



**HAL**  
open science

# Rôle du strontium en ingénierie tissulaire osseuse pour le développement d'une matrice composite de polysaccharides : application à la technique de Masquelet

Camille Ehret

## ► To cite this version:

Camille Ehret. Rôle du strontium en ingénierie tissulaire osseuse pour le développement d'une matrice composite de polysaccharides : application à la technique de Masquelet. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0690 . tel-01663043

**HAL Id: tel-01663043**

**<https://theses.hal.science/tel-01663043>**

Submitted on 13 Dec 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Camille EHRET

Née le 12.03.1989 à Haguenau (67)

**Rôle du strontium en ingénierie tissulaire osseuse pour le  
développement d'une matrice composite de  
polysaccharides : application à la technique de Masquelet**

Sous la direction de Joëlle AMEDEE VILAMITJANA

Thèse n°84561

Soutenue le 06 octobre 2017

Membres du jury :

M. MAINARD, Didier	PU-PH, Université de Lorraine - Nancy	Président
Mme COMBES, Christèle	PU, Institut National Polytechnique – Toulouse	Rapporteur
M. GUIGNANDON, Alain	MCU, Université Jean Monnet – St Etienne	Rapporteur
M. LETOURNEUR, Didier	DR1-CNRS, Université Paris Diderot – Paris 13	Examineur
Mme. AMEDEE VILAMITJANA, Joëlle	DR1-INSERM, Université de Bordeaux - Bordeaux	Directrice de thèse



**Titre :** Rôle du strontium en ingénierie tissulaire osseuse pour le développement d'une matrice composite de polysaccharides : application à la technique de Masquelet

## **Résumé :**

La reconstruction de lésions osseuses complexes reste un défi dans le domaine de la chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. A ce jour, la technique de référence reste la greffe d'os autologue. Cependant cette technique présente de nombreuses limites (risque d'infection, morbidité au site de prélèvement). Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire peut apporter des solutions de reconstruction innovantes. En effet l'utilisation de matrices ostéoconductrices et ostéoinductrices permettrait de remplacer l'autogreffe.

Le premier objectif de ce travail a été de mettre au point une matrice de polysaccharides, contenant des particules d'hydroxyapatite (HA) dopées avec du strontium (Sr), afin de stimuler à la fois la régénération osseuse, mais également l'angiogenèse. Les résultats obtenus in vitro et in vivo nous ont permis d'optimiser la formulation de cette matrice, en termes de quantités de particules d'hydroxyapatite dopées par différents taux de substitution en strontium, dispersées au sein de la matrice.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'application de cette matrice à la technique de Masquelet afin de remplacer l'utilisation de l'autogreffe. Cette procédure chirurgicale en deux temps, basée sur la formation d'une membrane induite, est utilisée fréquemment en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Le premier temps opératoire utilise un ciment chirurgical, le (poly(méthyl)méthacrylate, PMMA) qui entraîne la formation d'une membrane induite vascularisée. Notre travail a été de remplacer ce ciment par du silicone et d'étudier l'influence de la radiothérapie sur la qualité et la fonction de la membrane ainsi formée. Les premiers essais d'évaluation de cette matrice ont été réalisés chez le rat après résection segmentaire du fémur, suivie d'une procédure de radiothérapie. Les perspectives de ce travail sont d'évaluer la performance de cette matrice dans une lésion mandibulaire de grand volume, après irradiation, chez le gros animal.

## **Mots clés :**

Strontium – Ingénierie tissulaire osseuse – Polysaccharides – Technique de Masquelet

---

**Unité de recherche**

U1026 – BioTis 146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex

**Title** : Role of strontium for bone tissue engineering and the development of a polysaccharide-based composite matrix : Application to Masquelet's technique.

**Abstract** :

Reconstruction of large and complex bone defects remains a challenge for orthopaedic and maxillo-facial surgery. The gold standard strategy for bone reconstruction is the autologous bone graft. However, this approach still exhibits some limitations (infection risks, morbidity at the donor site). In this context, tissue engineering can provide innovative solutions for bone reconstruction. Indeed, the use of osteoconductives and osteoinductives matrices could replace autograft.

Based on previous data obtained by our laboratory, the first objective of this work was to develop a composite matrix of polysaccharides containing hydroxyapatite (HA) particles doped with strontium (Sr), to stimulate both bone formation and angiogenesis. *In vitro* and *in vivo* results allow us to optimize the amount of HA particules and the ratio of Sr-substitution within the polysaccharide-based matrix.

The second part of this work was to apply this biomaterial in the context of Masquelet approach. These two time procedure surgery, based on the formation of an induced membrane, is commonly used in orthopaedic and maxillo-facial surgery. The first chirurgical step uses a surgical cement (poly(methyl)methacrylate, PMMA) to promote around it the formation of a vascularized membrane. Our work was to replace this cement by silicone and to study the influence of radiotherapy treatment on the quality and the function of this induced membrane. The first preclinical evaluation of this matrix has been performed on a rat femoral segmental bone defect, followed by a radiotherapy procedure. The perspectives of this work are to evaluate the performances of this matrix on irradiated segmental mandibular bone defect in large animal.

**Keywords** :

Strontium – Bone tissue engineering – Polysaccharides – Masquelet's technique

---

**Unité de recherche**

U1026 – BioTis 146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex

*« Faire ce que tu aimes, c'est la liberté ; aimer ce que tu fais, c'est le bonheur »*

***Raphaëlle Giordano***



# REMERCIEMENTS

Après ces trois années de thèse, il est difficile de savoir par qui et par où, commencer car énormément de personnes ont participé de près ou de loin à ce travail (ou à défaut, m'ont permis de profiter pleinement des moments de détente entre deux manips !)

