matrice extracellulaire : désigne l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif et des autres tissus. Elle est constituée en grande partie de glycoprotéines et de protéines pures, ainsi que de glycosaminoglycanes.

Médecine régénérative : La médecine régénérative a pour objectif de créer des tissus vivants fonctionnels permettant de remplacer des tissus ou des organes endommagés ou de remédier à des maladies congénitales. La régénération peut se faire in situ par la stimulation des organes endommagés ou en laboratoire (une avancée majeure pour les problématiques du don d'organe). L'utilisation des cellules souches est un élément majeur de la médecine régénérative.

Médullaire : au sein d'un organe, zone située plus à l'intérieur que son cortex, et en général en contact avec le cortex.

Microtomographie : la microtomographie aux rayons X est une technique de tomographie non-destructrice utilisée pour retranscrire une image en trois dimensions d'un échantillon.

Molécule chirale : Une molécule est dite chirale si elle n'est pas superposable à son image dans un miroir.

Morbidité : état maladif, dans le cas d'une greffe on parlera de morbidité induite de l'organe prélevé ou du site de prélèvement post-opération.

Oncologie : L'oncologie ou carcinologie ou cancérologie est la spécialité médicale d'étude, de diagnostic et de traitement des cancers.

Os pariétal : L'os pariétal est un os pair, plat, participant à la formation de la voûte du crâne.

Ostéoblaste : Les ostéoblastes sont les cellules qui synthétisent la partie non-minérale des os (ostéoïde) et participent ensuite à la minéralisation de cette matrice extracellulaire.

Ostéochondroprogénitrices : se dit des cellules non différenciées capables de se différencier en lignée de cellules ostéoformatrices (lignée ostéoblastique) et en lignée de cellules chondroformatrice (lignée chondroblastique).

Ostéoclaste : Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse.

Ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact de ce matériau.

Ostéogénèse : processus par lequel s'élabore le tissu osseux. Elle peut être de trois types, ossification membraneuse ou périostique, ossification enchondrale (enchondrale) ou cartilagineuse, ossification en milieu conjonctif, plus rare.

Ostéoinduction : capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable.

Ostéointégration : connexion structurelle et fonctionnelle directe entre l'os vivant et la surface d'un implant artificiel. Le terme provient du grec osteon (os) et du latin integrare (intégrer).

Ostéoporose : L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une fragilité excessive du squelette, due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de la microarchitecture osseuse.

Ostéon : Structure cylindrique élémentaire de l'os compact, constituée de 4 à 20 lamelles osseuses concentriques entourant le canal de Havers.

Ostéosarcome : Un ostéosarcome (sarcome ostéogène) est la plus courante des tumeurs malignes osseuses primaires.

Paracrine : Une régulation est dite paracrine quand elle fait intervenir des signaux échangés par des cellules voisines.

Périoste : Membrane fibreuse riche en vaisseaux sanguins enveloppant l'os, à l'exception des surfaces articulaires, et contribuant notamment à sa croissance en épaisseur.

Plasmide : Un plasmide désigne en microbiologie ou en biologie moléculaire une molécule d'ADN surnuméraire distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome et non essentielle à la survie de cellule.

Polysaccharide : Les polysaccharides (parfois appelés glycanes, polyosides, polyholosides ou glucides complexes) sont des polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons O-osidiques.

Points focaux d'adhésion : En biologie cellulaire, les points d'adhésions focaux sont des types spécifiques d'assemblages macromoléculaires à travers lesquels les forces mécaniques et les signaux régulateurs sont transmises. Plus précisément, ils peuvent être considérés comme les macromolécules médiatrices des effets régulateurs (ancrage cellulaire, par exemple) de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules.

Potentiel Zêta : charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution.

Protéine sérique : Une protéine sérique est une protéine contenue dans le sérum (c'est-à-dire le liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation).

Quiescence : phase de repos, par exemple le temps durant lequel la cellule arrête de se diviser et sort du cycle cellulaire.

Sublimation : la sublimation est le passage d'un corps de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par l'état liquide.

Synchrotron : grand instrument électromagnétique destiné à l'accélération à haute énergie de particules élémentaires.

Thixotropie : La thixotropie est une propriété physique complexe que l'on retrouve dans certains gels, fluides ou mélanges renfermant des solides et qui a la particularité de pouvoir passer de l'état liquide à solide et de solide à liquide.

Thérapie génique : La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie.

Transfection : On appelle transfection le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, non-médié par un virus, par opposition à la transduction.

Trempe : La trempe est un traitement thermique consistant à chauffer un matériau constitué d'une phase au-dessus d'un point de transformation en vue d'obtenir une nouvelle phase puis de le refroidir selon une vitesse appropriée produisant une phase hors équilibre.

Xénogreffe : La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon (organe par exemple) où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur.

ANNEXES

Annexe 1 : Les normes des dispositifs médicaux implantables

Annexe 2 : Les diffractogrammes DRX et les spectrogrammes FTIR du panel d'échantillons commerciaux analysés

Annexe 3 : Les partenaires du consortium européen REBORNE

Annexe 4 : Les partenaires du consortium européen GAMBA

Annexe 5 : Les propriétés du gel hyaluronique de l'AO Foundation pour le projet GAMBA

Annexe 6 : Les méthodes d'activation génique sélectionnées pour le projet GAMBA

Annexe 7 : Protocole d'extraction d'ARN

Annexe 8 : Protocole de vérification de l'intégrité des ARN par puce

ANNEXE 1

Les normes des dispositifs médicaux implantables

La norme ISO 10993-12:2012 spécifie les exigences et fournit des directives relatives aux modes opératoires à suivre pour la préparation des échantillons et le choix des matériaux de référence dans le cadre d'essais relatifs aux dispositifs médicaux dans des systèmes biologiques, conformément à une ou plusieurs parties de l'ISO 10993. L'ISO 10993-12:2012 traite spécifiquement les points suivants:

- le choix des échantillons;
- le choix des parties représentatives d'un dispositif ;
- la préparation des échantillons;
- les contrôles expérimentaux;
- le choix des matériaux de référence et les exigences qui s'y rapportent;
- la préparation des extraits.

L'ISO 10993-12:2012 n'est pas applicable aux matériaux ou aux dispositifs contenant des cellules vivantes.

C'est la norme ISO 13022:2012 qui traite des exigences relatives aux pratiques de préparation et l'application du management du risque pour les dispositifs médicaux contenant des cellules viables d'origine humaine.

Cette ISO 13022 :2012 traite des risques liés aux composants cellulaires viables de produits réglementés comme des médicaments, des produits biologiques, dispositifs médicaux et dispositifs médicaux implantables actifs, ou des combinaisons de ceux-ci. Cette norme couvre les cellules humaines viables autologues ainsi que des matériaux d'origine humaine allogéniques, obtenues à partir de donneurs vivants ou décédés.

Pour les fabricants de produits médicaux contenant des cellules viables d'origine humaine, la norme ISO 13022 :2012 précise les procédures qui seront utilisées dans le traitement et la manipulation de ces cellules, ainsi que l'identification des dangers associés afin d'estimer et d'évaluer tout les risques et les contrôler. En outre, la norme explique comment surveiller l'efficacité de ces contrôles en fournissant les exigences et directives sur la gestion de ces risques.

Ces risques liés à l'utilisation des cellules viables d'origine humaines sont tels que :

- la contamination par des bactéries, des moisissures, des levures ou des parasites;
- la contamination par des virus;
- la contamination par des agents provoquant des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST);

- responsables de matières contaminantes indésirables pyrogènes, des réactions immunologiques ou toxicologiques;
- la décomposition causée par une manipulation inadéquate des produits et de la dégradation des produits;
- les risques liés au potentiel oncogène des types cellulaires utilisés;
- les complications physiologiques et anatomiques résultant de conséquences inattendues (ce qui inclut la migration non désirée des cellules, dégagement accidentel de substances biologiquement actives telles que les hormones et des cytokines, et des interactions indésirables entre les composants cellulaires et non cellulaires);
- l'échec de la traçabilité;
- les complications résultant d'une réaction immunogène non intentionnelle.

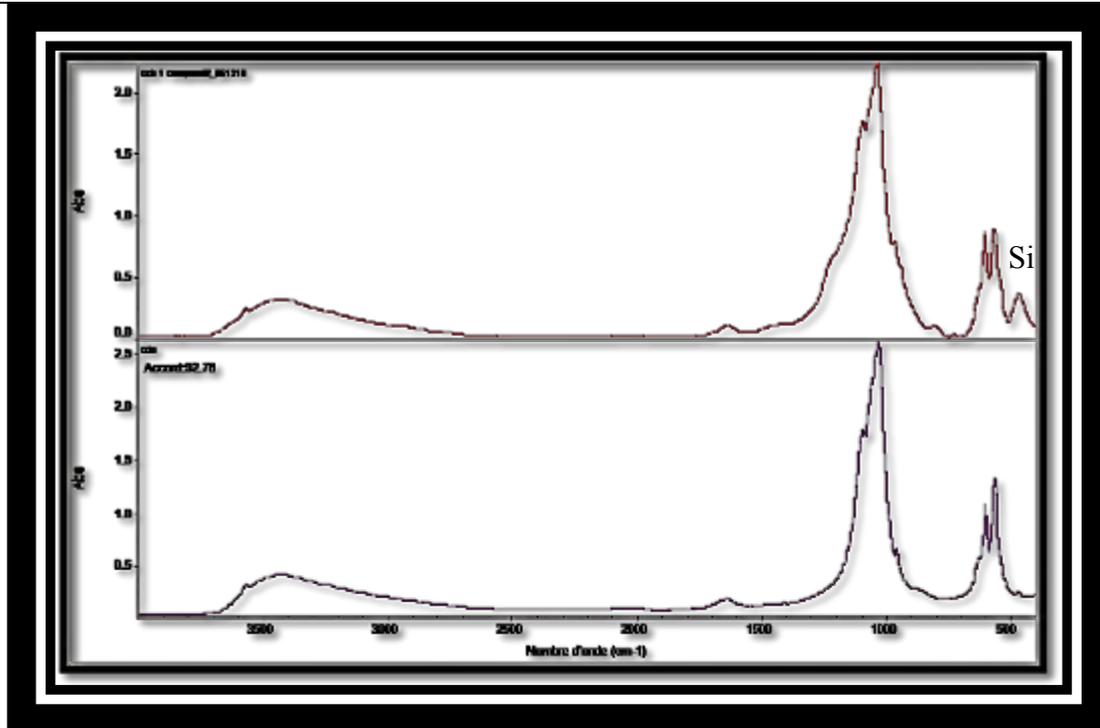
ANNEXE 2

Les diffractogrammes DRX et les spectrogrammes FTIR du panel d'échantillons commerciaux analysés

Spectre du haut : échantillon concerné

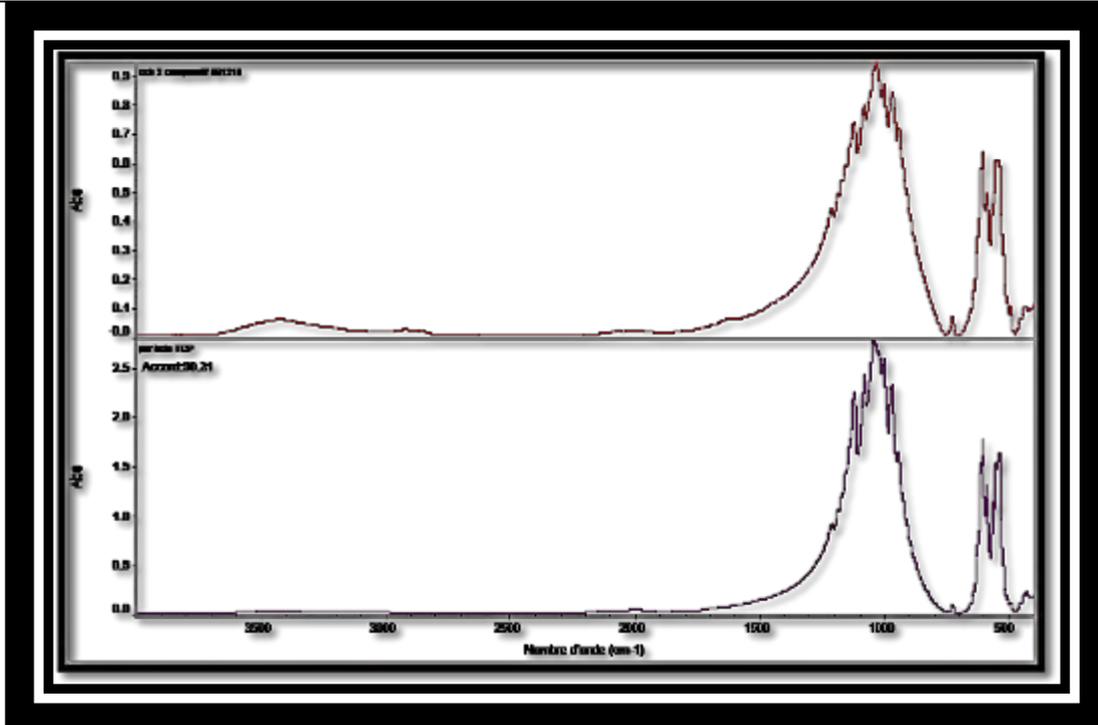
Spectre du bas : spectre de la base de données le plus approchant

1



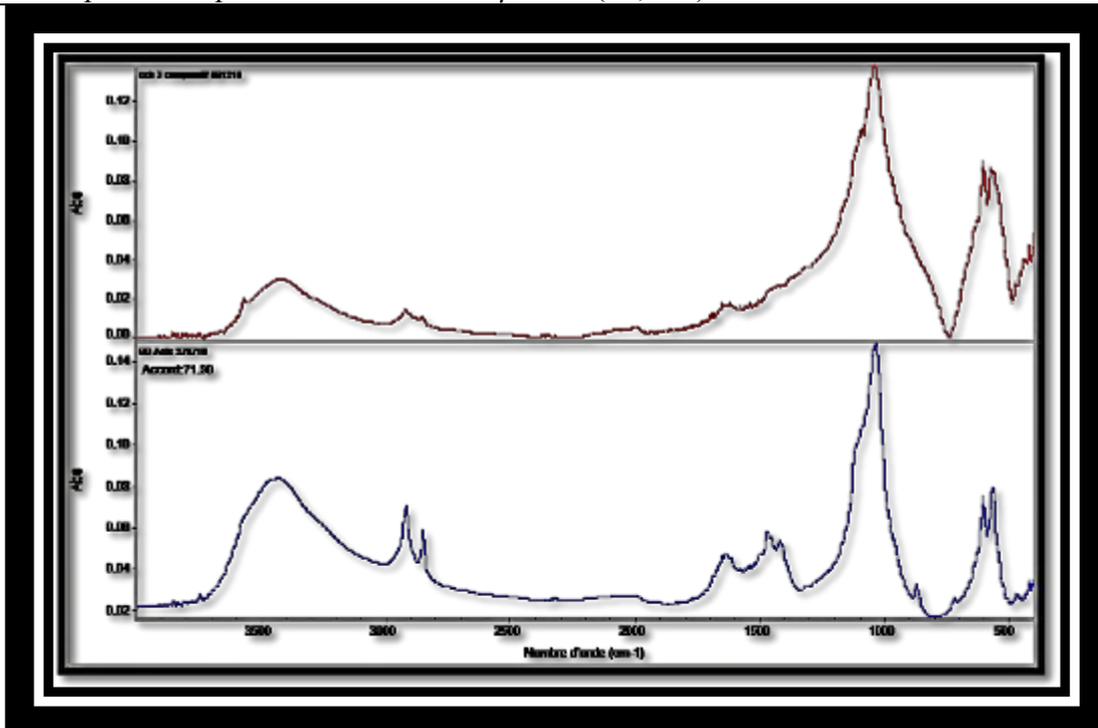
Correspondance prédominante avec le HA mal cristallisée (CDA) (92,8 %) + pics Silicium confondus (1100, 800 et 480 cm^{-1})

2



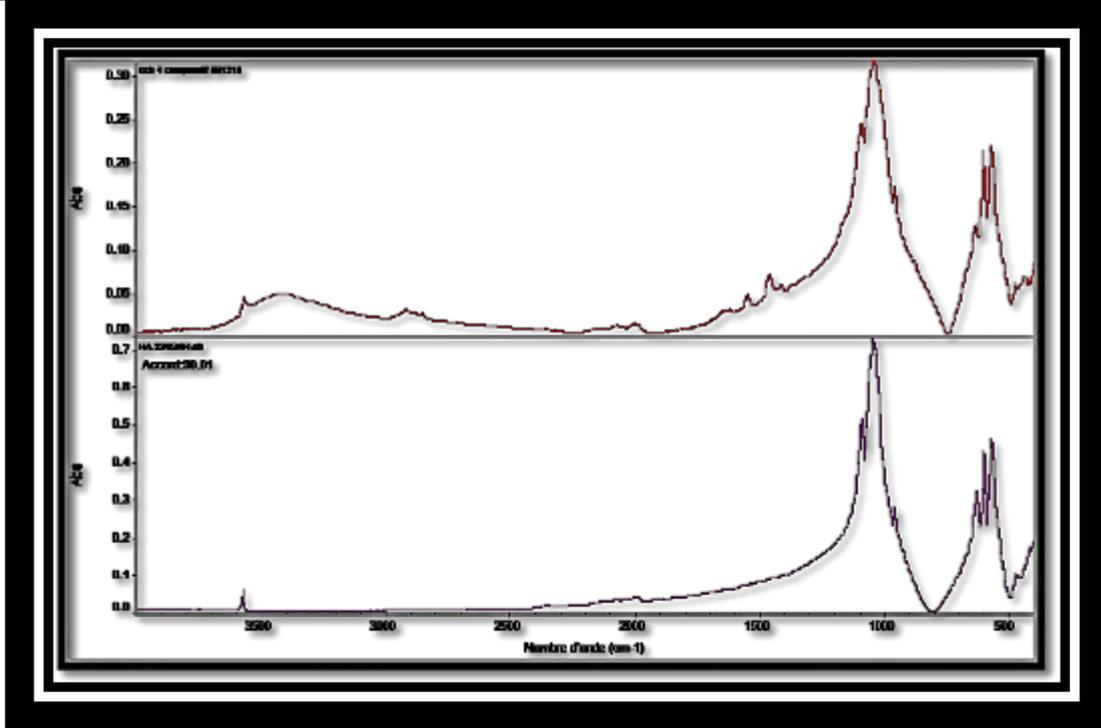
Correspondance prédominante avec le β -TCP (90,3 %)