Je voudrais commencer par vous remercier vous, membres du jury, qui avez accepté de vous coller à la lecture de ce manuscrit dès votre retour de vacances, et de venir à Bordeaux pour la soutenance (même si le vin rouge et des cannelés y sont peut-être pour quelque chose !).

Je voudrais également te remercier Joëlle de m'avoir fait confiance il y a trois ans, en me proposant ce sujet de thèse, malgré mes appréhensions, et ma position sur la thèse ! Merci également d'avoir eu la patience de korigé se manuskry, et de m'avoir permis de progresser tant scientifiquement que personnellement !

Je souhaite remercier du fond du cœur à Erwan et Thomas, sans qui cette thèse n'aurait certainement pas été la même ! Merci pour votre bonne humeur, et les bons moments que nous avons passés ensemble à l'animalerie (ah zut, j'avais dit « bons moments »... 😊 ), et à Lille. Je vais pouvoir écrire à présent une seconde thèse : « Etude comparative des différents lieux de restauration du vieux Lille : visite guidée culinaire du Nord ! ».

Merci à toi Reine ... c'était chouette (petit jeu de mot que tu comprendras !) ! Merci pour ton implication auprès de tes « petits », et pour toutes ces choses apprises en culture ! Merci également de m'avoir permis de découvrir la qualité à tes côtés, et merci pour tous ces autres « petits » moments partagés qui auront rythmés mes 5 ans au labo !

Je voudrais aussi dire merci à l'homme de l'ombre, Patrick, Patou ou encore Patriiiiiick (en fonction de la situation !), pour avoir été là, au bout du couloir quand : internet ne fonctionnait plus, quand mon ordinateur ne s'allumait pas, quand l'imprimante faisait des siennes, et surtout quand il fallait compléter les grilles de mots fléchés !!!

J'en profite pour remercier Mat's, adjoint officiel de Patrick, et thésard à tes heures perdues (ou l'inverse, je ne sais plus trop !), pour ton aide en informatique, en réparation de voiture, en remplissage (et vidage !) du tiroir secret, pour tes blagues, tes imitations hors paires et ta bonne humeur !

Merci Robinou, pour tes sourires resplendissant au café du matin... ! Mais surtout, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, du début de mon master 2 à la fin de ma thèse. De la part du n° 28-47.5 !

Brunito, mon brésilien préféré (bon, ok, tu es le seul que je connaisse !) tu es le soleil en face de mon bureau ! Merci pour nos #discussions, #lesgoutersdeoufs, #lesragottages, #pleinsdesouvenirstropcool et les #hashtags !!! Muito obrigada et grandes beijos !

Hugo, nós começamos ao mesmo tempo e acho que nenhum de nós pensou onde estaríamos hoje, 5 anos depois! Obrigada por sua presença, seu humor, pelos seus conselhos, especialmente pela sua atenção! Obrigada por me acalmar quando fiquei estressada e chateada! Merci !

Et puis, je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire que j'ai pu côtoyer quelques années ou quelques mois ! L'ordre de la liste n'a pas d'importance, et je suis désolée si j'en oublie, mais sachez que vous faites tous parti de ces moments d'aventure « BioTis » ! Merci à Olivier, Sylvain, Mumu, Damien, Delphine, Sylvie, Betty, Nathalie, Nicolas, Annie, Sophie, Julien, Emeline, Juju, Carole, Marielle, Yoann, Laure, Mathilde, Olivia, Sindhu, Joanna, et tous les autres, ... !

Je voudrais remercier plus particulièrement Audrey, la fée quenotte, pour ta générosité, ton cœur immense, ta présence quand j'en avais besoin, les smoothies et ton sourire contagieux !!!

Merci à Veritza et Gat' pour tout... Je pense que vous comprendrez que je ne peux pas citer ici toutes les choses que nous avons vécues ensemble toutes les trois, que ce soit au laboratoire ou à l'extérieur. Peut-être que je peux évoquer les mojitos et les soirées « filles-sushis ». Le reste, reste top secret et confidentiel ! Alors tout simplement merci à la Serbie et à la Catalogne pour leur amitié avec l'Alsace ! Merci d'être vous et d'avoir été là !

Merci au théâtre, qui m'aura appris beaucoup de chose sur moi-même, mais qui m'aura surtout permis de rencontrer Cathou, Vanessa et Angèle ! C'est bon, on va (enfin) pouvoir reprendre nos apéros, et les soirées jeu !!!

Et puis il y a aussi les amies « d'il y a longtemps ». Désolée de ne pas préciser le nombre d'années, mais pour vous et moi, je pense qu'il vaut mieux que cela reste entre nous ! ☺ En plus de ce que nous avons vécu avant cette thèse, j'ai aussi pu compter sur vous pour m'héberger à Paris, me faire passer des super moments et me permettre de faire des pauses ces trois dernières années ! Merci infiniment à mon Atchoum, ma Tateuse, ma Mini-Manu, mon Inconnue, et à une fille Guéniale ! Que des surnoms, mais je suis sûre que chacune de vous se reconnaitra !

Un petit clin d'œil à ma Glouglou : on était toutes les deux au même point en 1<sup>ère</sup>..., et regarde maintenant ! Je pense qu'on peut remercier Mme A. de nous avoir si

sympathiquement spécifié que la « SVT ce n'est pas fait pour vous » ! Elle nous aura donné l'envie de réussir et de lui prouver qu'on en était capable !!!

Je voudrais aussi consacrer quelques lignes à Ma Binôme, Ma p'tite femme, Ma ChloéChoup's et Ma Normande. Cinq filles et un appareil photo, des souvenirs pleins la tête, des rires dans les oreilles et des étoiles dans les yeux. Chacune à l'autre bout de la France, mais pourtant unies comme les doigts d'une main. Merci d'être là depuis les premiers jours d'IUT !

Après les collègues, et les amis, place à la famille !

Merci à Claude et Annick : Annick pour toutes tes bonnes ondes, ton eau vibrante (ou vibrée !) pleine d'énergie positive et de bienveillance ! Et Claude, pour m'avoir montré que même si c'est difficile, on finit toujours par y arriver ! Finalement cette thèse, c'est un peu ma Tournette à moi !!! Et puis, merci à Maël, Morgan, Kélig et Charlotte (2C athletic running club power !) pour tous les moments que nous avons partagés, et qui m'ont permis de décompresser ces derniers mois !

Je suis sûre que vous êtes en train de vous dire « pfiou... en tout cas celle-là, elle sait dire merci ! », mais ce n'est pas fini !

Eh oui, la famille c'est aussi mon Minus ! 26 ans que tu me supportes (dans tous les sens du terme !) Merci d'être mon super petit frère, et Merci Léa de le supporter ! 😊

Merci Mom's, merci Pop's de toujours vouloir le meilleur pour vos enfants. Merci de vouloir nous rendre heureux et épanouis, de nous soutenir dans nos projets, et d'être à nos côtés ! Merci pour tout, et bien plus encore ! I-----😊-----I

Et enfin, un énorme merci à Yoann, l'Homme, LE chéri, celui qui à subit les dommages collatéraux de la thèse : la fatigue, la mauvaise humeur, les soirs et les weekends de travail, les pleurs, et qui malgré tout ça, aura réussi à me faire rire et à me rendre heureuse depuis toutes ces années. Merci pour ton soutien sans faille, et pour tous ces moments de complicité et d'amour qui nous appartiennent.

Merci également à toi qui va t'attaquer à la lecture de cette thèse ! Merci de t'intéresser à mon travail ! J'espère que la lecture des remerciements t'aura plu et mis de bonne humeur, car la suite est tout de même un peu moins fun à lire !



## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>1. LE TISSU OSSEUX ET SON REMODELAGE</b>	<b>11</b>
1.1. LA STRUCTURE DE L'OS	11
1.2. LE MICROENVIRONNEMENT OSSEUX	13
1.3. LE REMODELAGE OSSEUX	14
1.3.1. LES BMU : « BASIC MULTICELLULAR UNIT »	16
1.3.2. LA PHASE D'ACTIVATION	17
1.3.3. LA PHASE DE RESORPTION	17
1.3.4. LA PHASE D'INVERSION	18
1.3.5. LA PHASE DE FORMATION	18
1.3.6. LA PHASE DE QUIESCENCE	18
1.4. LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE REMODELAGE OSSEUX	19
1.4.1. LA VOIE RANK / RANKL / OPG	19
1.4.2. LE TGF-B ET IGF-1	20
1.4.3. LA PTH	21
1.4.4. LES BMPS	21
1.5. DESEQUILIBRE DU REMODELAGE OSSEUX ET PATHOLOGIES OSSEUSES	23
1.5.1. L'OSTEOPOROSE	23
1.5.2. LA MALADIE DE PAGET	24
1.5.3. L'OSTEOPETROSE	24
<b>2. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION OSSEUSE</b>	<b>25</b>
2.1. LES PLAQUES DE RECONSTRUCTION	25
2.2. LES GREFFES OSSEUSES	26
2.2.1. GREFFE D'OS NON VASCULARISE	27
2.2.2. GREFFE DE LAMBEAU LIBRE VASCULARISE	28
2.3. TECHNIQUE D'ILIZAROV	30
2.4. TECHNIQUE DE MASQUELET	31
2.4.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	31
2.4.2. ROLE DE LA MEMBRANE INDUITE	32