3



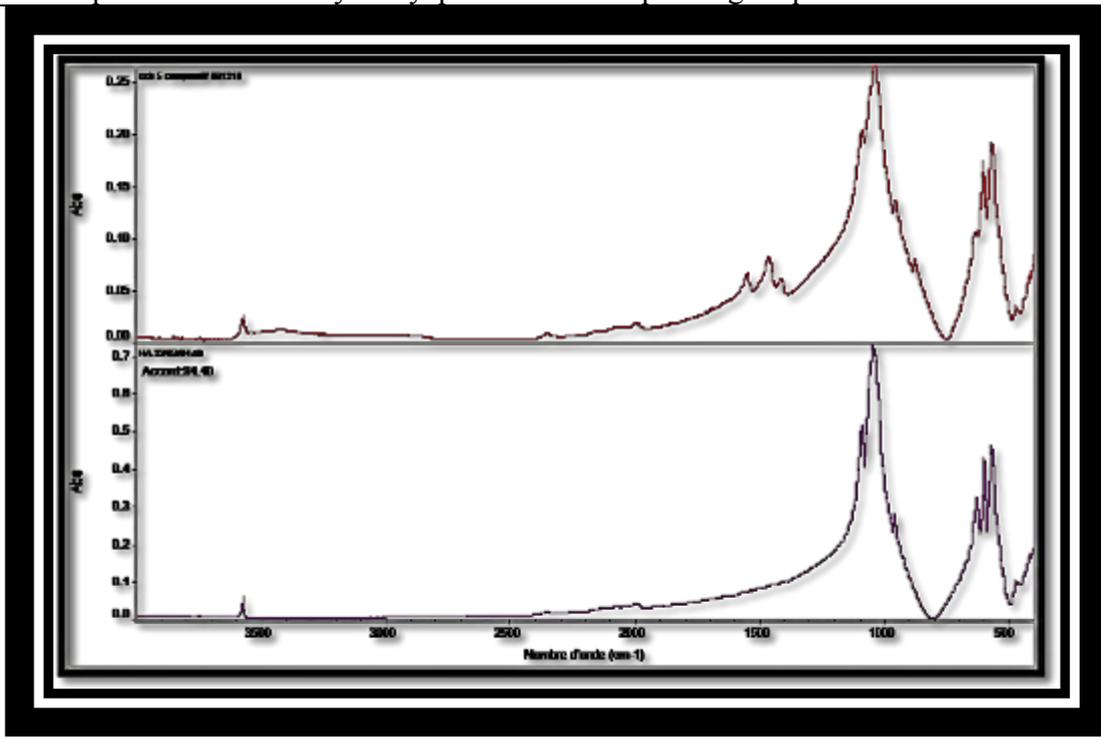
Correspondance avec l'os bovin (carbonates) + matières organiques hydratés

4



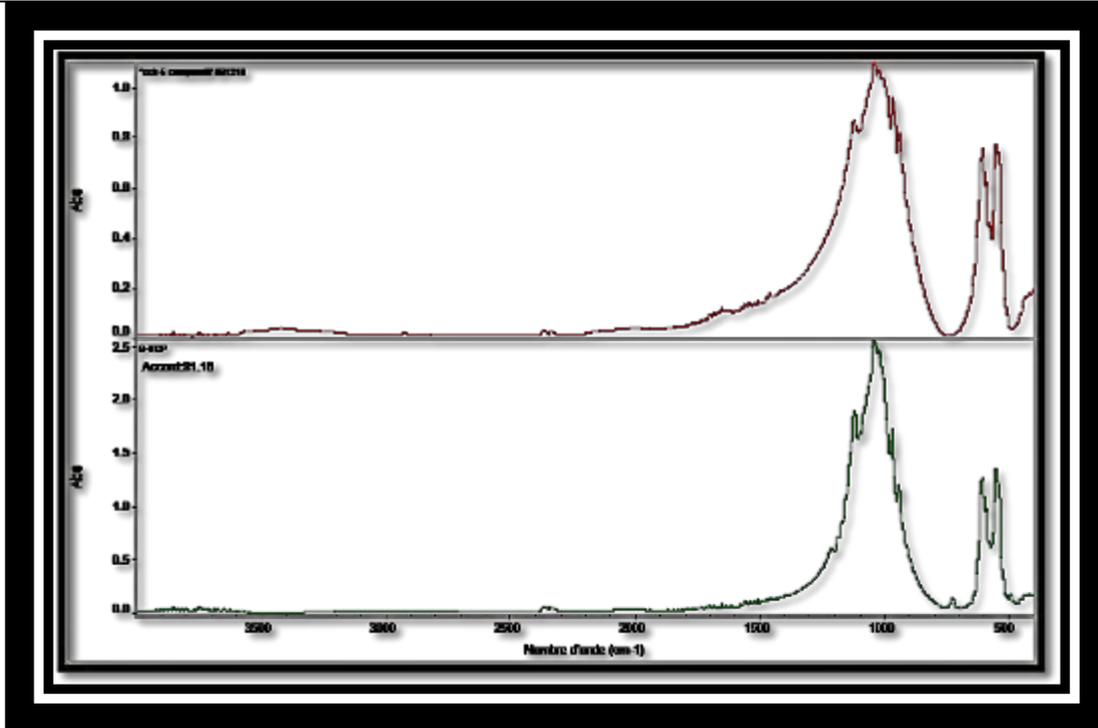
Correspondance avec l'Hydroxyapatite à 90 % + pics organiques et carbonates A et B

5



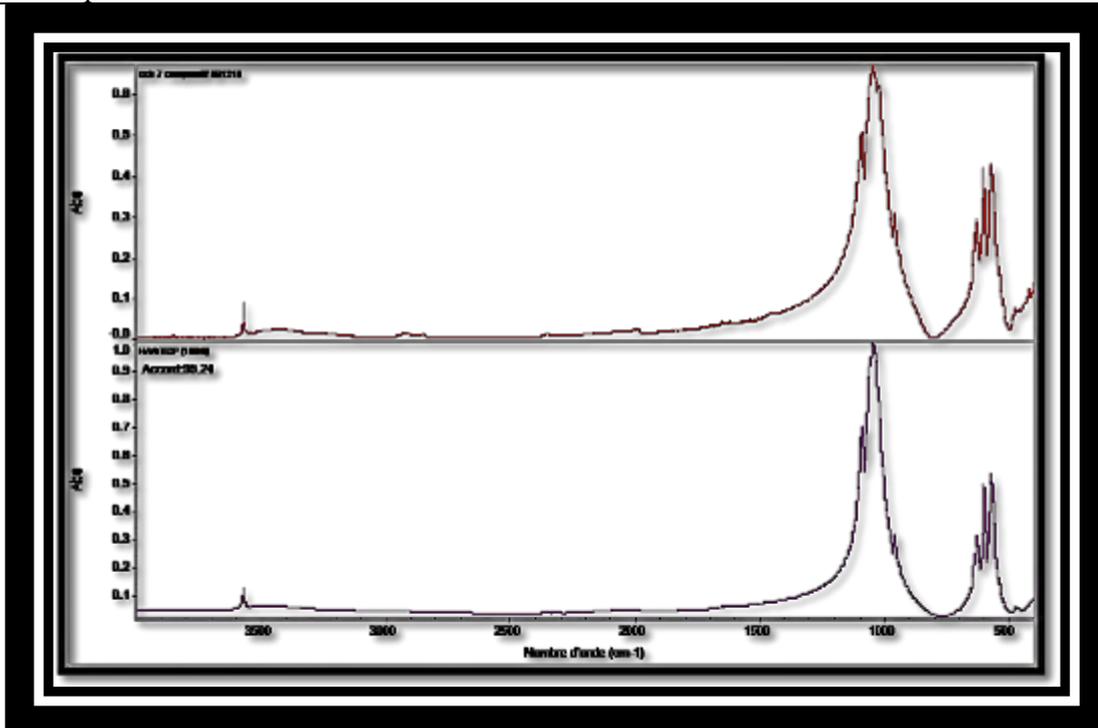
Correspondance Hydroxyapatite + carbonates types A et B

6



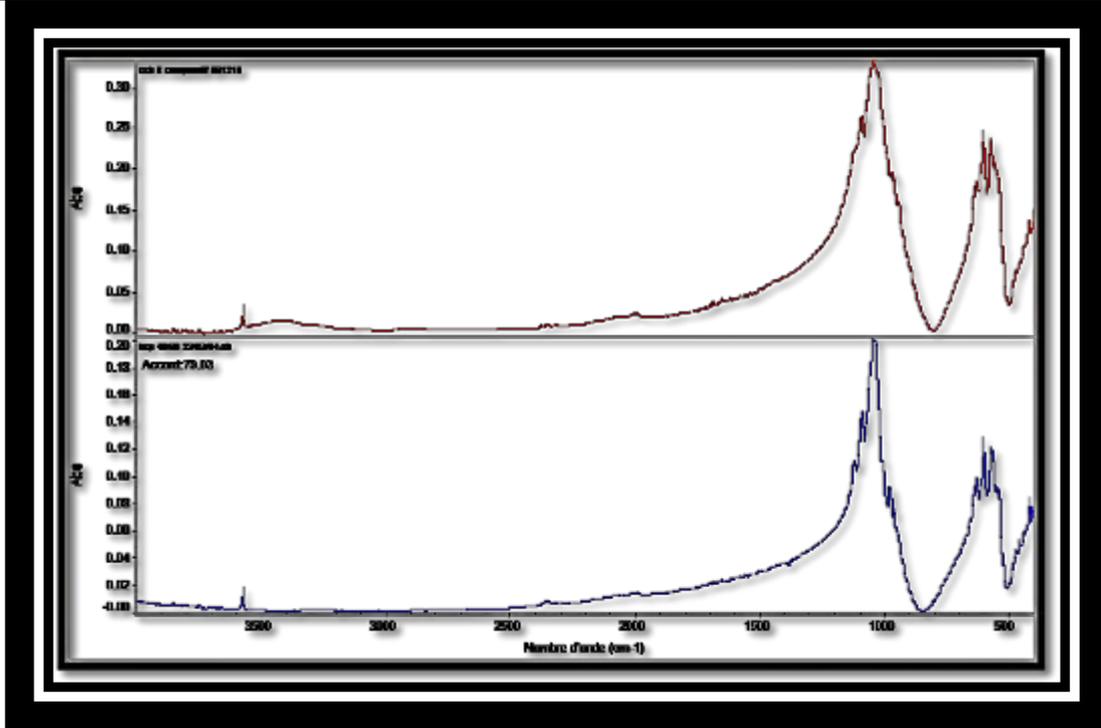
Correspondance avec le B-TCP à 81 %

7



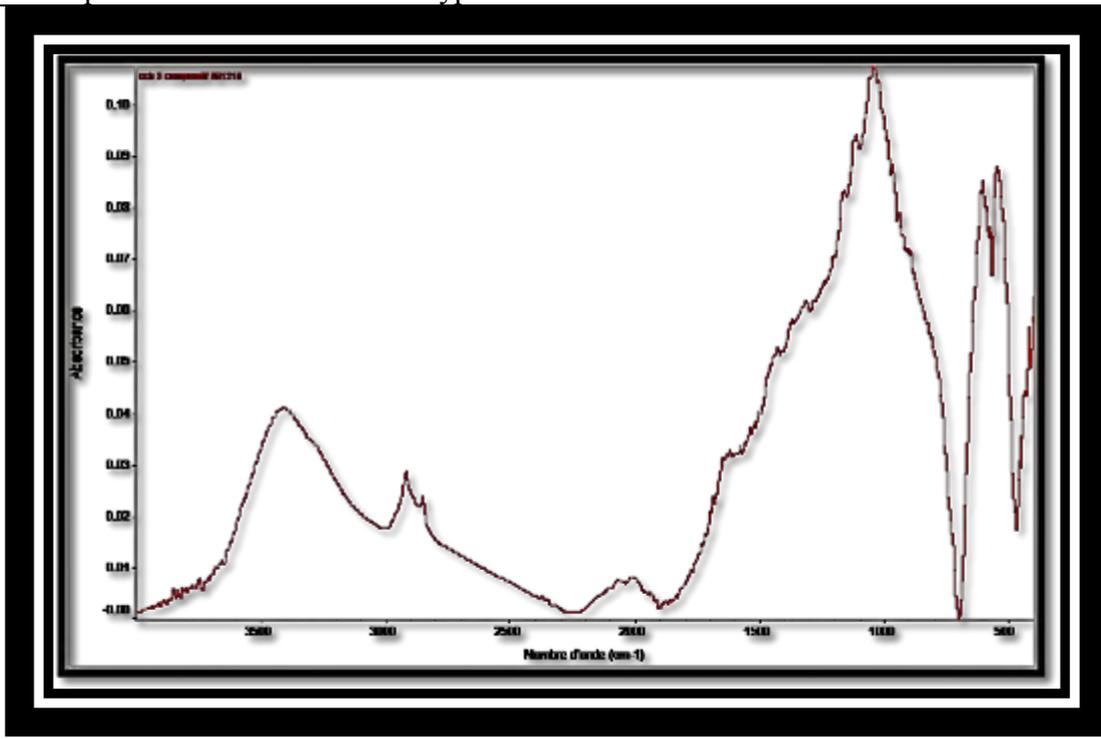
Correspondance avec HA pur fritté (haut degré de cristallisation)

8



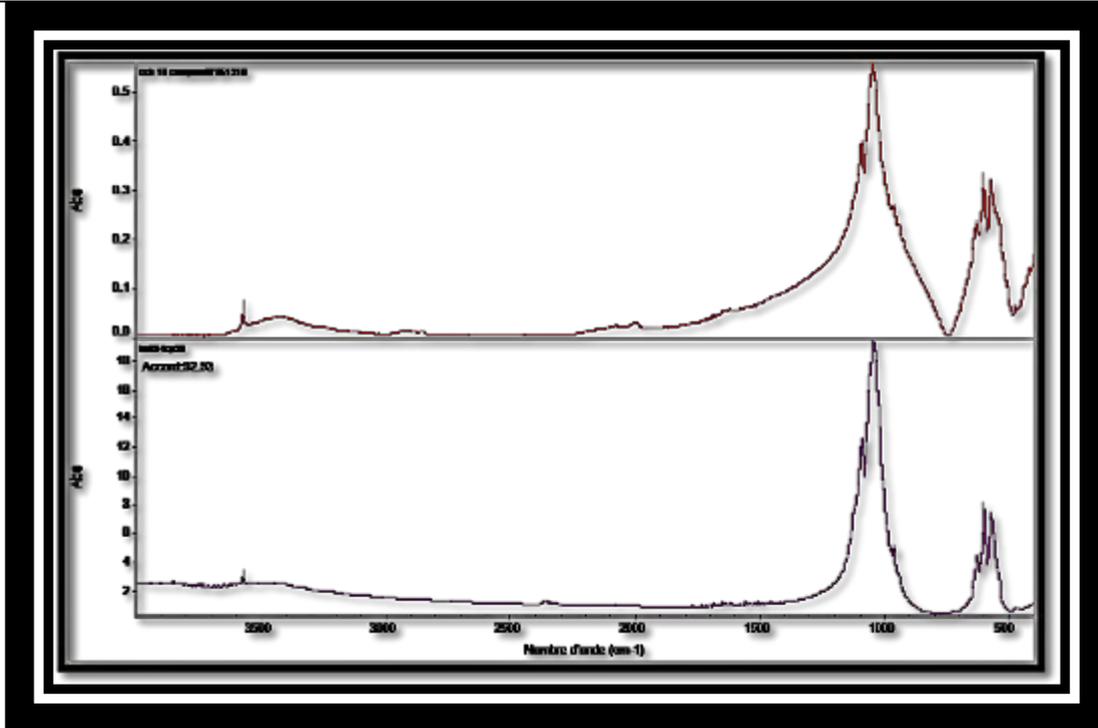
Correspondance avec un BCP de type HA > 60%

9



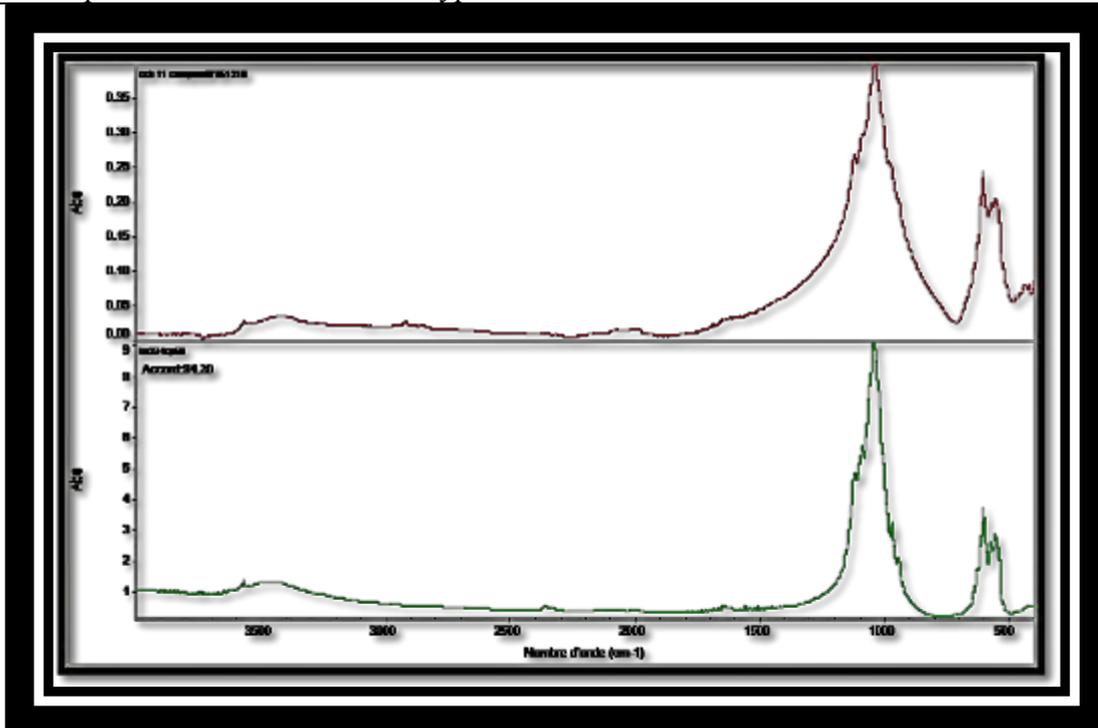
Correspondance prédominante avec le β -TCP + matières organiques hydratés