2.4.3.	AVANTAGES, INCONVENIENTS ET AMELIORATIONS A APPORTER	33
2.4.4.	TECHNIQUE DE MASQUELET ET RECONSTRUCTION EN TERRITOIRES IRRADIES	34
<b>3.</b>	<b>L'INGENIERIE TISSULAIRE</b>	<b>34</b>
<b>3.1.</b>	<b>L'INGENIERIE TISSULAIRE : DEFINITION</b>	<b>34</b>
<b>3.2.</b>	<b>LE CAHIER DES CHARGES D'UN BIOMATERIAU POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE</b>	<b>36</b>
<b>3.3.</b>	<b>LES DIFFERENTS TYPES DE BIOMATERIAUX POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE</b>	<b>37</b>
3.3.1.	LES POLYMERES	37
3.3.2.	LES MATERIAUX A BASE DE PHOSPHATE DE CALCIUM	41
3.3.3.	LES BIO-VERRES OU VERRES BIOACTIFS	41
3.3.4.	LES METAUX	42
3.3.5.	LES HYDROGELS	43
3.3.6.	LES COMPOSITES	44
3.3.7.	LES MATERIAUX IMPRIMES EN TROIS DIMENSION (3D) PAR BIOFABRICATION	46
<b>3.4.</b>	<b>STRATEGIE D'OSTEOINDUCTION ET DE VASCULARISATION DES PRODUITS D'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE</b>	<b>47</b>
3.4.1.	OSTEOINDUCTION ET CELLULARISATION DE BIOMATERIAUX	47
3.4.2.	LA PRE-VASCULARISATION DE BIOMATERIAUX	51
3.4.3.	CULTURE DYNAMIQUE DES PRODUITS D'INGENIERIE TISSULAIRE	53
3.4.4.	FONCTIONNALISATION DE BIOMATERIAUX PAR DES FACTEURS DE CROISSANCE	55
3.4.5.	LES SUBSTITUTIONS CATIONIQUES	57
<b>4.</b>	<b>INTERET DU STRONTIUM EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE</b>	<b>59</b>
<b>4.1.</b>	<b>MECANISMES D'ACTION DU STRONTIUM</b>	<b>59</b>
4.1.1.	ACTIVATION DU « CALCIUM SENSING RECEPTOR » (CASR)	60
4.1.2.	ACTIVATION DE LA VOIE RANK / RANKL / OPG	60
<b>4.2.</b>	<b>ROLE DU RANELATE DE STRONTIUM SUR L'OSTEOCLASTOGENESE</b>	<b>61</b>
<b>4.3.</b>	<b>ROLE DU RANELATE DE STRONTIUM SUR L'OSTEOBLASTOGENESE</b>	<b>63</b>
<b>4.4.</b>	<b>ROLE DU RANELATE DE STRONTIUM SUR L'ANGIOGENESE</b>	<b>63</b>
<b>5.</b>	<b>LES MODELES PRECLINIQUES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE</b>	<b>64</b>
<b>5.1.</b>	<b>LES MODELES DE REGENERATION TISSULAIRE</b>	<b>64</b>
5.1.1.	L'OSSIFICATION MEMBRANAIRE	64
5.1.2.	L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE	66
<b>5.2.</b>	<b>LES MODELES EXPERIMENTAUX</b>	<b>67</b>

5.2.1. MODELES PRECLINIQUES D'OSTEOINDUCTION	67
5.2.2. MODELES EXPERIMENTAUX DE REGENERATION OSSEUSE	68
<b>5.3. LES CRITERES DE CHOIX DES MODELES PRECLINIQUES</b>	<b>71</b>
5.3.1. L'ESPECE	72
5.3.2. CRITERES DE CHOIX ANNEXES POUR LES ETUDES EXPERIMENTALES	75
<b>5.4. LES TECHNIQUES D'ANALYSE DES TISSUS RECONSTRUITS</b>	<b>76</b>
5.4.1. TECHNIQUES NON INVASIVES	76
5.4.2. TECHNIQUES D'ANALYSES INVASIVES	78
5.4.3. AUTRES TECHNIQUES D'ANALYSE	80
<b>OBJECTIFS</b>	<b>81</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>86</b>
<b>PREMIERE PARTIE :</b>	<b>87</b>
<b>DEVELOPPEMENT D'UNE MATRICE DE POLYSACCHARIDES COMPOSEE DE PARTICULES D'HYDROXYAPATITE DOPEES EN STRONTIUM</b>	<b>87</b>
<b>DEUXIEME PARTIE :</b>	<b>125</b>
<b>MODELES DE RECONSTRUCTION TISSULAIRE EN TERRITOIRE IRRADIES</b>	<b>125</b>
<b>TROISIEME PARTIE :</b>	<b>153</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>165</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>171</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>191</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie du tissu osseux.....	11
Figure 2 : Organisation hiérarchique et structurale du tissu osseux .....	12
Figure 3 : Représentation schématique du microenvironnement osseux.....	14
Figure 4 : Différentes phases du remodelage osseux au niveau d'une BMU .....	15
Figure 5 : Molécules impliquées dans le remodelage osseux au niveau d'une BMU.....	16
Figure 6 : Interactions entre les RANKL RANK et OPG au cours de la résorption/formation osseuse .....	19
Figure 7 : Recrutement des MSCs par le TGF- $\beta$ 1 au cours du remodelage osseux .....	20
Figure 8 : Modulation du microenvironnement osseux par la PTH au cours du remodelage.	21
Figure 9 : Voie de signalisation de la BMP2 .....	22
Figure 10 : Mécanisme de l'ostéoporose .....	24
Figure 11 : Pathologies liées au déséquilibre de la résorption/formation osseuse.....	25
Figure 12 : Prélèvement d'un lambeau libre vascularisé au niveau du péroné.....	28
Figure 13 : Prélèvement d'un lambeau libre au niveau de la crête iliaque .....	29
Figure 14 : Schéma illustrant la technique d'Illizarov .....	31
Figure 15 : Représentation schématique de la technique de Masquelet.....	32
Figure 16 : Composants fondamentaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse .....	35
Figure 17 : Implants en titane de différentes porosités.....	43
Figure 18 : Cellules souches utilisées en ingénierie tissulaire osseuse.....	48
Figure 19 : Les iPS en ingénierie tissulaire osseuse.....	49
Figure 20 : Cellules souches de la pulpe dentaire différenciées en ostéoblastes .....	50
Figure 21 : Réponse angiogénique durant la réparation d'une fracture .....	52
Figure 22 : Méthodes de pré-vascularisation des biomatériaux .....	52
Figure 23 : Bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.....	54
Figure 24 : Mode d'action du strontium : voie de signalisation du RANKL/OPG.....	61
Figure 25 : Activité TRAP des ostéoclastes en présence du strontium.....	62
Figure 26 : Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des ostéoclastes par le strontium .....	62
Figure 27 : Effet du strontium sur l'ostéoblastogénèse.....	63
Figure 28 : Modèle expérimental de la calvaria chez le lapin .....	65
Figure 29 : Ossification membranaire et endochondrale .....	66
Figure 30 : Implantation en site sous cutané de biomatériaux .....	67
Figure 31 : Implantation en site intramusculaire de biomatériaux .....	68
Figure 32 : Processus de comblement du modèle « sinus lift » en clinique .....	70
Figure 33 : Schéma représentatif du défaut mandibulaire chez la brebis.....	71
Figure 34 : Représentation 3D de tissu osseux de souris après analyse au micro-CT .....	77
Figure 35 : Colorations au trichrome de Masson et au Von Kossa .....	78

Figure 36 : Mise en évidence de cellules endothéliales et ostéoblastiques au niveau condyalaire .....	79
Figure 37 : Mise en évidence de cellules géantes multinucléées par le marquage de la TRAP .....	79
Figure 38 : Schéma récapitulatif des différents objectifs du travail de thèse .....	85
Figure 39 : Schéma récapitulatif de l'objectif de la première partie .....	89
Figure 40 : Images représentatives des explants par micro-CT après implantations en site sous cutanée des matrices contenant différents taux de HA (D1,D2 et D3) et différents pourcentages de substitution en strontium 8% (8Sr-HA) et 50% (50Sr-HA) comparé aux matrices sans strontium (Matrix-HA).....	117
Figure 41 : Analyse quantitative du tissu minéralisé formé après implantations en site sous cutanée des matrices contenant différents taux de HA (D2 et D3) et un pourcentage de substitution en strontium de 50% (Matrix-50Sr-HA) .....	118
Figure 42 : Analyses par micro-CT des matrices de HA contenant des particules de HA dopées ou non en strontium.....	121
Figure 43 : Analyses histologique et immunochimique du tissu néoformé au sein des différentes matrices implantées dans les défauts condyalaire chez le rat .....	122
Figure 44 : Schéma récapitulatif de la deuxième partie .....	128
Figure 45 : Analyses par micro-CT des matrices de HA contenant des particules de HA dopées ou non en strontium.....	149
Figure 46 : Coloration au Trichrome de Masson du tissu néoformé au sein des différentes matrices implantées dans les lésions segmentaires de fémurs de rats soumis à un traitement de radiothérapie.....	150
Figure 47 : Schéma récapitulatif de la troisième partie .....	154
Figure 48 : Différentes étapes de la première chirurgie de la technique de Masquelet.....	157
Figure 49 : Différentes étapes de la seconde chirurgie de la technique de Masquelet .....	158
Figure 50 : Résultats de l'implantation de l'os autologue dans un défaut segmentaire de mandibule chez le mini-porc .....	159
Figure 51 : Comblement de la cavité à l'aide de la matrice composite de HA sous forme de billes injectables de 250 à 500 µm de diamètre à l'aide d'une seringue munie d'une canule .....	162
Figure 52 : Calendrier des opérations chirurgicales prévues sur les 4 mini-porcs actuellement en cours .....	163
Figure 53 : Chronological processus of Masquelet technique with EBRT on rat segmental femoral defect.....	199

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différents types de greffes osseuses .....	27
Tableau 2 : Présentation des sites donneurs et receveurs pour la transplantation d'os .....	27
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différents sites de prélèvement osseux .....	30
Tableau 4 : Cahier des charges d'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse.....	36
Tableau 5 : Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse .....	37
Tableau 6 : Les polymères naturels pour l'ingénierie tissulaire osseuse.....	39
Tableau 7 : Propriétés mécaniques des polymères naturels en ingénierie tissulaire osseuse comparées aux biomatériaux à base de phosphate de calcium ou celles du tissu osseux .....	40
Tableau 8 : Biomatériaux composites commercialisés et applications cliniques .....	45
Tableau 9 : Limites des produits d'ingénierie tissulaire osseuse .....	46
Tableau 10 : Lésions osseuses de taille « critique ».....	64
Tableau 11 : Les modèles précliniques chez le gros animal : avantages et inconvénients .....	70
Tableau 12 : Etude de la capacité de reconstruction osseuse de différents modèles précliniques par rapport à l'Homme .....	72
Tableau 13 : Comparaison des structures osseuses entre le tissu osseux de différentes espèces animales et l'os humain.....	72
Tableau 14 : Les modèles précliniques chez le petit animal : avantages et inconvénients.....	73
Tableau 15 : Avantages et inconvénients de l'utilisation de modèles de gros animaux .....	75