10



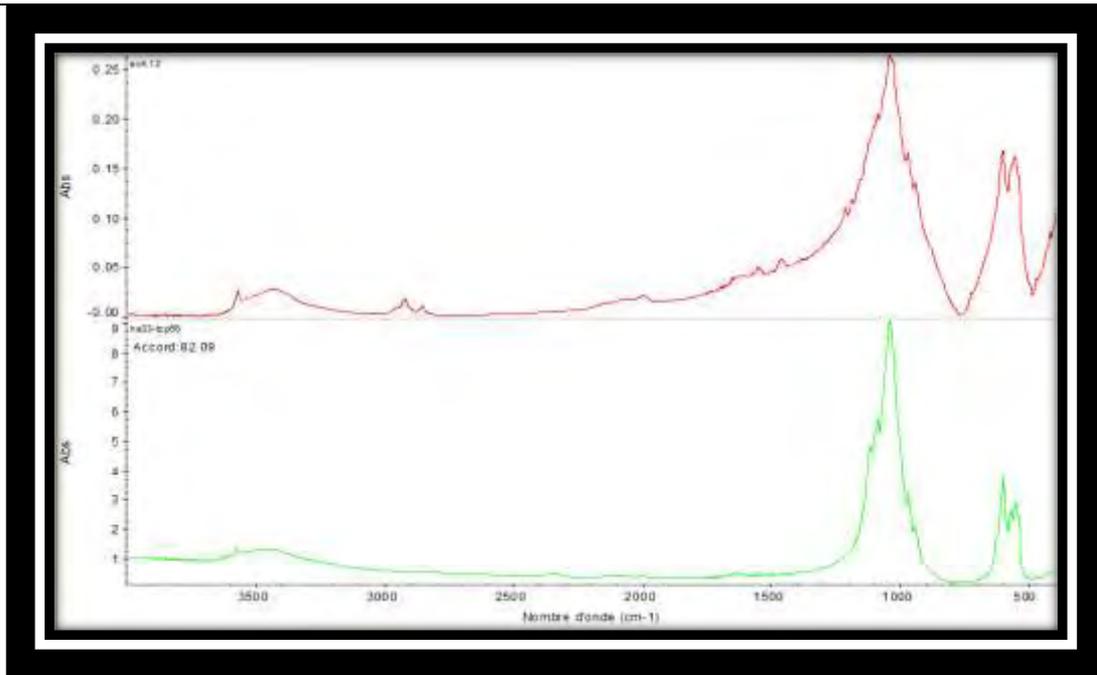
Correspondance avec un BCP de type HA > 60%

11



Correspondance avec un BCP de type HA < 40%

12

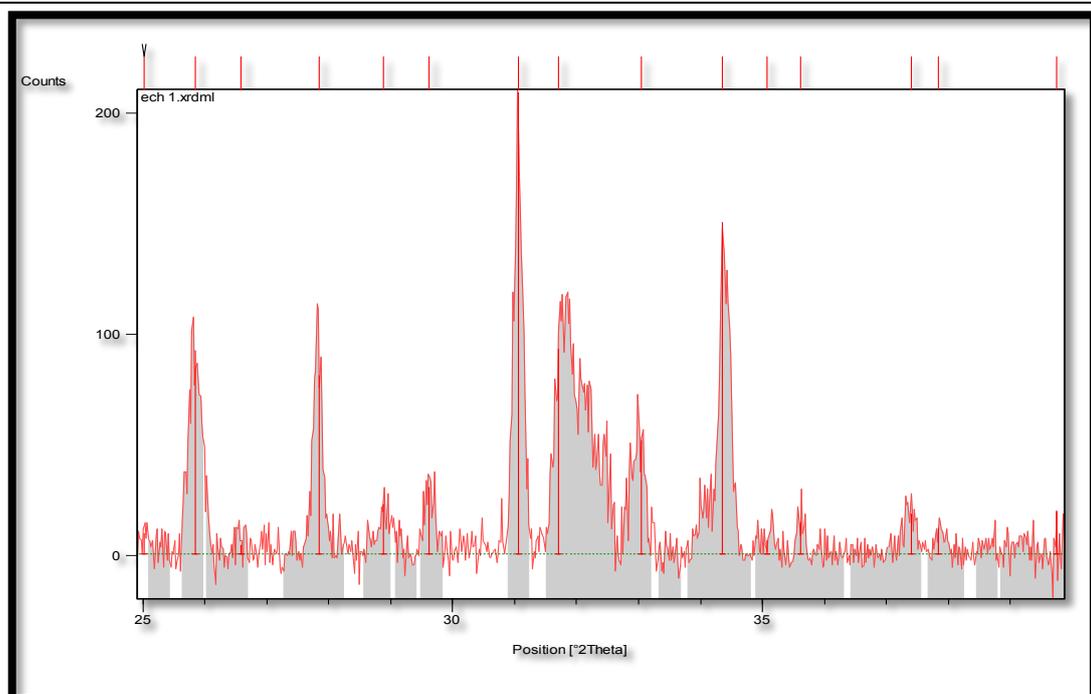


Correspondance avec un BCP de type HA < 40% + pics carbonates, traces organiques

Analyse des phases cristallines par DRX

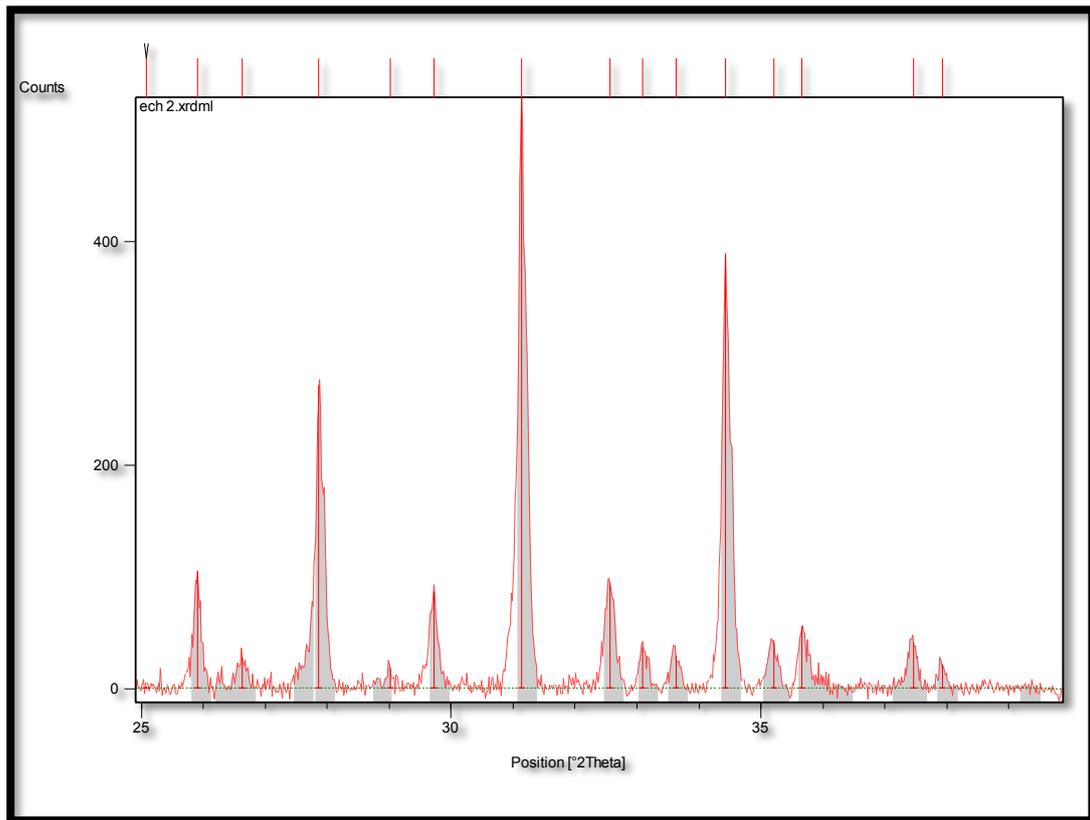
Méthodologie : Calcul du ratio HA/TCP en fonction de l'intensité des pics HA à 31.75° et TCP à 31.05°. L'erreur sur la mesure est considérée < 5%.

1



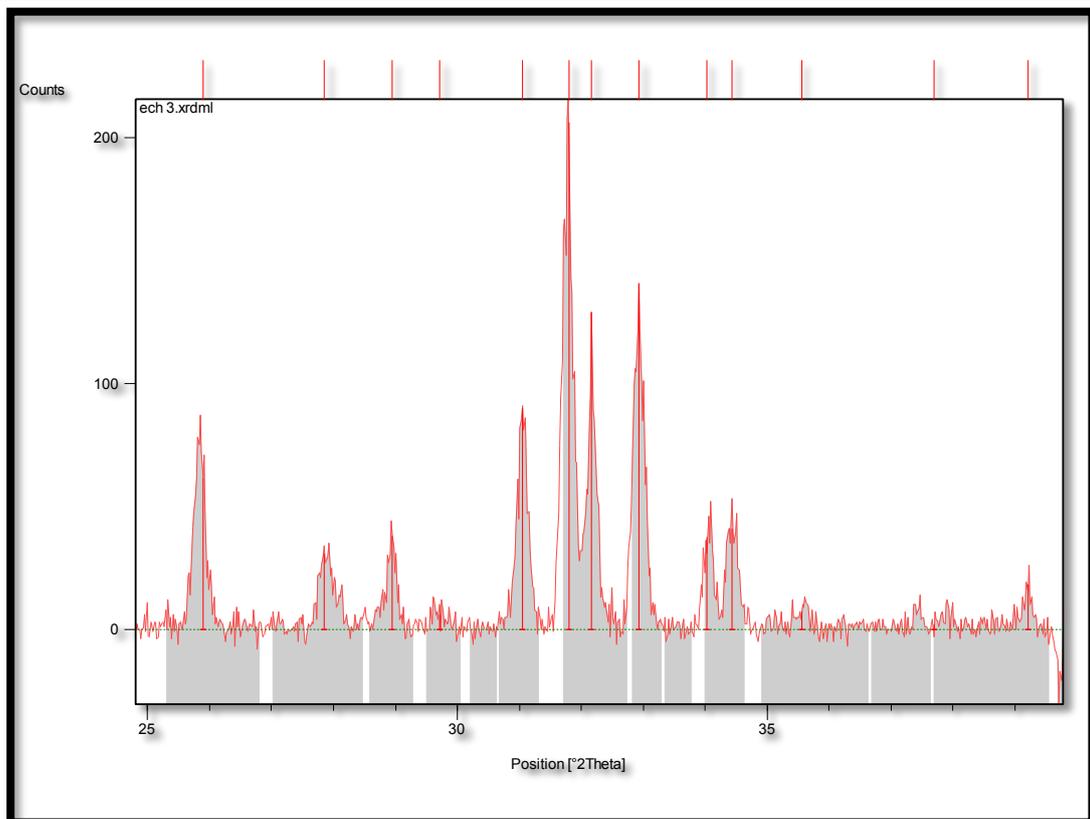
Ratio HA/TCP annoncé : -
Ratio HA/TCP mesuré : 30/70

2



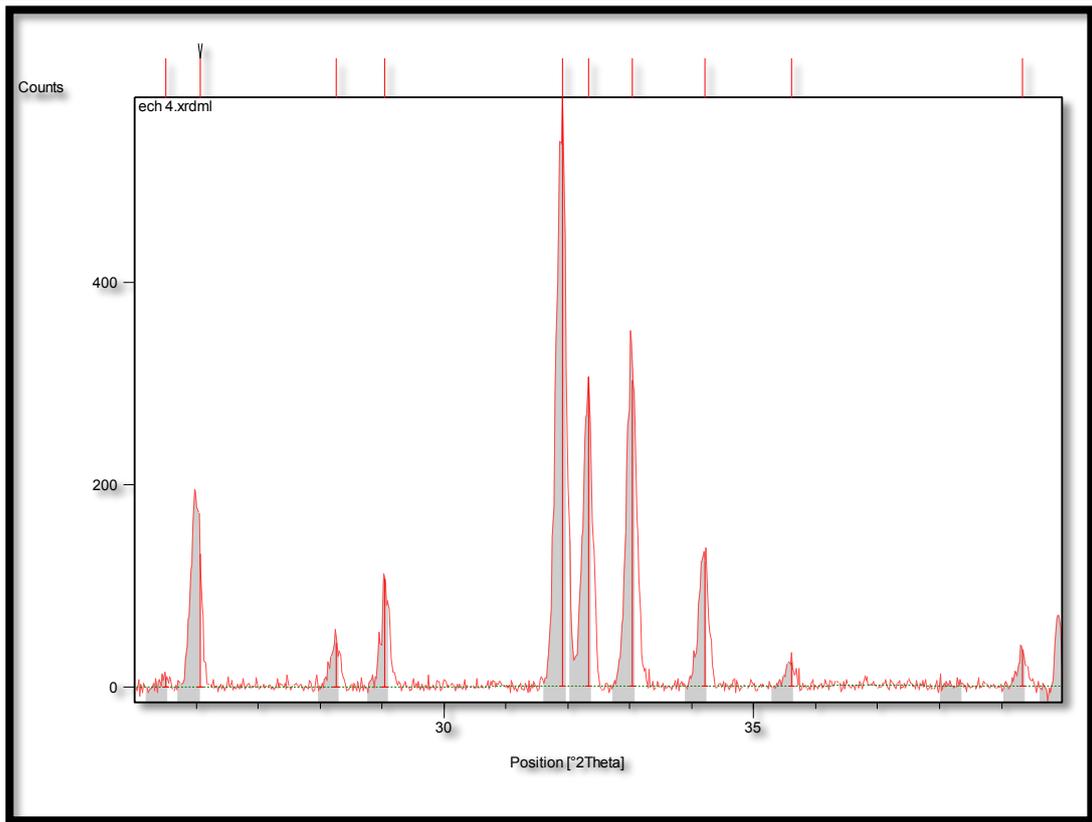
Ratio HA/TCP annoncé : 0/100
Ratio HA/TCP mesuré : 0/100

3



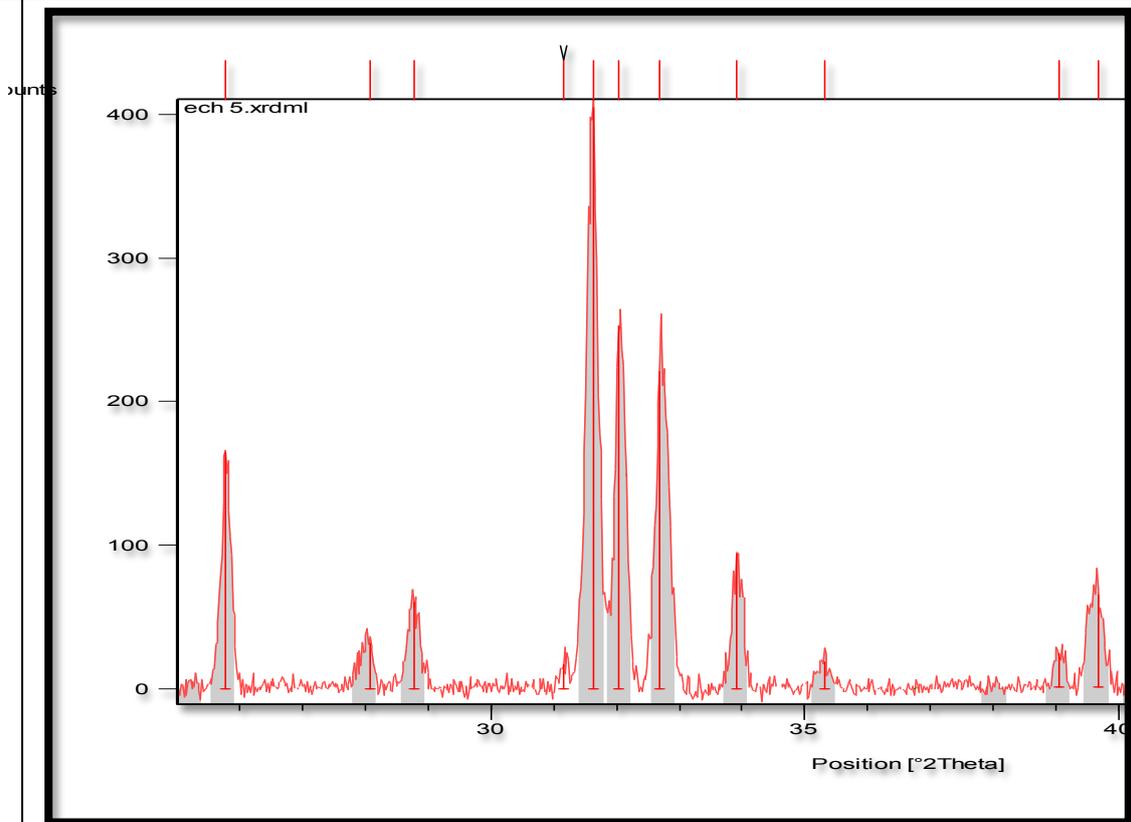
Ratio HA/TCP annoncé : -
Ratio HA/TCP mesuré : 70/30