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>μ-CT</b>	Micro-Computed Tomography	<b>MMP</b>	Matrix MétalloProtéinases
<b>1,25-Vit D3</b>	1,25-dihydroxyvitamin D3;	<b>MSC</b>	Mesenchymal Stem Cells
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>N Cad</b>	N-cadhérine
<b>ADSC</b>	Adipose Derived Stem Cells	<b>Na</b>	Sodium
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique	<b>NFκB</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate	<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein	<b>OPN</b>	Ostéopontine
<b>BMPR</b>	Bone Morphogenetic Protein Receptor	<b>Osx</b>	Osterix
<b>BMU</b>	Unité Multicellulaire de Base	<b>PAL</b>	Phosphatase Alkaline
<b>BSP</b>	Bone SialoProtein	<b>PCL</b>	Poly-(ε-CaproLactone)
<b>CaSR</b>	Calcium Sensing Receptor	<b>PGA</b>	PolyGlycolic Acid
<b>c-fms</b>	colony stimulating factor 1 receptor	<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3 kinase
<b>CSF-1</b>	Colony Stimulating Factor 1	<b>PIGF</b>	Placental Growth Factor
<b>CSH</b>	Cellule Souche Hématopoïétique	<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>DAG</b>	Diacylglycerol	<b>PKC</b>	Phosphokinase C
<b>DKK1</b>	Dickkopf-related protein 1	<b>PKD</b>	Protein kinase D
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>PLA</b>	PolyLactic Acid
<b>EPC</b>	Cellules Progénitrices Endothéliales	<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinase	<b>PLGA</b>	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)
<b>ESC</b>	Cellules Souches Embryonnaires	<b>PMMA</b>	Polyméthacrylate de méthyle
<b>Fe</b>	Fer	<b>PTH</b>	ParaThyroid Hormone
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor	<b>RANK</b>	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
<b>FSH</b>	Follicle-Stimulating Hormone	<b>RANKL</b>	RANK Ligand
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practices	<b>RF</b>	Radio Fréquence
<b>HA</b>	Hydroxyapatite	<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>HIF-1</b>	Hypoxia growth Factor-1	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase	<b>Runx2</b>	runrelated transcription factor 2
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growth Factor	<b>SOST</b>	Sclerostin
<b>IP3</b>	Inositol TriPhosphate	<b>Sr</b>	Strontium
<b>iPS</b>	induced Pluripotent Stem cells	<b>SVF</b>	Fraction Vasculaire Stromale
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique	<b>TCP</b>	TriCalcium Phosphate
<b>KO</b>	Knock Out	<b>TGF-β1</b>	Transforming Growth Factor- β1
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases	<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein - 1	<b>TRAP</b>	Phosphatase Acide Tartrate-Résistante
<b>MCSF</b>	Macrophage Colony-Stimulating Factor	<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>MEC</b>	Matrice ExtraCellulaire	<b>Wnt</b>	Wingless-related integration site
<b>Mg</b>	Magnésium	<b>Zn</b>	Zinc
<b>MI</b>	Membrane Induite	<b>β-TCP</b>	β-Tricalcium de Phosphate



# INTRODUCTION

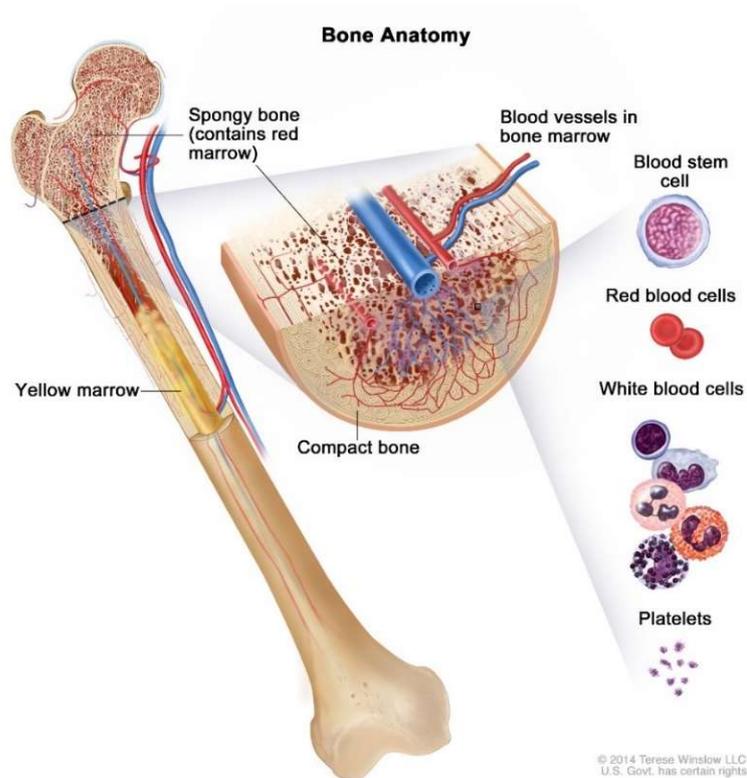


## 1. LE TISSU OSSEUX ET SON REMODELAGE

### 1.1. La structure de l'os

L'os est un des tissus conjonctifs constituant le corps humain. Il compose le squelette, permet la protection des organes mais aussi le support et la motricité. L'os joue également un rôle important dans le maintien et la régulation de l'homéostasie du calcium.

Le tissu osseux est constitué d'une double structure. La couche externe, aussi appelée os cortical, recouvre l'os de façon lisse, dense et continue. L'os spongieux est composé de travées osseuses au sein desquelles de nombreuses structures vasculaires transitent. Ce réseau de trabécules osseuses, ramifiées et anastomosées, est occupé par la moelle osseuse où résident de nombreuses cellules souches stromales et cellules hématopoïétiques. (**Figure 1**).



**FIGURE 1 : ANATOMIE DU TISSU OSSEUX**

Le tissu osseux est composé d'os spongieux, d'os cortical et de moelle osseuse. L'os cortical est présent au niveau de la couche externe de l'os. L'os spongieux est principalement présent aux extrémités des os longs, et contient la moelle osseuse rouge. La moelle osseuse est présente également au centre de l'os sous forme de moelle osseuse jaune [1].