4



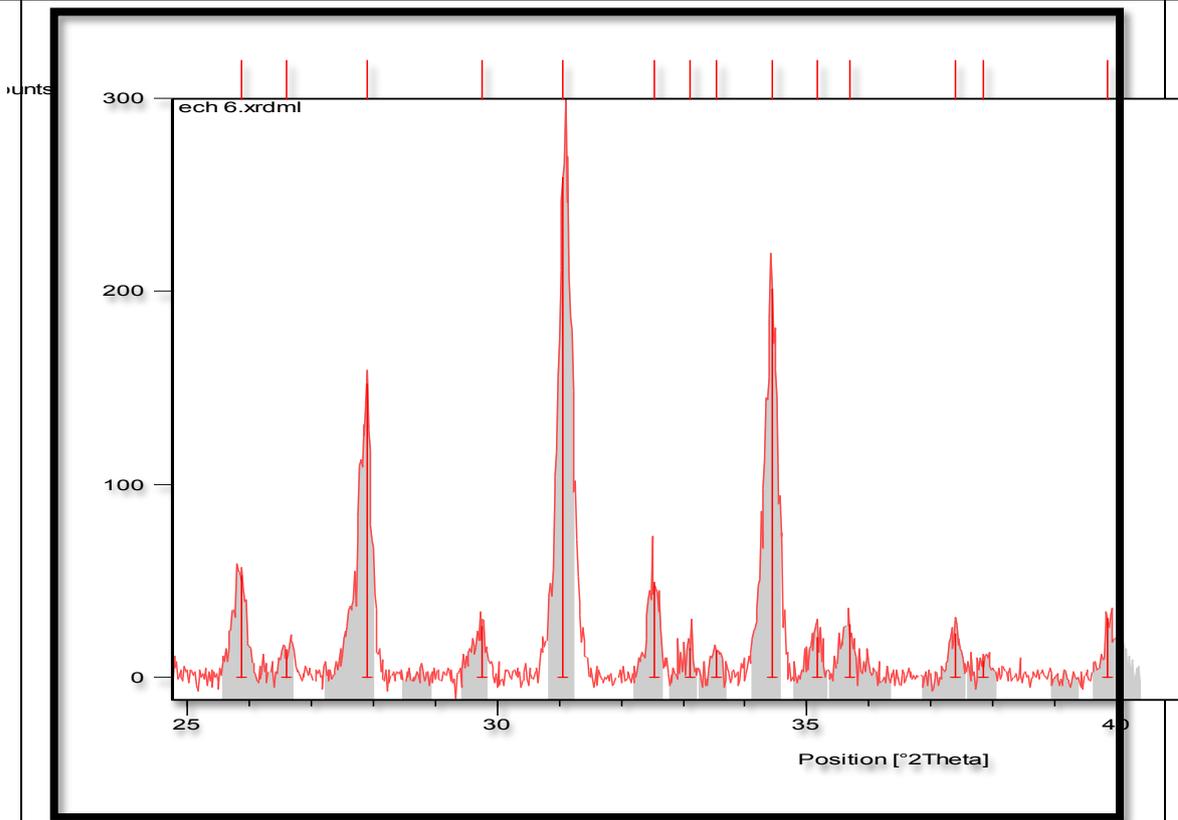
Ratio HA/TCP annoncé : 100/0
Ratio HA/TCP mesuré : 100/0

5



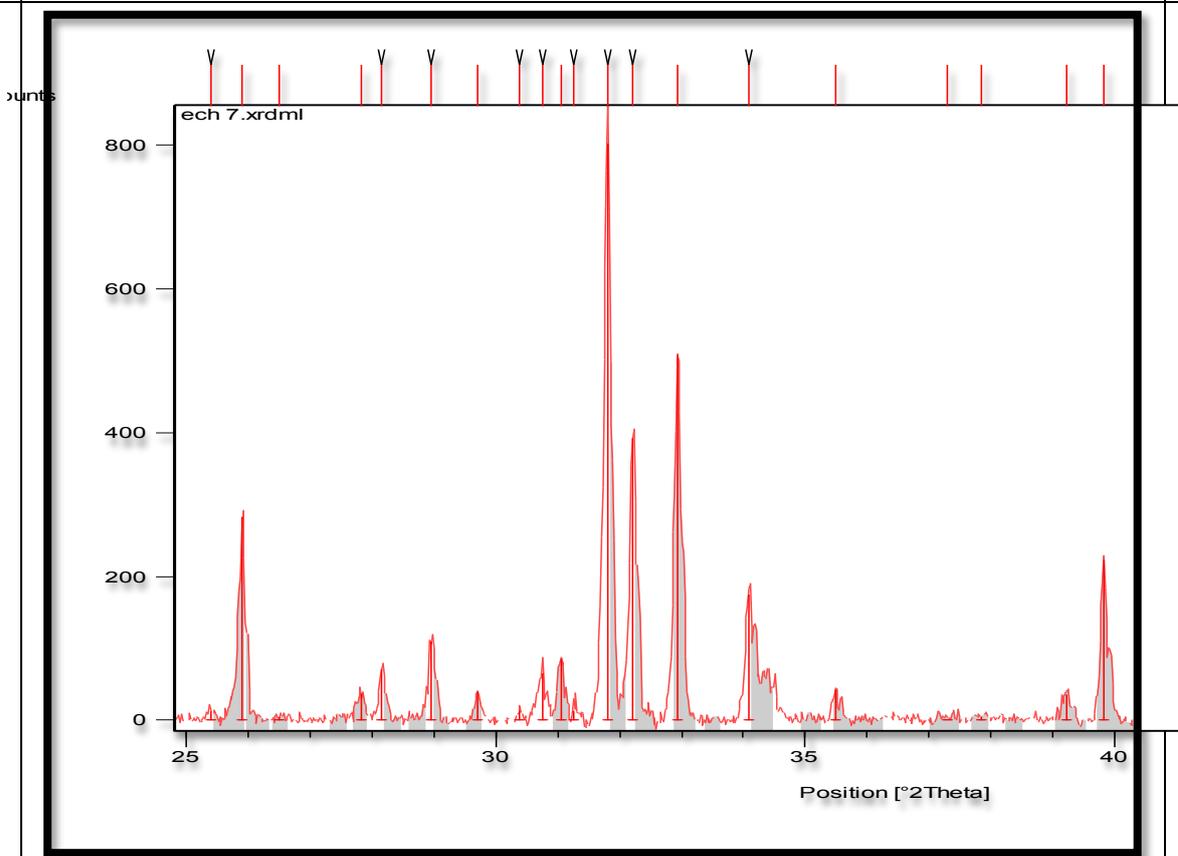
Ratio HA/TCP annoncé : 100/0
Ratio HA/TCP mesuré : 100/0

6



Ratio HA/TCP annoncé : 0/100
Ratio HA/TCP mesuré : 0/100

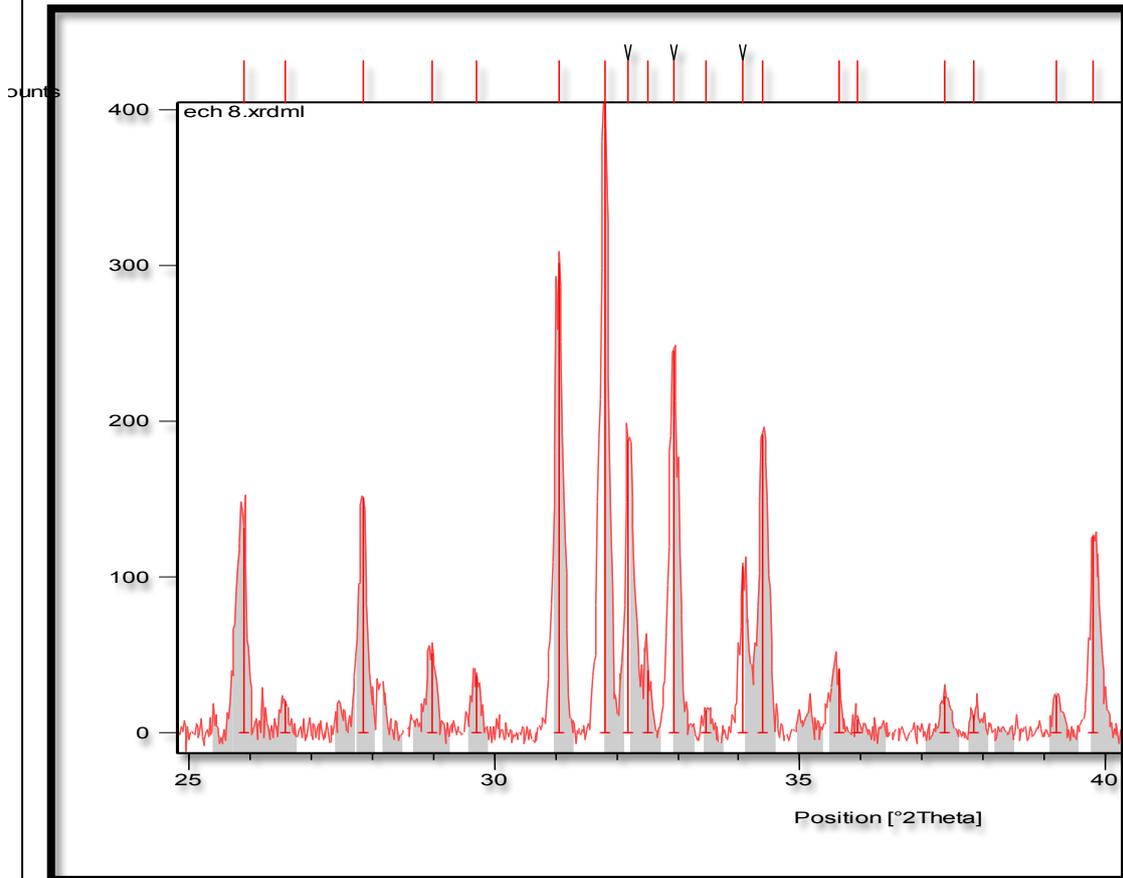
7



Ratio HA/TCP annoncé : 65/35

Ratio HA/TCP mesuré : 90/10

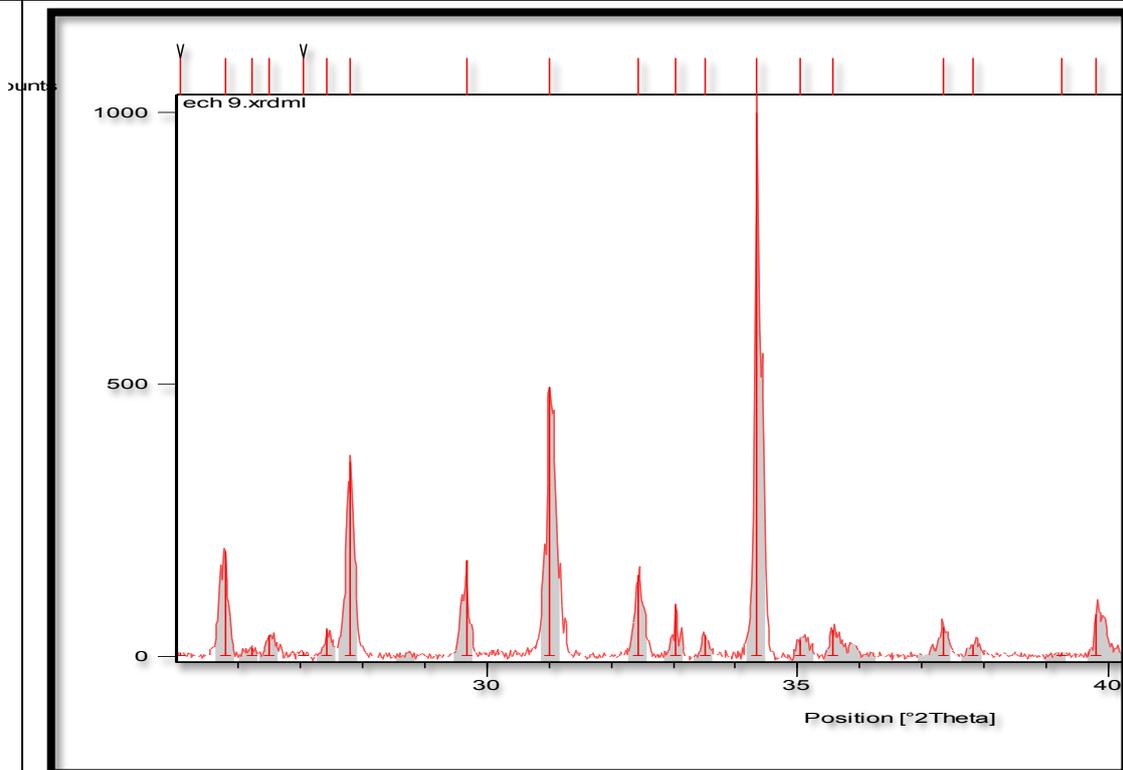
8



Ratio HA/TCP annoncé : 60/40

Ratio HA/TCP mesuré : 58/42

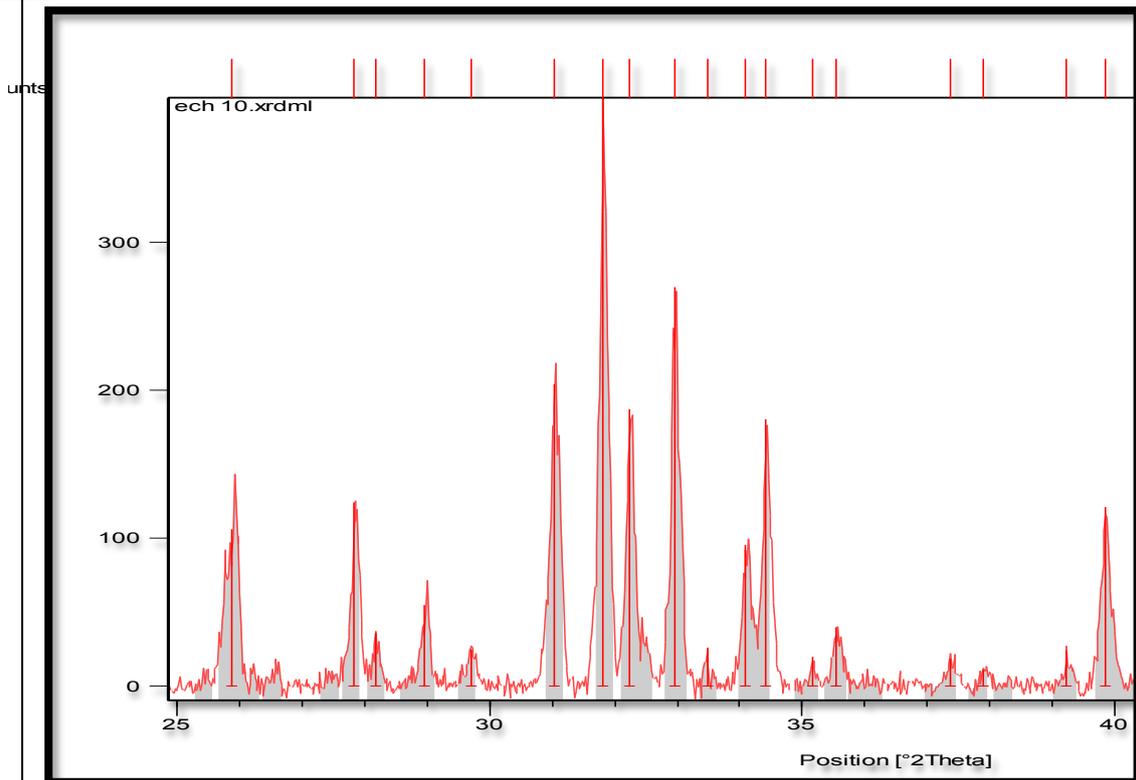
9



Ratio HA/TCP annoncé : 0/100

Ratio HA/TCP mesuré : 0/100

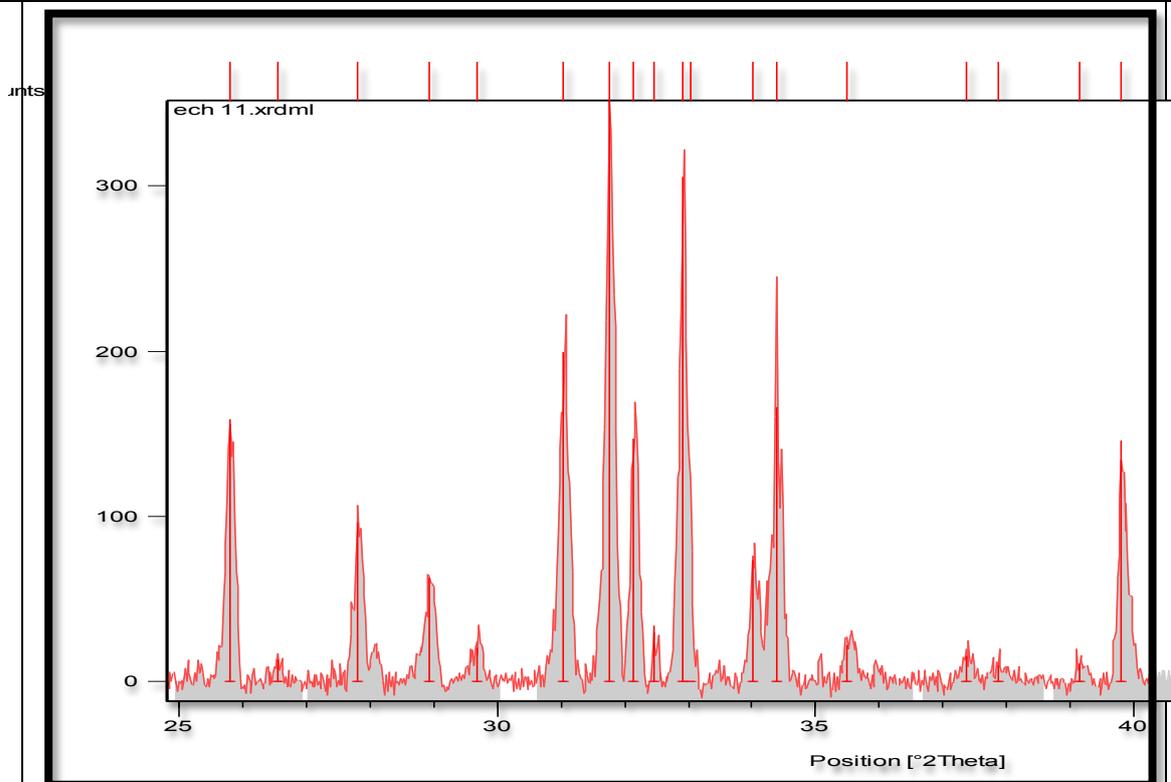
10



Ratio HA/TCP annoncé : 65/35

Ratio HA/TCP mesuré : 66/34

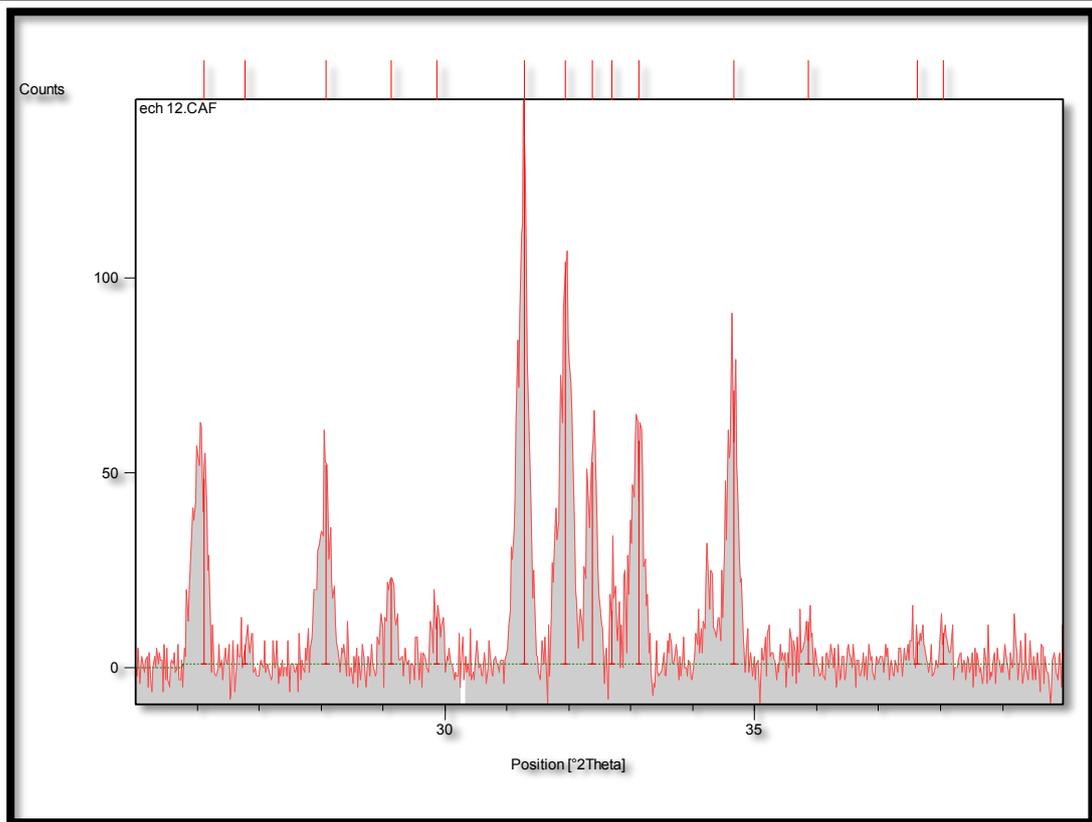
11



Ratio HA/TCP annoncé : 65/35

Ratio HA/TCP mesuré : 65/35

12



Ratio HA/TCP annoncé : 60/40
Ratio HA/TCP mesuré : 42/58

ANNEXE 3 Les partenaires du projet consortium REBORNE

REBORNE: “Regenerating Bone Defects using New biomedical Engineering approaches”

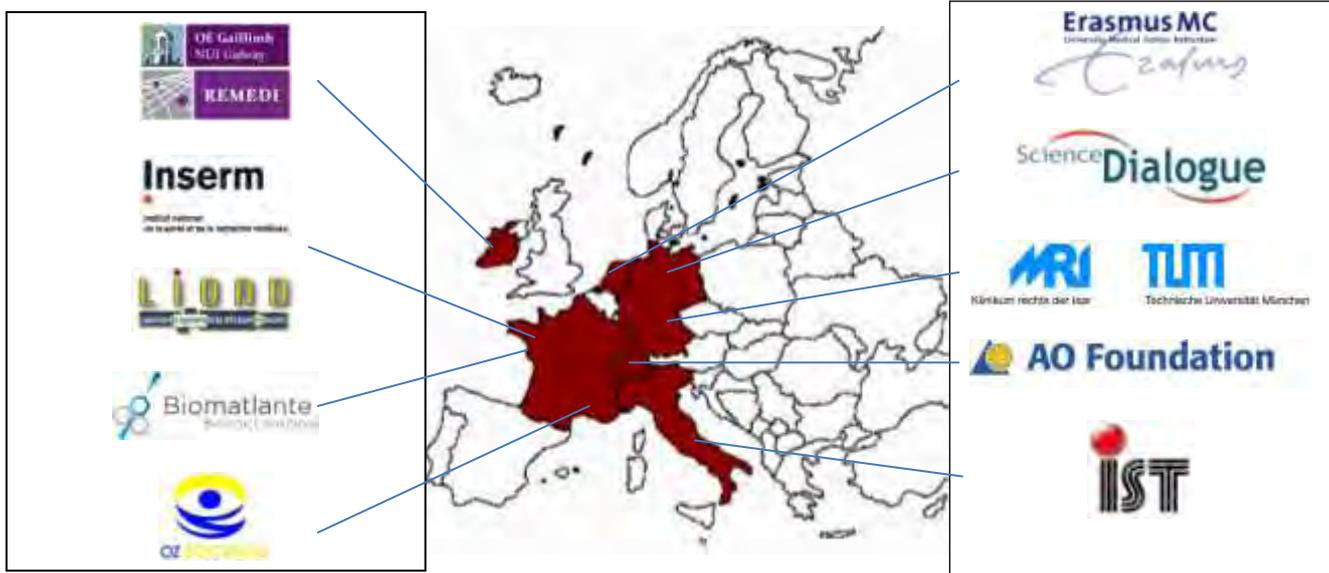


Les 24 organisations partenaires du Consortium européen REBORNE	Pays
Institut de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) - Coordinateur site: http://www.inserm.fr	France
Etablissement Français du Sang (EFS) site: http://www.DonduSang.net	France
BIOMATLANTE SA, fabricant de substituts osseux site: http://www.biomatlante.com	France
Commissariat Energie Atomique (CEA) site: http://www.cea.fr	France
Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena (POLICLINICO) site: http://www.cellfactorymilano.com site: http://www.policlinico.mi.it	Italie
Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes site: http://www.chu-nantes.fr	France
Hôpital Henri Mondor (H.M.) site: http://chu-mondor.aphp.fr	France
KITOZYME AS (KITO), fabricant de biomatériaux à base de chitine et glutane site: http://www.kitozyme.com	Belgique
Xpand Biotechnology BV (XPAND), fabricant de bioréacteurs pour cellules souches site: http://www.xpand-biotech.com	Pays-Bas

Universitat Politecnica de Catalunya (UPC) site: http://www.upc.edu	Espagne
Universidad Autónoma de Madrid (UAM) site: http://www.uam.es	Espagne
University of Modena and Reggio Emilia (UNIMORE) site: http://www.unimore.it	Italie
University of Medicine and Pharmacy "Victor Babes" Timisoara (UMFTVB) site: http://www.umft.ro	Roumanie
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Tours (CHU TOURS) site: http://www.chu-tours.fr	France
University of Tübingen, Childrens Hospital (UNITUE) site: http://www.uni-tuebingen.de	Allemagne
Universitaet Ulm (UULM) site: http://www.uni-ulm.de	Allemagne
University of Verona, Faculty of Medicine, Italy (UNIV VERONA) site: http://www.stemcellreslab-verona.it	Italie
Alcimed SAS (ALCIMED), société de conseils site: http://www.alcimed.fr	France
Universitetet i Bergen (UiB) site: http://www.uib.no	Norvège
Utrecht Medical Centrum (UMC) site: http://www.umcutrecht.nl	Pays-Bas
Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) site: http://www.ior.it	Italie
Max Planck Gesellschaft Zur Foerderung Der Wissenschaften e.V. Max Planck Institut für Polymerforschung (MPIP) site: http://www.mpg.de	Allemagne
Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer (AOU MEYER) site: http://www.ospedale.meyer.it	Italie
Université de Liège - Parodontologie - Chirurgie Bucco-Dentaire (ULG - PARO) site: http://www.ulg.ac.be	Belgique

Les partenaires du projet européen GAMBA

GAMBA: “Gene Activated Matrices for Bone and Cartilage Regeneration in Arthritis”



Les 9 organisations partenaires du Consortium européen GAMBA	Pays
Klinikum rechts der Isar der TU München (TUM) site: www.ieo.med.tu-muenchen.de	Allemagne
AO Research Institute Davos site : www.aofoundation.org	Suisse
BIOMATLANTE SA, fabricant de substituts osseux site: www.biomatlante.com	France
National University of Ireland site: www.nuigalway.ie	Irlande
OZ Biosciences, fabricant de kits de transfection cellulaire site: www.ozbiosciences.com	France
Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam site: www.erasmusmc.nl	Pays-Bas
Istituto Nazionale Per La Ricerca Sul Cancro site: www.istge.it	Italie
l'Institut National de la santé et de la recherche médicale U791 LIOAD INSERM) site: lioad.nantes.inserm.fr	France
Science Dialogue, organisme médiateur entre les scientifiques et le publique pour sensibilisation aux enjeux du projet GAMBA site: www.ScienceDialogue.de	Allemagne

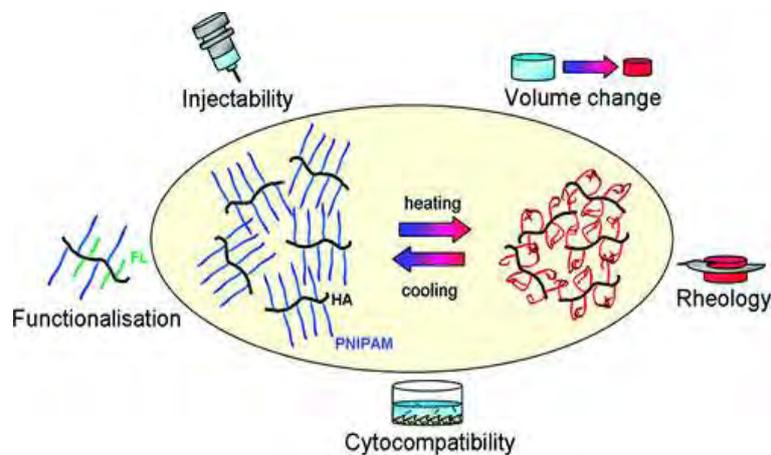
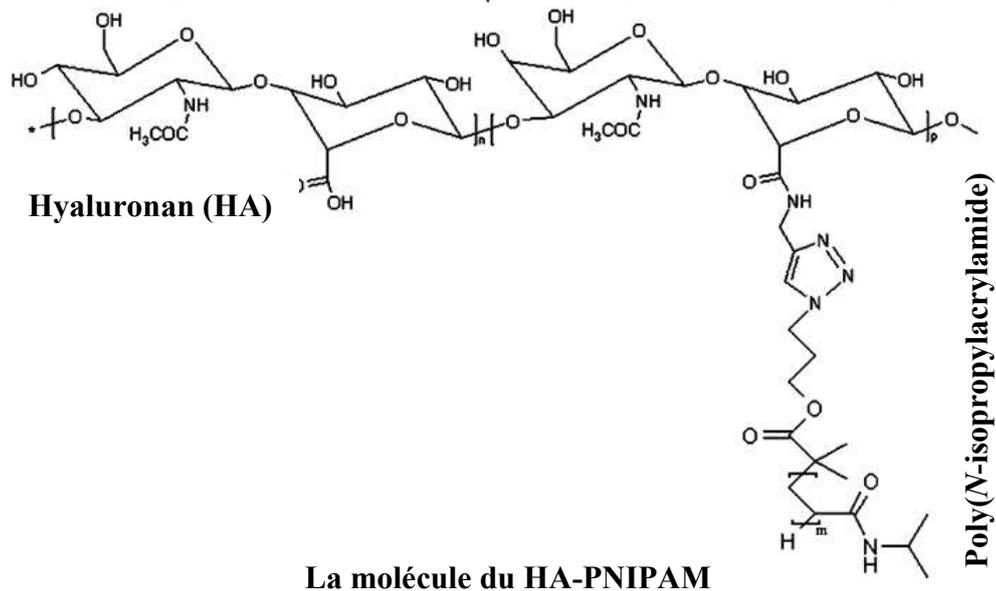
ANNEXE 5

Propriétés du gel hyaluronique de l'AO Foundation pour le projet GAMBA

(Mauro Alini, David Eglin, Matteo D'este)

L'acide hyaluronique est un composant de la matrice extracellulaire dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux et est connu pour jouer un rôle important dans le développement des organes, la prolifération et la migration cellulaire. En outre, l'acide hyaluronique contribue à la lubrification et l'entretien de cartilage, où il s'agit d'un important composant du liquide synovial et forme un revêtement autour des chondrocytes.

L'AO Foundation, un des partenaires du projet GAMBA, a développé un hydrogel thermoréversible appelé HA-PNIPAM pour Hyaluronan-Poly(*N*-isopropylacrylamide). La méthode de synthèse comprend la polymérisation RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer Polymerization) et la chimie dite « click ». Ce concept, proposé par K. B. Sharpless, est basé sur l'utilisation de réactions rapides et efficaces entre différents "blocs" donnant accès à des variations quasi illimitées dans l'architecture moléculaire. La chimie clic permet ainsi la construction de structures hautement diversifiées par l'utilisation de sous-unités réactives qui sont fusionnées par l'utilisation de substitutions nucléophiles et électrophiles, de réaction d'ouverture de cycles ou encore de cycloadditions.



ANNEXE 6

Les méthodes d'activation génique sélectionnées pour le projet GAMBA

A. La méthode d'activation conditionnelle par antibiotique Tet-ON/Tet-OFF

Définition préalable :

Opérateur : en biologie, un opérateur est un segment d'acide nucléique sur lequel se lie une protéine régulatrice qui va moduler l'expression des gènes en aval. La liaison de cette protéine à l'opérateur peut soit stimuler, soit inhiber la production du produit du gène ainsi contrôlé, on parle d'activateur dans le premier cas et de répresseur dans le second cas.

Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation est un procédé d'induction d'expression génique, où la transcription est activée ou désactivée de façon réversible en présence de l'antibiotique tétracycline ou un de ses dérivés comme la doxycycline. Dans la nature, le promoteur Ptet exprime TetR, le répresseur, et TetA, la protéine qui évacue l'antibiotique tétracycline hors de la cellule.

Le système Tet-Off est utilisé pour contrôler l'expression de gènes d'intérêt dans les cellules de mammifères. Ce procédé a été développé par les professeurs Hermann Bujard et Manfred Gossen à l'Université de Heidelberg (Allemagne) en 1992. Ce système fait appel à la tétracycline transactivateur (tTA), protéine créée par une protéine de fusion, TetR (répresseur de la tétracycline), trouvée dans des bactéries *Escherichia coli*. La protéine tTA se lie à l'ADN à un opérateur tet'O. Une fois lié, l'opérateur tet'O va activer un promoteur couplé à l'opérateur tet'O, activant la transcription du gène voisin. Les dérivés de la tétracycline se lient au tTA et le rendent incapable de se lier à des séquences Tetracycline Response Element (TRE), empêchant ainsi la transactivation des gènes cibles. Ce système d'expression est également utilisé dans la production de souris transgéniques qui expriment conditionnellement des gènes d'intérêt.

Le système Tet-On fonctionne de manière inverse. Dans ce système, la protéine tTA est capable de se lier à l'opérateur uniquement lorsqu'il est lié par la doxycycline. Ainsi l'introduction de la doxycycline dans le système initie la transcription du produit génétique amenant à la synthèse de la protéine TGF β -1

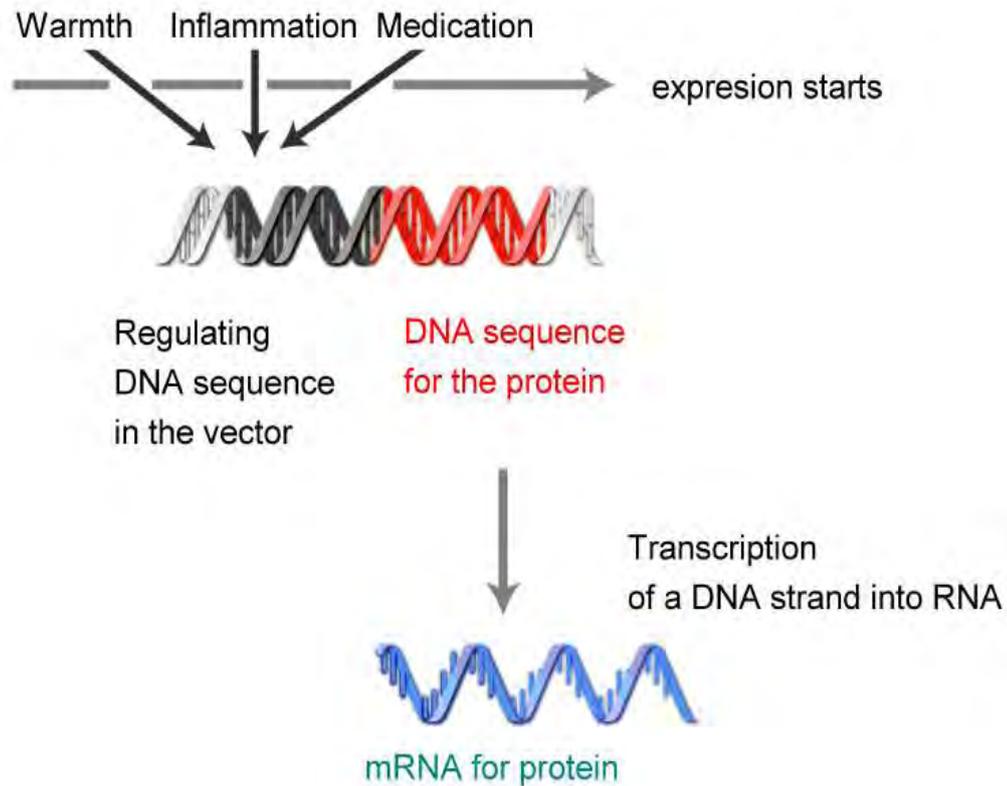
B. L'activation par transfection magnétique (ou magnétofection)

Définition préalable :

Supraparamagnétisme: comportement des matériaux ferromagnétiques ou ferrimagnétiques qui apparaît lorsqu'ils sont sous la forme de nanoparticules. La susceptibilité magnétique de nanoparticules superparamagnétiques est beaucoup plus grande que celle des matériaux paramagnétiques.