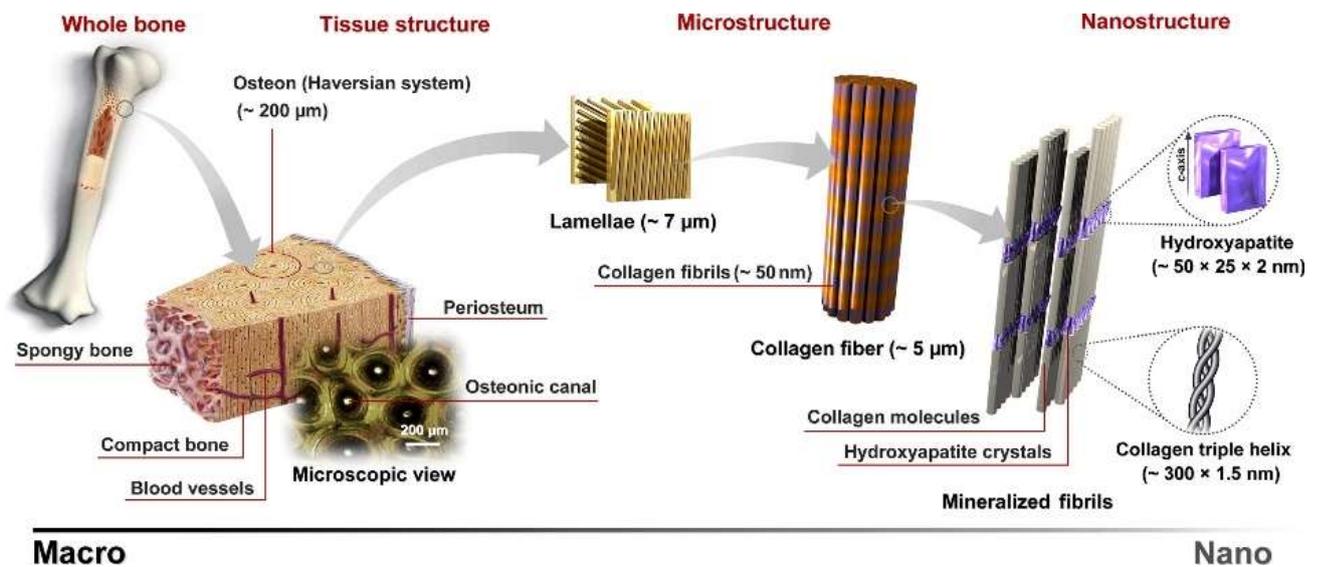


FIGURE 2 : ORGANISATION HIERARCHIQUE ET STRUCTURELLE DU TISSU OSSEUX

[2]

L'organisation du tissu osseux se définit à plusieurs échelles (**Figure 2**) : macroscopique, microscopique et nanoscopique. L'échelle macroscopique englobe la structure spongieuse et corticale de l'os. L'échelle microscopique regroupe les structures nommées « ostéons » et les différents types cellulaires présents dans le tissu osseux. Enfin, l'échelle nanoscopique concerne principalement la phase minérale du tissu, associée à des fibres collagéniques.

Macroscopiquement, l'os consiste en une enveloppe cylindrique d'os cortical, entourant l'os spongieux. L'os cortical, plus dense que le spongieux, présente une structure ayant une porosité de 3 à 12 % [3, 4]. L'os trabéculaire ou spongieux, quant à lui, possède une porosité comprise entre 50 et 90 %.

A l'échelle microscopique, la structure corticale est composée de fibres de collagène minéralisées et organisées de façon parallèle sous forme de lamelles. Ces lamelles forment des couches concentriques autour de canaux (canaux de Havers), contenant des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins. Cet ensemble est appelé « ostéon ». Les ostéons constituent l'unité structurale de l'os compact.

L'os spongieux est formé d'un réseau interconnecté de trabécules. La microporosité de l'os permet ainsi sa vascularisation, le transport de nutriments, et l'invasion cellulaire.

Au niveau cellulaire, les cellules osseuses comprennent les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes. La lignée ostéoblastique possède une même origine et provient de cellules mésenchymateuses. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la sécrétion et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les ostéocytes ont pour mission de réguler la production de la matrice osseuse minéralisée. Ils ont des capacités de méchanotransduction par l'intermédiaire d'un réseau comportant des canalicules qui

assurent la transmission du signal. L'ostéocyte est à ce jour considéré comme le « chef d'orchestre » de la formation osseuse. Les ostéocytes sont présents au niveau des lacunes, espaces vides de l'os. Les cellules bordantes se situent à la surface de l'os, et participent, elles aussi, à l'organisation de la matrice osseuse [5]. Enfin, les ostéoclastes sont des cellules multinucléées impliquées dans la résorption osseuse, et provenant de la lignée hématopoïétique.

Au niveau nanométrique, les fibres de collagènes sont les éléments les plus présents au sein du tissu osseux, entourées et infiltrées par une phase minérale. L'os peut ainsi être considéré comme un composite naturel. En effet, il est à la fois composé d'une phase inorganique (ou minérale) et d'une phase organique. La phase minérale de l'os est principalement constituée de cristaux de phosphate de calcium (*i.e.* hydroxyapatite (HA)) et d'oligoéléments ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ...). La phase organique quant à elle est composée par près de 95 % de collagène de type I, mais sont également présents les collagènes de type III, V et XI. A cela s'ajoute 5 % de protéines non collagéniques telles que les protéoglycanes, la fibronectine (une des premières protéines produites par les ostéoblastes), l'ostéocalcine, l'ostéopontine, et des sialoprotéines qui jouent un rôle important dans la formation osseuse, la minéralisation et l'ostéoclastogénèse [6].