Pour le projet Gamba ont été sélectionnées des nanoparticules supraparamagnétiques de type noyau/enveloppe (SOMag6-125). Ces nanoparticules possèdent ainsi un noyau d'oxyde de fer, ayant une taille moyenne de cristallite de 6,8 nm, et un revêtement d'oxyde de silice avec groupements phosphonate de surface formés par condensation de l'orthosilicate de tétraéthyle et du 3 - (trihydroxysilyl)propylmethyl-phosphonate. Le diamètre hydrodynamique moyen a

été mesuré à 96 ± 23 nm (Anton *et al.* 2011). Un champ magnétique extérieur appliqué sur la zone, provoque l'agitation des nanoparticules selon leur fréquence de résonance propre. Cette agitation engendre alors une augmentation de température (hyperthermie) jusqu'à 42°C qui active la transcription des séquences ADN cibles sous contrôle des promoteurs Hsp70 (« heat shock protein », protéine de choc thermique) menant à la synthèse de la protéine BMP-2 ostéoinductrice.



ANNEXE 7

Protocole d'extraction d'ARN

Il est impératif de travailler sous la hotte ARN, en portant des gants et sur glace (sauf mention contraire).

L'extraction a été réalisée sur des CSM de moelle osseuse humaine cultivée en monocouche en milieu contrôle ou ostéogénique sur chaque délai.

Pour les cellules cultivées à la surface de biomatériaux, une étape préalable de broyage à l'ultra-turrax[®] (IKA works) est nécessaire.

Précautions d'emploi, la tige de broyage ne doit être actionnée qu'une fois immergée dans un liquide. Le liquide doit atteindre un niveau suffisant pour que la grille et l'hélice de broyage soient totalement immergées. Il est impératif d'attendre l'arrêt complet de la tige de broyage avant de la retirer du liquide (risque de projection). Le temps de broyage doit être adapté, de manière à ne pas faire trop chauffer l'échantillon.

- **Nettoyage de la tige de broyage.**

- Dans un tube 50 mL, verser 40mL de soude 0.5M (à disposition sous la hotte ARN).
- Laisser tremper les 2 pièces de la tige de broyage dans la solution de soude pendant 20-30 min.
- Pendant ce temps, préparer 2 séries de tubes 50mL annotés A, B, C et 1, 2, 3 en les remplissant à 40mL d'eau distillée.
- Sortir les échantillons conservés à -80°C et les laisser dégeler sur glace.
- À l'issue, des 20-30min, assembler la tige de broyage et la fixer au moteur.
- Plonger la tige de broyage dans le tube A et faire tourner pendant 0.5 à 1min vitesse 5. arrêter le moteur, retirer la tige du liquide et l'éponger avec un papier absorbant propre.
- Répéter cette opération avec les tubes B et C.
- La tige de broyage est prête à l'utilisation.

- **Broyage des échantillons**

- Transférer les échantillons d'une même condition dans un tube 1,5mL propre.
- Plonger la tige de broyage dans le tube 1.5mL et faire tourner pendant 0.5 à 1min vitesse 5.
- Arrêter le moteur, retirer la tige du liquide et l'éponger avec un papier absorbant propre.

- Avant de procéder au broyage d'une autre condition, il est impératif de procéder à une étape de rinçage pour éviter le transfert d'ARN entre les conditions. Plonger la tige de broyage dans le tube 1 et faire tourner pendant 0.5 à 1min vitesse 5. arrêter le moteur, retirer la tige du liquide et l'éponger avec un papier absorbant propre.
- Répéter cette opération avec les tubes 2 et 3.
- La tige de broyage est prête à l'utilisation.
- Après le dernier broyage et rinçage, laisser la tige de broyage refroidir avant de la retirer du moteur et la plonger dans un bain de soude 40mL pendant 20-30min. Et procéder à la série de rinçage avec les tubes A, B et C.
- **Séparation de phases**
 - Laisser le Trizol[®] agir 5 min à TA.
 - Centrifuger la série de tubes 10 mn à 12000 g à 4°C.
 - Récupérer la phase supérieure (rose), sauf le culot (correspondant aux débris cellulaires et biomatériaux) et la transvaser dans une série de tubes 1.5mL propres et annotés.
 - Ajouter 120µL de chloroforme à chaque tube.
 - Vortexer 15s.
 - Incuber 10min à TA.
 - Centrifuger 15 mn à 12000 g à 4°C.
 - À l'issue de la centrifugation, 3 phases se distinguent :
 - la phase supérieure (aqueuse) incolore contenant l'ARN.
 - la phase moyenne (aqueuse) contient l'ADN.
 - la phase inférieure (organique) contient les protéines.
 - Prélever la phase supérieure (aqueuse) incolore contenant l'ARN (environ 50% du volume initial ~360µL), et la transvaser dans une série de tubes 1.5mL propres.
- **Précipitation des ARN**
 - Ajouter 500 µL d'isopropanol (propan-2-ol).
 - Vortexer 15s.
 - Incuber 10 min à TA
 - Centrifuger la série de tubes 10 mn à 12000 g à 4°C.
- **Lavage des ARN**
 - Eliminer le surnageant par retournement des tubes

- Laver avec 1 mL d'éthanol à 75% à -20°C (37.5ml d'éthanol 100% + 12.5 mL d'eau).
- Vortexer.
- Centrifuger à 7500 g pendant 5min à 4°C.
- Eliminer le surnageant à la pipette.
- Recentrifuger brièvement et éliminer les dernières gouttelettes à la pipette.
- Reprendre le culot dans 10-15 µL d'eau ARN.

- **Traitement DNase**

Le traitement DNase sert à digérer les brins d'ADN génomiques contaminant éventuellement la solution d'ARN, afin que ceux-ci ne soient pas amplifiés de manière aspécifique lors de la réaction de RT-PCR.

Pour un échantillon d'un volume inférieur ou égal à 50µL et d'une quantité supposée en ARN inférieure à 10µg.

- Ajouter 0.1 volume 10X TURBO DNase Buffer and 1µL TURBO DNase (2U/µL).
- Incuber à 37 °C pendant 20-30 mn.
- Ajouter 0.1 volume de DNase Inactivation Reagent
- Incuber 2 mn à température ambiante en agitant de temps en temps
- Centrifuger à 10 000 x g pendant 2 mn à température ambiante ou à 4°C
- Transférer le surnageant dans une nouvelle série de tubes.

- **Dosage des ARN au Nanodrop®**

- ARN lmax = 260nm
- ADN lmax = 260nm
- Protéines lmax = 280nm
- Contamination protéique : Ratio 260/280 = 1,8 < ARN pur <2,1
- Phénol lmax = 230nm
- Contamination phénolique : Ratio 260/230 = 1,8 < ARN pur <2,1

ANNEXE 8

Protocole de vérification de l'intégrité des ARN par puce

Les ARN extraits ont été analysés par la méthode des puces ARN à l'aide du kit Agilent RNA 6000 Nano Assay, donc voici le protocole de préparation :

Préparer le gel

1. Pipeter 550 μ l de RNA 6000 Nano gel dans un filtre rotatif.
2. Centrifuger à 1500 g \pm 20% pendant 10 minutes à température ambiante.
3. Aliquoter 65 μ l de gel filtrée dans des tubes à centrifuger 0,5 ml sans RNase.
Utiliser le gel dans les 4 semaines.

Préparer le mélange Gel-Colorant

1. Laisser le colorant RNA 6000 Nano concentré s'équilibrer à la température ambiante pendant 30 min.
2. Vortexer le colorant RNA 6000 Nano concentré pendant 10 secondes et ajouter 1 microlitre de colorant dans une aliquote de 65 μ l du gel filtré.
3. Bien vortexer. Centrifuger le tube à 13000g pendant 10 min à température ambiante.
Utilisez le mélange gel-colorant ainsi préparé dans la journée.

Mise en place du mélange Gel-Colorant

1. Placez une nouvelle puce ARN Nano 6000 sur la station d'amorçage de puce.
2. Pipeter 9,0 μ l de mélange gel-colorant dans le puits marqué G sur fond noir.
3. Assurez-vous que le piston est positionné à 1 ml, puis fermer la station d'amorçage puce.
4. Appuyer sur le poussoir jusqu'à ce qu'il soit maintenu par le clip de blocage.
5. Attendez pendant exactement 30 secondes, puis relâcher la pince.
6. Attendez pendant 5 s. Tirez lentement le piston pour position de 1ml.
7. Ouvrir la station d'amorçage de puce et pipeter 9,0 μ l de mélange gel-colorant dans les puits marqués G sur fond gris.
8. Jeter le reste du mélange gel-colorant.

Mise en place du marqueur Agilent RNA Nano Marker

1. Pipeter 5 μ L de RNA 6000 Nano Marker dans les 12 puits contenant les échantillons et dans le puits du marqueur de poids moléculaire (ou ladder).

Mise en place du marqueur de poids moléculaire (ou ladder) et des échantillons

1. Pipeter 1 μ l de ladder préparé dans le puits marqué d'une échelle.
2. Pipeter 1 μ l d'échantillon dans chacun des 12 puits d'échantillon. Pipeter 1 μ l de RNA 6000 Nano Marker dans chaque échantillon.
3. Placez la puce à l'horizontale dans l'adaptateur du vortexeur spécifique et vortexer pendant 1 min à 2400 rpm.
4. Exécutez le programme de lecture de la puce dans le bioanalyseur Agilent 2100 dans les 5 minutes suivant cette préparation.



Bioanalyseur Agilent 2100



Puce Agilent RNA 6000

REFERENCES

- Aguado, B. A., W. Mulyasmita, et al. (2011). "Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers." Tissue Engineering Part A.
- Akao, M., H. Aoki, et al. (1981). "Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications." Journal of Materials Science **16**(3): 809-812.
- Albee, F. H. (1920). "Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis." Annals of Surgery **71**(1): 32.
- Albrektsson, T. and C. Johansson (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration." European Spine Journal **10**: 96-101.
- Albrektsson, T., G. Zarb, et al. (1986). "The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success." Int J Oral Maxillofac Implants **1**(1): 11-25.
- Anton, M., A. Wolf, et al. (2011). "Optimizing Adenoviral transduction of endothelial cells under flow conditions." Pharmaceutical Research: 1-13.
- Arnett, T. R. (2008). "Extracellular pH regulates bone cell function." J Nutr **138**(2): 415S-418S.
- Arpornmaeklong, P., M. Kochel, et al. (2004). "Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An *in vitro* study." International journal of oral and maxillofacial surgery **33**(1): 60-70.
- Assouline-Dayana, Y., C. Chang, et al. (2002). Pathogenesis and natural history of osteonecrosis, Elsevier.
- Aubin, J., F. Liu, et al. (1995). "Osteoblast and chondroblast differentiation." Bone **17**(2): S77-S83.
- Augello, A., R. Tasso, et al. (2007). "Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis." Arthritis & Rheumatism **56**(4): 1175-1186.
- Augustin, G., S. Davila, et al. (2008). "Thermal osteonecrosis and bone drilling parameters revisited." Archives of orthopaedic and trauma surgery **128**(1): 71-77.
- Bagot d'Arc, M. and G. Daculsi (2003). "Micro macroporous biphasic ceramics and fibrin sealant as a moldable material for bone reconstruction in chronic otitis media surgery. A 15 years experience." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **14**(3): 229-233.
- Baron, R. (1977). "Importance of the intermediate phases between resorption and formation in the measurement and understanding of the bone remodeling sequence." Bone Histomorphometry, (PJ Meunier, ed.), Lab. Armour Montagu, Paris: 179-183.
- Baroth, S., X. Bourges, et al. (2009). "Injectable biphasic calcium phosphate bioceramic: The HYDROS® concept." Bio-Medical Materials and Engineering **19**(1): 71-76.
- Barrere, F., T. Mahmood, et al. (2008). "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions." Materials Science and Engineering: R: Reports **59**(1-6): 38-71.

- Basu, B., D. S. Katti, et al. (2009). Advanced biomaterials: fundamentals, processing, and applications, Wiley-American Ceramic Society.
- Bezuidenhout, D., N. Davies, et al. (2002). "Effect of well defined dodecahedral porosity on inflammation and angiogenesis." ASAIO journal **48**(5): 465.
- Bianco, P. and P. G. Robey (2001). "Stem cells in tissue engineering." NATURE-LONDON: 118-121.
- Biggs, M. J. P., R. G. Richards, et al. (2009). "Interactions with nanoscale topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage." Journal of Biomedical Materials Research Part A **91**(1): 195-208.
- Bjerkvig, R., B. B. Tysnes, et al. (2005). "The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights." Nature Reviews Cancer **5**(11): 899-904.
- Blom, E. J., J. Klein-Nulend, et al. (2001). "Transforming growth factor- β 1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects." Clinical oral implants research **12**(6): 609-616.
- Bocciarelli, D. S. (1970). "Morphology of crystallites in bone." Calcified Tissue International **5**(1): 261-269.
- Bohner, M. (2000). "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements." Injury **31**: D37-D47.
- Boix, D. (2003). Etude de la biofonctionnalité d'un substitut osseux injectable: applications en implantologie orale, PhD, Université de Nantes, Nantes.
- Brauker, J. H., V. E. Carr-Brendel, et al. (1995). "Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture." Journal of biomedical materials research **29**(12): 1517-1524.
- Brittberg, M., E. Sjögren-Jansson, et al. (1997). "Influence of fibrin sealant (Tisseel®) on osteochondral defect repair in the rabbit knee." Biomaterials **18**(3): 235-242.
- Burg, K. J. L., S. Porter, et al. (2000). "Biomaterial developments for bone tissue engineering." Biomaterials **21**(23): 2347-2359.
- Burger, E. H. and J. Klein-Nulend (1999). "Mechanotransduction in bone-role of the lacunocanalicular network." Faseb Journal **13**: 101-112.
- Burwell, R. (1985). "The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft." Clinical Orthopaedics and Related Research **200**: 125.
- Cancedda, R., B. Dozin, et al. (2003). "Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone." Matrix Biology **22**(1): 81-91.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH **9**(5): 641-650.
- Carragee, E. J., E. L. Hurwitz, et al. (2011). "A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned." The spine journal **11**(6): 471-491.

- Carrodeguas, R. and S. De Aza (2011). "[alpha]-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications." Acta Biomaterialia.
- Cartwright, T. (1994). Animal cells as bioreactors, Cambridge Univ Pr.
- Chai, C. and B. Ben-Nissan (1999). "Bioactive nanocrystalline sol-gel hydroxyapatite coatings." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **10**(8): 465-469.
- Chen, G., T. Ushida, et al. (2002). "Scaffold design for tissue engineering." Macromolecular Bioscience **2**(2): 67-77.
- Collin, I., B. Lamy, et al. (2005). "Improvement of macroporous biphasic phosphocalcic ceramics for the filling of bone defects." ITBM-RBM **26**(4): 247-248.
- Conzemius, M. G., T. D. Brown, et al. (2002). "A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure." Journal of Orthopaedic Research **20**(2): 303-309.
- Cordonnier, T., A. Langonné, et al. (2012). "Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.
- Curtis, A., N. Gadegaard, et al. (2004). "Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings." NanoBioscience, IEEE Transactions on **3**(1): 61-65.
- Daculsi, G., S. Baroth, et al. (2009). "20 years of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics Development and Applications." Advances in Bioceramics and Porous Ceramics II: 45-58.
- Daculsi, G., S. Baroth, et al. (2011). "Association cellules-matériaux pour thérapies cellulaires osseuses." IRBM **32**(2): 76-79.
- Daculsi, G., J. M. Bouler, et al. (1997). "Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials." International review of cytology **172**: 129-191.
- Daculsi, G., P. Corlieu, et al. (1992). "Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings." Annals of Otology, rhinology and laryngology **101**(8): 669-675.
- Daculsi, G., O. Laboux, et al. (2003). "Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **14**(3): 195-200.
- Daculsi, G. and P. Layrolle (2004). "Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics." Key Engineering Materials **254**: 1005-1008.
- Daculsi, G., R. LeGeros, et al. (1990). "Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics." Calcified Tissue International **46**(1): 20-27.
- Daculsi, G., R. Z. LeGeros, et al. (1989). "Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization." J Biomed Mater Res **23**(8): 883-894.
- Daculsi, G., N. Passuti, et al. (1990). "Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study." Journal of Biomedical Materials Research **24**(3): 379-396.

Daculsi, G., A. Uzel, et al. (2010). "Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**(3): 855-861.

Daculsi, G., P. Weiss, et al. (1999). "Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials." Bone **25**(2): 59S-61S.

Dalby, M. J., N. Gadegaard, et al. (2007). "The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder." Nature materials **6**(12): 997-1003.

Dalby, M. J., D. McCloy, et al. (2006). "Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies." Biomaterials **27**(15): 2980-2987.

Danet, S. (2011). "L'état de santé de la population en France." Indicateurs associés à la loi relative à la politique de santé publique. Rapport.

Davis, J. (2001). "Basic cell culture." Recherche **67**: 02.

De Groot, K. (1983). "Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties." Bioceramics of calcium phosphate: 100-114.

De Jong, W. (1926). "La substance minerale dans les os." Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas **45**(6): 445-448.

Delanian, S. and J. Lefaix (2002). "Radionécrose de l'os mature: connaissance physiopathologique récente motrice d'une thérapeutique médicale innovante: Mature bone necrosis: from recent pathophysiological aspect to a new therapeutic action." Cancer/Radiothérapie **6**(1): 1-9.

Dellinger, J. G., A. M. Wojtowicz, et al. (2006). "Effects of degradation and porosity on the load bearing properties of model hydroxyapatite bone scaffolds." Journal of Biomedical Materials Research Part A **77**(3): 563-571.

D'Este, M., M. Alini, et al. (2012). "Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan hydrogels." Carbohydrate Polymers.

Develioglu, H., S. Ü. Saraydin, et al. (2007). "Histological findings of long-term healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats." Journal of Biomedical Materials Research Part A **80**(2): 505-508.

Dickens, B., L. Schroeder, et al. (1974). "Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in [beta]-Ca₃(PO₄)₂. The crystal structure of pure [beta]-Ca₃(PO₄)₂." Journal of Solid State Chemistry **10**(3): 232-248.

Dietz, A. A. (1944). Distribution of bone marrow, bone, and bone-ash in rabbits, Royal Society of Medicine.

Dorozhkin, S. V. (2002). "A review on the dissolution models of calcium apatites." Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials **44**(1): 45-61.

Dorozhkin, S. V. (2010). "Bioceramics of calcium orthophosphates." Biomaterials **31**(7): 1465-1485.

- Dorozhkin, S. V. (2010). "Calcium orthophosphates as bioceramics: State of the art." Journal of Functional Biomaterials **1**(1): 22-107.
- Dos Santos, E., M. Farina, et al. (2008). "Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(6): 2307-2316.
- Driessens, F. (1980). "The mineral in bone, dentin and tooth enamel." Bulletin des sociétés chimiques belges **89**(8): 663-689.
- Driessens, F. C. M., J. Planell, et al. (1998). "Osteotransductive bone cements." Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine **212**(6): 427-435.
- Drury, J. L. and D. J. Mooney (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." Biomaterials **24**(24): 4337-4351.
- Ducheyne, P. and Q. Qiu (1999). "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function." Biomaterials **20**(23-24): 2287-2303.
- Eckert, K. L., M. Mathey, et al. (2000). "Preparation and in vivo testing of porous alumina ceramics for cell carrier applications." Biomaterials **21**(1): 63-69.
- Eggl, P., W. Mueller, et al. (1987). "The Role of Pore Size on Bone Ingrowth and Implant Substitution in Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Ceramics; a Histologic Study in Rabbits." Biomaterials and clinical application, Elsevier Science Publ. Amsterdam: 53-56.
- Ellinger, R. F., E. B. Nery, et al. (1986). "Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report." Int J Periodontics Restorative Dent **6**(3): 22-33.
- Eppell, S. J., W. Tong, et al. (2001). "Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy." Journal of Orthopaedic Research **19**(6): 1027-1034.
- Fan, H. S., X. T. Wen, et al. (2005). Compare of Electrospinning PLA and PLA/ β -TCP Scaffold in Vitro, Trans Tech Publ.
- Fellah, B. H. and P. Layrolle (2009). "Sol-gel synthesis and characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity." Acta Biomaterialia **5**(2): 735-742.
- Ferrari, A., D. Hannouche, et al. (2001). "In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye." Journal of biomedical materials research **56**(3): 361-367.
- Formhals, A. (1934). Process and apparatus for preparing artificial threads: US, 1975504.
- Freedman, B. (1987). "Equipoise and the ethics of clinical research." New England Journal of Medicine **317**(3): 141-145.
- Frayssinet, P., L. Gineste, et al. (1998). "Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement." Biomaterials **19**(11-12): 971-977.
- Freeman, M. E., M. J. Furey, et al. (2000). "Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage." Wear **241**(2): 129-135.

- Fu, H., M. N. Rahaman, et al. (2011). "Hollow hydroxyapatite microspheres as a device for controlled delivery of proteins." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **22**(3): 579-591.
- Furth, M. E., A. Atala, et al. (2007). "Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine." Biomaterials **28**(34): 5068-5073.
- Galois, L., D. Mainard, et al. (1996). "Influence de la taille des pores sur la réhabilitation osseuse de deux céramiques phosphocalciques: l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique." Actualites en biomatériaux III, Paris: Editions Romillat **3**: 361-380.
- Gangji, V., J. P. Hauzeur, et al. (2004). "Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells A Pilot Study." The Journal of Bone and Joint Surgery (American) **86**(6): 1153-1160.
- Garlotta, D. (2001). "A literature review of poly (lactic acid)." Journal of Polymers and the Environment **9**(2): 63-84.
- Garrido, C. A., S. E. Lobo, et al. (2011). "Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Orthopaedic Reconstructions: Clinical Outcomes." International journal of biomaterials **2011**.
- Gartner, L. P., J. L. Hiatt, et al. (2000). Color atlas of histology, Lippincott Williams & Wilkins.
- Gauthier, O., J. M. Bouler, et al. (1998). "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth." Biomaterials **19**(1-3): 133-139.
- Gilbert, M., C. M. Giachelli, et al. (2003). "Biomimetic peptides that engage specific integrin-dependent signaling pathways and bind to calcium phosphate surfaces." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67**(1): 69-77.
- Ginebra, M., T. Traykova, et al. (2006). "Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review." Journal of Controlled Release **113**(2): 102-110.
- Glimcher, M. J. (2006). "Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation." Reviews in Mineralogy and Geochemistry **64**(1): 223-282.
- Gomez-Vega, J., E. Saiz, et al. (2000). "Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass® particles on Ti-based implants. 1. Processing." Biomaterials **21**(2): 105-111.
- Gosain, A. K., L. Song, et al. (2002). "A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: Part I." Plastic and Reconstructive Surgery **109**(2): 619.
- Goshima, J., V. M. Goldberg, et al. (1991). "The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks." Clin Orthop Relat Res **262**: 298.
- Goyenvalle, E., Gauthier, O. et al (2000). "Intérêts et limites des céramiques phosphocalciques en chirurgie orthopédique vétérinaire." Revue Méd. Vét **151**(4): 291-302.

- Grandi, G., C. Heitz, et al. (2011). "Comparative histomorphometric analysis between α -Tcp cement and β -Tcp/Ha granules in the bone repair of rat calvaria." Materials Research **14**(1): 11-16.
- Griffith, L. G. and G. Naughton (2002). "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." Science **295**(5557): 1009-1014.
- Gupta, B., N. Revagade, et al. (2007). "Poly (lactic acid) fiber: An overview." Progress in polymer science **32**(4): 455-482.
- Habibovic, P. and K. De Groot (2007). "Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **1**(1): 25-32.
- Habibovic, P., H. Yuan, et al. (2005). "3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials." Biomaterials **26**(17): 3565-3575.
- Halme, D. G. and D. A. Kessler (2006). "FDA regulation of stem-cell–based therapies." New England Journal of Medicine **355**(16): 1730-1735.
- Hanada, K., J. E. Dennis, et al. (1997). "Stimulatory Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." Journal of Bone and Mineral Research **12**(10): 1606-1614.
- Hansen, J. C., J. Yul Lim, et al. (2007). "Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy." Journal of biomechanics **40**(13): 2865-2871.
- Hao, Y., H. Yan, et al. (2012). "Evaluation of osteoinduction and proliferation on nano-Sr-HAP: a novel orthopedic biomaterial for bone tissue regeneration." J Nanosci Nanotechnol **12**(1): 207-212.
- Hare, R. and S. Gash (1963). "Efficiency of antiseptics when acting on dried organisms." British Medical Journal **1**(5329): 496-500.
- Harrison, W. (1962). "The total cellularity of the bone marrow in man." Journal of Clinical Pathology **15**(3): 254-259.
- Hench, L. L., R. J. Splinter, et al. (1971). "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials." Journal of biomedical materials research **5**(6): 117-141.
- Hench, L. L. and I. Thompson (2010). "Twenty-first century challenges for biomaterials." Journal of the Royal Society Interface **7**(Suppl 4): S379-S391.
- Hench, L. L. and J. Wilson (1984). "Surface-active biomaterials." Science **226**(4675): 630-636.
- Hollister, S. J. (2005). "Porous scaffold design for tissue engineering." Nature materials **4**(7): 518-524.
- Holmbom, J., A. Södergård, et al. (2005). "Long-term evaluation of porous poly (ϵ -caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material." Journal of Biomedical Materials Research Part A **75**(2): 308-315.

- Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, et al. (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." Composites science and technology **63**(15): 2223-2253.
- Hubbell, J. A. (1999). "Bioactive biomaterials." Current opinion in biotechnology **10**(2): 123-129.
- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis and cartilage **10**(6): 432-463.
- Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." Biomaterials **21**(24): 2529-2543.
- Im, G. I. I., Y. W. Shin, et al. (2005). "Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?" Osteoarthritis and cartilage **13**(10): 845-853.
- Ito, M., Y. Hidaka, et al. (1999). "Effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hydroxyapatite composite membrane." J Biomed Mater Res **45**(3): 204-208.
- Jarcho, M., J. F. Kay, et al. (1977). "Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface." Journal of bioengineering **1**(2): 79.
- Jeong, B., S. W. Kim, et al. (2002). "Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels." Advanced drug delivery reviews **54**(1): 37-51.
- John, A., H. Varma, et al. (2003). "Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system." Journal of biomaterials applications **18**(1): 63-78.
- Kannan, S., J. Ventura, et al. (2007). "Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized β -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study." Ceramics international **33**(4): 637-641.
- Karageorgiou, V. and D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." Biomaterials **26**(27): 5474-5491.
- Kelland, L. (2004). "'Of mice and men': values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development." European Journal of Cancer **40**(6): 827-836.
- Kilpadi, K. L., P. L. Chang, et al. (2001). "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel." Journal of biomedical materials research **57**(2): 258-267.
- Kim, S. Y., T. Kanamori, et al. (2004). "Preparation of porous poly (D, L-lactide) and poly (D, L-lactide-co-glycolide) membranes by a phase inversion process and investigation of their morphological changes as cell culture scaffolds." Journal of applied polymer science **92**(4): 2082-2092.
- Kim, H. W., H. H. Lee, et al. (2006). "Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly (lactic acid) for bone regeneration." Journal of Biomedical Materials Research Part A **79**(3): 643-649.
- Klokkevold P and Jovanovic S (2001). "Advanced Implant Surgery and Bone Grafting

Techniques." Carranza's Clinical Periodontology **9**.

Kofron, M. D. and C. T. Laurencin (2006). "Bone tissue engineering by gene delivery." Advanced drug delivery reviews **58**(4): 555-576.

Kokubo, T., H. M. Kim, et al. (2003). "Novel bioactive materials with different mechanical properties." Biomaterials **24**(13): 2161-2175.

Komori, T. (2008). "Regulation of bone development and maintenance by Runx2." Frontiers in bioscience: a journal and virtual library **13**: 898.

Kruyt, M., J. De Bruijn, et al. (2003). "Application and limitations of chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine for tracing cells used in bone tissue engineering." Tissue engineering **9**(1): 105-115.

Lam, C. X. F., X. Mo, et al. (2002). "Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer." Materials Science and Engineering: C **20**(1): 49-56.

Langer, R. (2000). "Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience." Accounts of Chemical Research **33**(2): 94-101.

Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.

Lanza, R. P. and J. Vacanti (2007). Principles of tissue engineering, Academic Press.

Lasic, D. and N. Templeton (1996). "Liposomes in gene therapy." Advanced drug delivery reviews **20**(2-3): 221-266.

Laurie, S., L. B. Kaban, et al. (1984). "Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone." Plastic and Reconstructive Surgery **73**(6): 933.

Leach, M. K., Z. Q. Feng, et al. (2011). "The Culture of Primary Motor and Sensory Neurons in Defined Media on Electrospun Poly-L-lactide Nanofiber Scaffolds." Journal of visualized experiments: JoVE(48).

Lecomte, A., H. Gautier, et al. (2008). "Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **84**(1): 1-6.

LeGeros, R. (1981). "Apatites in biological systems." Prog Cryst Growth Charact **4**: 1-45.

LeGeros, R. Z. (2008). "Calcium phosphate-based osteoinductive materials." Chemical reviews **108**(11): 4742.

Legeros, R. Z. and R. G. Craig (1993). "Strategies to affect bone remodeling: osteointegration." Journal of Bone and Mineral Research **8**(S2): S583-S596.

LeGeros, R. Z., G. Daculsi, et al. (2008). "Bioactive bioceramics." Musculoskeletal Tissue Regeneration: 153-181.

LeGeros, R., S. Lin, et al. (2003). "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **14**(3): 201-209.

- Legros, R. (1984). Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés.
- Li, P. (2003). "Biomimetic nano-apatite coating capable of promoting bone ingrowth." Journal of Biomedical Materials Research Part A **66**(1): 79-85.
- Li, W. J., C. T. Laurencin, et al. (2002). "Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering." J Biomed Mater Res **60**(4): 613-621.
- Li, X., X. Chen, et al. (2010). "Synthesis and characterization of core-shell hydroxyapatite/chitosan biocomposite nanospheres." Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition **25**(2): 252-256.
- Liu, D. M. (1996). "Control of pore geometry on influencing the mechanical property of porous hydroxyapatite bioceramic." Journal of materials science letters **15**(5): 419-421.
- Liu, X. and P. X. Ma (2004). "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: on Musculoskeletal Bioengineering. Guest Editor: Kyriacos A. Athanasiou." Annals of biomedical engineering **32**(3): 477-486.
- Lohmann, C., D. Andreacchio, et al. (2001). "Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo." Archives of orthopaedic and trauma surgery **121**(10): 583-590.
- Lossdörfer, S., Z. Schwartz, et al. (2004). "Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity." Journal of Biomedical Materials Research Part A **70**(3): 361-369.
- Lu, H. H., S. R. Pollack, et al. (2000). "Temporal zeta potential variations of 45 S 5 bioactive glass immersed in an electrolyte solution." Journal of Biomedical Materials Research **51**(1): 80-87.
- Lutolf, M. and J. Hubbell (2005). "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering." Nature biotechnology **23**(1): 47-55.
- Ma, Z., M. Kotaki, et al. (2005). "Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds." Tissue engineering **11**(1-2): 101-109.
- Maitra, B., E. Szekely, et al. (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." Bone marrow transplantation **33**(6): 597-604.
- Malard, O., J. M. Bouler, et al. (1999). "Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study." Journal of Biomedical Materials Research **46**(1): 103-111.
- Malard, O., J. Guicheux, et al. (2005). "Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study." Bone **36**(2): 323-330.
- Malizos, K. N., L. D. Quarles, et al. (1993). "An experimental canine model of osteonecrosis: characterization of the repair process." Journal of Orthopaedic Research **11**(3): 350-357.
- Maniatopoulos, C., J. Sodek, et al. (1988). "Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats." Cell and tissue research **254**(2): 317-330.

- Manivasagam, G., U. KAMACHI MUDALI, et al. (2003). "Corrosion and microstructural aspects of titanium and its alloys as orthopaedic devices." Corrosion reviews **21**(2-3): 125-159.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka (1995). "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." The New England journal of medicine **332**(5): 305.
- MarketsandMarkets (2011). Global Biomaterial Market (2010-2015).
- Martin, I., A. Muraglia, et al. (1997). "Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow." Endocrinology **138**(10): 4456-4462.
- Maspero, F. A. and K. Ruffieux (2003). Porous biocompatible implant material and method for its fabrication, Google Patents.
- Massagué, J. (2000). "How cells read TGF- β signals." Nature Reviews Molecular Cell Biology **1**(3): 169-178.
- Matsushima, A., Kotobuki, N. et al. (2009). "In vivo Osteogenic Capability of Human Mesenchymal Cells Cultured on Hydroxyapatite and on β -Tricalcium Phosphate." Artificial organs **33**(6): 474-481.
- McCullen, S., Zhu, Y. et al. (2009). "Electrospun composite poly (L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells." Biomedical Materials **4**: 035002.
- Mehta, R., V. Kumar, et al. (2005). "Synthesis of poly (lactic acid): a review." Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews **45**(4): 325-349.
- MedMarket_Diligence (2006). A Worldwide Business Report : Emerging trends, technologies and opportunities in the markets for orthopedic biomaterials.
- Mendes, S., J. Tibbe, et al. (2002). "Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age." Tissue engineering **8**(6): 911-920.
- Merten, H. A., J. Wiltfang, et al. (2001). "Intraindividual Comparative Animal Study of [alpha]-and [beta]-Tricalcium Phosphate Degradation in Conjunction with Simultaneous Insertion of Dental Implants." Journal of Craniofacial Surgery **12**(1): 59.
- Metikoš-Huković, M., E. Tkalčec, et al. (2003). "An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings." Surface and Coatings Technology **165**(1): 40-50.
- Metters, A., K. Anseth, et al. (1999). "Fundamental studies of biodegradable hydrogels as cartilage replacement materials." Biomedical sciences instrumentation **35**: 33.
- Migliorati, C. A., M. M. Schubert, et al. (2005). "Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone." Cancer **104**(1): 83-93.
- Mikuni-Takagaki, Y. (1999). "Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes." Journal of bone and mineral metabolism **17**(1): 57-60.

- Mohan, S. and D. J. Baylink (1991). "Bone growth factors." Clinical Orthopaedics and Related Research(263): 30.
- Montel, G. (1977). "Constitution et structure des apatites biologiques: influence de ces facteurs sur leurs propriétés." Revue de biologie cellulaire **28**: 179-186.
- Moore, D. C., M. W. Chapman, et al. (1987). "The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects." J Orthop Res **5**(3): 356-365.
- Mortisen, D., M. Peroglio, et al. (2010). "Tailoring Thermoreversible Hyaluronan Hydrogels by "Click" Chemistry and RAFT Polymerization for Cell and Drug Therapy." Biomacromolecules **11**(5): 1261-1272.
- Müller, P., U. Bulnheim, et al. (2008). "Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells." Journal of cellular and molecular medicine **12**(1): 281-291.
- Mullins, R. J., C. Richards, et al. (1996). "Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen: Anaphylactic risk for surgeons." Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology **24**(3): 257-260.
- Murakami, Y., Y. Honda, et al. (2010). "Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes." Acta Biomaterialia **6**(4): 1542-1548.
- Muschler, G. F., C. Boehm, et al. (1997). "Aspiration to Obtain Osteoblast Progenitor Cells from Human Bone Marrow: The Influence of Aspiration Volume." The Journal of Bone and Joint Surgery (American) **79**(11): 1699-1709.
- Neo, M., T. Nakamura, et al. (1993). "Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: a comparative study by transmission electron microscopy." Journal of Biomedical Materials Research **27**(8): 999-1006.
- Nery, E. B., A. Eslami, et al. (1990). "Biphasic calcium phosphate ceramic combined with fibrillar collagen with and without citric acid conditioning in the treatment of periodontal osseous defects." J Periodontol **61**(3): 166-172.
- Newman, A. P. (1998). "Articular cartilage repair." The American Journal of Sports Medicine **26**(2): 309-324.
- Niidome, T. and L. Huang (2002). "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors." Gene therapy **9**(24): 1647-1652.
- O. Gauthier, D. B., G. Grimandi, E. Aguado, J.M. Bouler, P. Weiss, G. Daculsi (1998). "Bone-grafting of canine extraction sockets with an injectable calcium phosphate biomaterial." Bioceramics.
- Osborn, J. and H. Newesely (1980). "Dynamic aspects of the implant-bone interface." Dental Implants: materials and systems. Munich: Verlag: 111-123.
- Özdemir, B., B. Kurtiş, et al. (2011). "Double-Application of Platelet-Rich Plasma on Bone Healing In Rabbits." Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.

- Park, J. W., E. S. Kim, et al. (2010). "Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure." Clinical Oral Implants Research **21**(3): 268-276.
- Passuti, N., G. Daculsi, et al. (1989). "Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion." Clin Orthop Relat Res(248): 169-176.
- Patel, Z. S., S. Young, et al. (2008). "Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model." Bone **43**(5): 931-940.
- Pearce, A., R. Richards, et al. (2007). "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review." Eur Cell Mater **13**: 1-10.
- Perera, F. H., F. J. Martínez-Vázquez, et al. (2010). "Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β -tricalcium phosphate." Ceramics International **36**(6): 1929-1935.
- Petit-Zeman, S. (2001). "Regenerative medicine." Nature biotechnology **19**(3): 201-206.
- Petite, H., V. Viateau, et al. (2000). "Tissue-engineered bone regeneration." Nature biotechnology **18**(9): 959-963.
- Picha, G. J. and R. F. Drake (1996). "Pillared-surface microstructure and soft-tissue implants: Effect of implant site and fixation." Journal of biomedical materials research **30**(3): 305-312.
- Pietak, A. M., J. W. Reid, et al. (2007). "Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics." Biomaterials **28**(28): 4023-4032.
- Pilliar, R., M. Filiaggi, et al. (2001). "Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications--in vitro characterization." Biomaterials **22**(9): 963-972.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Putlyaev, V. and T. Safronova (2006). "A new generation of calcium phosphate biomaterials: the role of phase and chemical compositions." Glass and Ceramics **63**(3): 99-102.
- Qi, Z., Q. Zhang, et al. (2011). "Effects of β -TCP ceramics on intracellular Ca²⁺ concentration, mineralization of osteoblast and protein structure." Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition **26**(6): 1064-1067.
- Qiu, Q. Q., P. Ducheyne, et al. (1999). "Fabrication, characterization and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation in rotating bioreactors." Biomaterials **20**(11): 989-1001.
- Radin, S., P. Ducheyne, et al. (2002). Hollow bone mineral-like calcium phosphate particles, Google Patents.
- Rajesh, J., K. Nandakumar, et al. (2009). "Calcium phosphate cement as a barrier-graft" for the treatment of human periodontal intraosseous defects." Indian Journal of Dental Research **20**(4): 471.
- Rangavittal, N., A. Landa-Cánovas, et al. (2000). "Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: Two important bioceramics." Journal of biomedical materials research **51**(4): 660-668.

- Ratner, B. D. (2004). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, Academic press.
- Reddi, A. H. (2000). "Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials." Tissue engineering **6**(4): 351-359.
- Regis, B. (2011). "Fabrication of 3D-porous scaffolds by Rapid Prototyping method."
- Ren, D., H. Yi, et al. (2005). "The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation." Carbohydrate research **340**(15): 2403-2410.
- Renier, J. and M. Audran (1989). "L'os et le tissu osseux au cours de la vie." Le tissu osseux (L Teot, J Vidal, J Dossa, eds). Sauramps Medical, Montpellier: 141-162.
- Research_Facts_Ltd (2010). The Top 20 European Manufacturers of Synthetic Bone Substitutes. R. f. Ltd: 44.
- Rey, C., C. Combes, et al. (2009). "Bone mineral: update on chemical composition and structure." Osteoporosis international **20**(6): 1013-1021.
- Rezwan, K., Q. Chen, et al. (2006). "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **27**(18): 3413-3431.
- Ripamonti, U. and L. Roden (2010). "Biomimetics for the induction of bone formation." Expert Rev Med Devices **7**(4): 469-479.
- Rothamel, D., F. Schwarz, et al. (2005). "Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat." Clinical oral implants research **16**(3): 369-378.
- Salgado, A. J., O. P. Coutinho, et al. (2004). "Bone tissue engineering: state of the art and future trends." Macromolecular Bioscience **4**(8): 743-765.
- Salzmann, D. L., L. B. Kleinert, et al. (1997). "The effects of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue." Journal of biomedical materials research **34**(4): 463-476.
- Santoni, B. G., G. E. Pluhar, et al. (2007). "Hollow calcium phosphate microcarriers for bone regeneration: in vitro osteoproduction and ex vivo mechanical assessment." Biomed Mater Eng **17**(5): 277-289.
- Schmitt, M. (2000). Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium, PhD Thesis, Université de Nantes, Nantes.
- Schwartz, A. J. and M. Kumar (2009). Electron backscatter diffraction in materials science, Springer Verlag.
- Senuma, Y., S. Franceschin, et al. (2000). "Bioresorbable microspheres by spinning disk atomization as injectable cell carrier: from preparation to in vitro evaluation." Biomaterials **21**(11): 1135-1144.
- Sharkawy, A. A., B. Klitzman, et al. (1997). "Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. I. Diffusion properties." Journal of biomedical materials research **37**(3): 401-412.

- Shin, H., S. Jo, et al. (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." Biomaterials **24**(24): 4353-4364.
- Smeets, R., A. Kolk, et al. (2009). "A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation." Head & face medicine **5**(1): 13.
- Solheim, E., E. Pinholt, et al. (1992). "Inhibition of heterotopic osteogenesis in rats by a new bioerodible system for local delivery of indomethacin." J Bone Joint Surg Am **74**(5): 705.
- Spadaccio, C., A. Rainer, et al. (2009). "Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite electrospun nanocomposites induce chondrogenic differentiation of human MSC." Annals of biomedical engineering **37**(7): 1376-1389.
- Starling, L. B. and J. E. Stephan (2001). Calcium phosphate microcarriers and microspheres, Google Patents.
- Steinemann, S., J. Eulenberger, et al. (1985). "Adhesion of bone to titanium." Biological and biomechanical performance of biomaterials: 409-414.
- Stevens, B., Y. Yang, et al. (2008). "A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **85**(2): 573-582.
- Stevens, M. M. (2008). "Biomaterials for bone tissue engineering." Materials today **11**(5): 18-25.
- Stevens, M. M. and J. H. George (2005). "Exploring and engineering the cell surface interface." Science **310**(5751): 1135-1138.
- St George, J. (2003). "Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors." Gene therapy **10**(14): 1135-1141.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." cell **126**(4): 663-676.
- Tancret, F., J. M. Bouler, et al. (2006). "Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics." Journal of the European Ceramic Society **26**(16): 3647-3656.
- Tolstoshey, P. (1993). "Gene therapy, concepts, current trials and future directions." Annual review of pharmacology and toxicology **33**(1): 573-596.
- Trommelmans, H., J. Selling, et al. (2009). "Ethical issues in bone repair and bone tissue engineering." Bone repair biomaterials: 441-464.
- Turner, A. S. (2001). "Animal models of osteoporosis—necessity and limitations." Eur Cell Mater **1**: 66-81.
- Uchida, A., S. Nade, et al. (1985). "Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits." Journal of Orthopaedic Research **3**(1): 65-77.
- Ueblacker, P., B. Wagner, et al. (2004). "Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects." Osteoarthritis and cartilage **12**(9): 711-719.

- Uskoković, V. and D. P. Uskoković (2011). "Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **96**(1): 152-191.
- Vallet-Regí, M. and J. M. González-Calbet (2004). "Calcium phosphates as substitution of bone tissues." Progress in Solid State Chemistry **32**(1-2): 1-31.
- Van den Berg, W. (2011). "Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms." Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society **19**(4): 338.
- Van Wachem, P., A. Hogt, et al. (1987). "Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge." Biomaterials **8**(5): 323-328.
- Weinand, C., I. Pomerantseva, et al. (2006). "Hydrogel-[beta]-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone." Bone **38**(4): 555-563.
- Vogel, J. P., K. Szalay, et al. (2006). "Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics." Platelets **17**(7): 462-469.
- Wang, X., J. D. Mabrey, et al. (1998). "An interspecies comparison of bone fracture properties." Biomedical Materials and Engineering **8**: 1-10.
- Weiner, S. and H. D. Wagner (1998). "THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations." Annual Review of Materials Science **28**(1): 271-298.
- Weiss, P., O. Gauthier, et al. (1999). "Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer." Bone **25**(2): 67S-70S.
- Weiss, P., L. Obadia, et al. (2003). "Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials." Biomaterials **24**(25): 4591-4601.
- Wen, H. B., J. R. de Wijn, et al. (1998). "Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method." Biomaterials **19**(1-3): 215-221.
- Whitfield, J. F. (2003). "How to grow bone to treat osteoporosis and mend fractures." Current rheumatology reports **5**(1): 45-56.
- Wiley, J. and S. Ltd (2010). "Gene therapy clinical trials worldwide." The Journal of Gene Medicine.
- Williams, D. F. (2008). "On the mechanisms of biocompatibility." Biomaterials **29**(20): 2941-2953.
- Wilson, R. M., J. C. Elliott, et al. (2005). "Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite." Biomaterials **26**(11): 1317-1327.
- Woodard, J. R., A. J. Hilldore, et al. (2007). "The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity." Biomaterials **28**(1): 45-54.
- Woolf, A. D. and B. Pfleger (2003). "Burden of major musculoskeletal conditions." Bulletin of the World Health Organization **81**(9): 646-656.

- Yamada, S., D. Heymann, et al. (1997). "Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios." Biomaterials **18**(15): 1037-1041.
- Yamada, M., M. Shiota, et al. (2007). "Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of α - and β -tricalcium phosphate in block grafts." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **82**(1): 139-148.
- Yan, X., X. Huang, et al. (2006). "The in-vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses." Biomaterials **27**(18): 3396-3403.
- Yang, S., K. F. Leong, et al. (2001). "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors." Tissue engineering **7**(6): 679-689.
- Yang, N., W. Zhang, et al. (2008). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression." Journal of cellular biochemistry **103**(6): 1760-1771.
- Yu, J. H. (2007). Electrospinning of Polymeric Nanofiber Materials: Process Characterization and Unique Applications, Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemical Engineering.
- Yuan, H., H. Fernandes, et al. (2010). "Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(31): 13614-13619.
- Yuan, H., K. Kurashina, et al. (1999). "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics." Biomaterials **20**(19): 1799-1806.
- Yuan, Y., P. Huang, et al. (2009). Osteogenesis of Porous Bioceramics Scaffolds Consisted of Hydroxyapatite Spherules after Implanted in Different Non-Osseous Sites, Trans Tech Publ.
- Zarb, G. (1989). "Implant prosthodontics: the advent of osseointegration." Journal (Canadian Dental Association) **55**(5): 335.
- Zellin, G. and A. Linde (2000). "Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis in vivo." Bone **26**(2): 161-168.
- Zelman, A. (1987). "Tissue Engineering: A Fundamentally New Concept in Health Care." internal discussion memo first draft, courtesy of NSF.
- Zhao, G., Z. Schwartz, et al. (2005). "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure." Journal of Biomedical Materials Research Part A **74**(1): 49-58.
- Zhang, Y. and M. Zhang (2001). "Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates." Journal of non-crystalline solids **282**(2): 159-164.
- Zong, X., K. Kim, et al. (2002). "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes." Polymer **43**(16): 4403-4412.
- Zuo, Y., F. Yang, et al. (2010). "Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration." Acta biomaterialia **6**(4): 1238-1247.

Zur Nieden, N. I., G. Kempka, et al. (2003). "In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts." Differentiation **71**(1): 18-27.

Résumé

Les stratégies de l'ingénierie tissulaire osseuse s'articulent autour du concept du biomatériau servant de matrice à l'invasion et la colonisation cellulaire. Les céramiques biphasées micro-macroporeuses constituées des phases cristalline hydroxyapatite (HA) et bêta-tricalcium phosphate (β -TCP) représentent des candidats parmi les plus pertinents en termes de biomimétisme et de bioactivité. L'utilisation de ces matrices ostéoconductrices dans les 2 projets européens GAMBA et REBORNE, dont les thématiques respectives sont la thérapie génique de l'arthrose et l'ingénierie tissulaire osseuse, est à l'origine des travaux réalisés durant ce doctorat.

Ce manuscrit présente ainsi en premier lieu une étude menée sur l'évaluation du potentiel ostéoinducteur de ces matrices granulaires, supplémentées ou non en agents bioactifs (cellules souches isolées ou moelle osseuse totale), implantées en site ectopique chez la souris nude. Cette étude a été l'occasion de réaliser un comparatif entre caractéristiques et performances de matrices céramiques de ratio HA/TCP 60/40 (MBCP®, Biomatlante SA) ou 20/80 (MBCP+®, Biomatlante SA).

Dans le contexte de la thérapie génique du projet GAMBA, les résultats préliminaires d'analyses d'adsorption des vecteurs de transfection (polymériques ou liposomiques) sur ces mêmes matrices céramiques granulaires, ainsi que la stabilité de ces dernières au cours des processus d'association, ont été également analysés.

Afin de répondre aux nécessités de développement de matrices ostéoconductrices porteuses et protectrices de cellules souches, une nouvelle formulation galénique a été mise au point durant cette thèse: les granules creux. Une étude *in vitro* et *in vivo* a été réalisée afin de comparer les avantages et inconvénients de ces nouveaux granules ronds-creux possédant des parois fines et une concavité interne en comparaison avec des granules classiques ronds-pleins dont seuls les convexités de surface sont accessibles aux cellules.

L'essor des substituts osseux injectables dans le contexte de la chirurgie mini-invasive implique la commercialisation de produit innovants. Une étude *in vivo* réalisée chez le lapin en site orthotopique sur le nouveau mastic In'Oss®, développé par le département R&D de la société Biomatlante, est également présentée afin d'évaluer son potentiel en termes de capacité de résorption et de favorisation de la repousse osseuse.

Enfin, les propriétés mécaniques de l'os étant régies à la fois par celle de la partie minérale (cristaux d'apatites) et celles de la partie organique (fibres de collagène), des membranes composites en fibres d'acide polylactique (PLDLLA) contenant soit des microparticules de HA, soit des granules creux biphasés, ont été synthétisé par la méthode en une étape de l'électrospinning. Une étude de caractérisation physico-chimique et d'adhésion cellulaire sur ces membranes composites est discutée en termes de pertinence vis-à-vis des enjeux de la médecine régénérative de l'os, tout en conservant une optique de valorisation de matières premières industrielles.

Mots Clés : Matrices céramiques phosphocalciques biphasées - ingénierie tissulaire osseuse - granules creux - membranes fibreuses - électrospinning - thérapie génique - ostéoinduction

Abstract

Strategies for bone tissue engineering are conceived around the concept of scaffold for cell invasion and colonization. Biphasic micro-macroporous ceramics made of crystalline phases hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) represent the most relevant candidates in terms of biomimicry and bioactivity. The use of osteoconductive matrices in two European projects GAMBA and REBORNE, whose themes are respectively gene therapy for osteoarthritis and bone tissue engineering, is the origin of the work done during this PhD.

This manuscript presents first a study on the evaluation of the osteoinductive potential of these granular matrices, supplemented or not with bioactive agents (isolated stem cells or total bone marrow), implanted in ectopic site in nude mice model. This study was an opportunity to make a comparison between the performance characteristics of ceramic scaffolds with a ratio of HA/TCP 60/40 (MBCP[®], BIOMATLANTE SA) or 20/80 (MBCP +[®], BIOMATLANTE SA).

In the context of gene therapy GAMBA project, preliminary analysis of adsorption of transfection vectors (polymeric or liposomal) on the same granular ceramic matrices, as well as the stability of the latter in the process of association were also analyzed.

To meet the development needs of osteoconductive cell carriers and protective stem cells, a new pharmaceutical formulation has been developed during this thesis: the hollow granules called hollow shells. An *in vitro* and *in vivo* study was performed to compare the advantages and disadvantages of these new round hollow granules, with thin walls and internal concavity, in comparison with conventional round filled granules which provide only convex surface for cell adhesion.

The market development about injectable bone substitutes in the context of minimally invasive surgery requires innovative products. An *in vivo* study performed in rabbit orthotopic site with the new putty In'Oss[®], developed by the R&D department of Biomatlante Company, is also presented in order to evaluate its potential in terms of bone ingrowth at the expense of the resorbed biomaterial.

Finally, as the mechanical properties of bone are governed by mineral part (apatite crystals) and organic part (collagen fibers), fiber composite membranes of polylactic acid (PLDLLA) containing HA microparticles or hollow granules were synthesized by the one-step electrospinning method. A study of physico-chemical properties and cell adhesion on these composite membranes will be finally discussed in terms of relevance with respect to regenerative medicine stakes, while maintaining an enhancement of industrial raw materials perspective.

Keywords: Biphasic calcium phosphate scaffolds - Bone Tissue Engineering - Hollow granules - fiber-based membranes – electrospinning - gene therapy - osteoinduction