## 1.2. Le microenvironnement osseux

Au sein du tissu osseux, les cellules souches sont localisées dans des sites anatomiques particuliers appelés « niches ». Celles-ci ont une réalité fonctionnelle permettant à la cellule souche de s'autorenouveler et de se maintenir en quiescence. Cette niche est également capable de promouvoir la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, les niches à cellules souches correspondent à de véritables entités spatio-temporelles dynamiques dans lesquelles des événements de communication intercellulaire se produisent sous l'influence de cytokines, et de facteurs intervenants dans le remodelage osseux (**Figure 3**) [7].

Le microenvironnement osseux est constitué de plusieurs niches : la niche endostéale, et la niche vasculaire. La niche endostéale se situe dans la surface interne de l'os, proche des surfaces endocorticales et trabéculaires. La niche endostéale est composée d'ostéoblastes, de fibroblastes mais également d'ostéoclastes [8]. Les structures vasculaires pénètrent dans la moelle osseuse *via* l'os cortical, vers les capillaires sinusoides ayant des ramifications à travers la cavité de la moelle. Les vaisseaux de la moelle osseuse sont également capables de réguler l'hématopoïèse, suggérant ainsi le rôle des cellules endothéliales dans l'organisation de la niche vasculaire [9, 10].

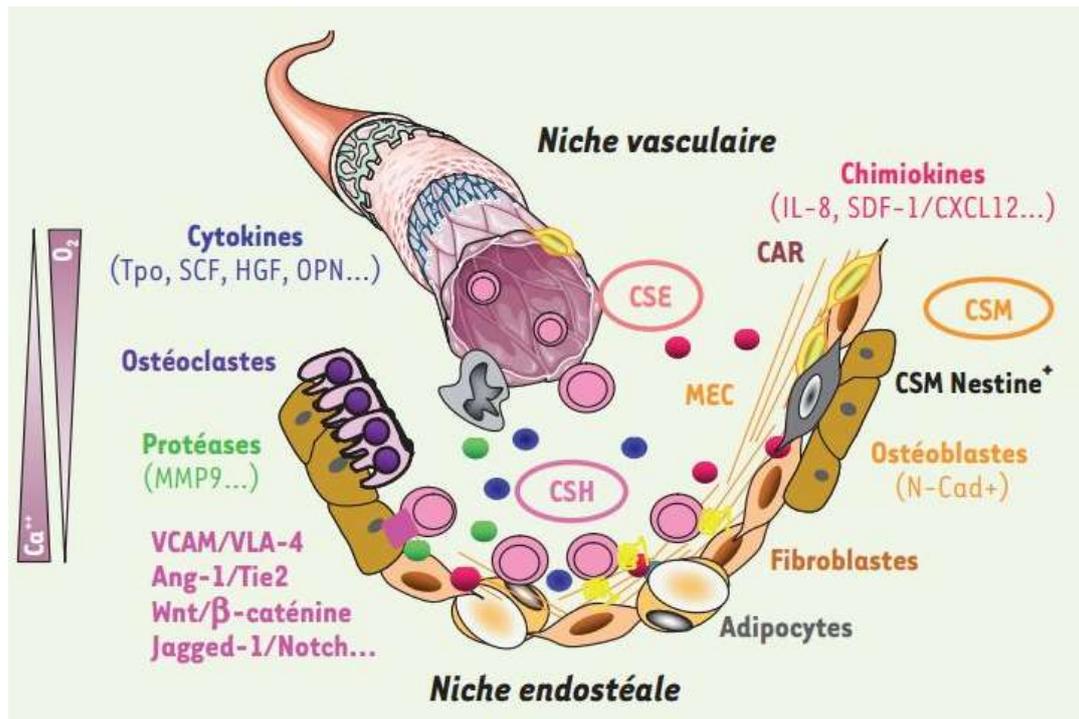


FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MICROENVIRONNEMENT OSSEUX

Les CSH entretiennent un dialogue constant avec leurs niches où elles sont régulées par des contacts directs avec différentes cellules stromales, ainsi que par des facteurs diffusibles et environnementaux. La niche endostéale, au contact de l'os, est majoritairement composée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, impliqués dans la résorption osseuse ainsi que de fibroblastes et d'adipocytes. La niche vasculaire consiste en un réseau de vaisseaux fenêtrés formés par des cellules endothéliales. *Abréviations : CSH : cellule souche hématopoïétique ; CSE : cellule souche endothéliale ; CSM : cellule souche mésoenchymateuse ; MEC : matrice extracellulaire ; CAR : CXCL12 abondant reticular cells ; N-Cad+ : N-cadhérine+ ; MMP9 : membrane metalloproteinase 9 ; Ca : calcium ; O<sub>2</sub> : oxygène.*[8]

### 1.3. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un ensemble d'événements physiologiques qui assurent, tout au long de la vie, la structure et les propriétés du tissu osseux. La capacité de l'os à se remodeler peut varier en fonction de facteurs tels que l'âge ou le sexe [11-13]. Le remodelage est assuré principalement par deux familles cellulaires : les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse calcifiée et les ostéoblastes qui sont responsables de la formation de la nouvelle matrice osseuse au niveau du site de résorption [14]. Plus précisément, le remodelage est caractérisé par 4 phases différentes (**Figure 4**) : la phase d'activation, la phase de résorption, la phase d'inversion, et la phase de formation. Une cinquième phase, appelée phase de quiescence fait la jonction entre deux cycles de remodelage (**Figure 5**).

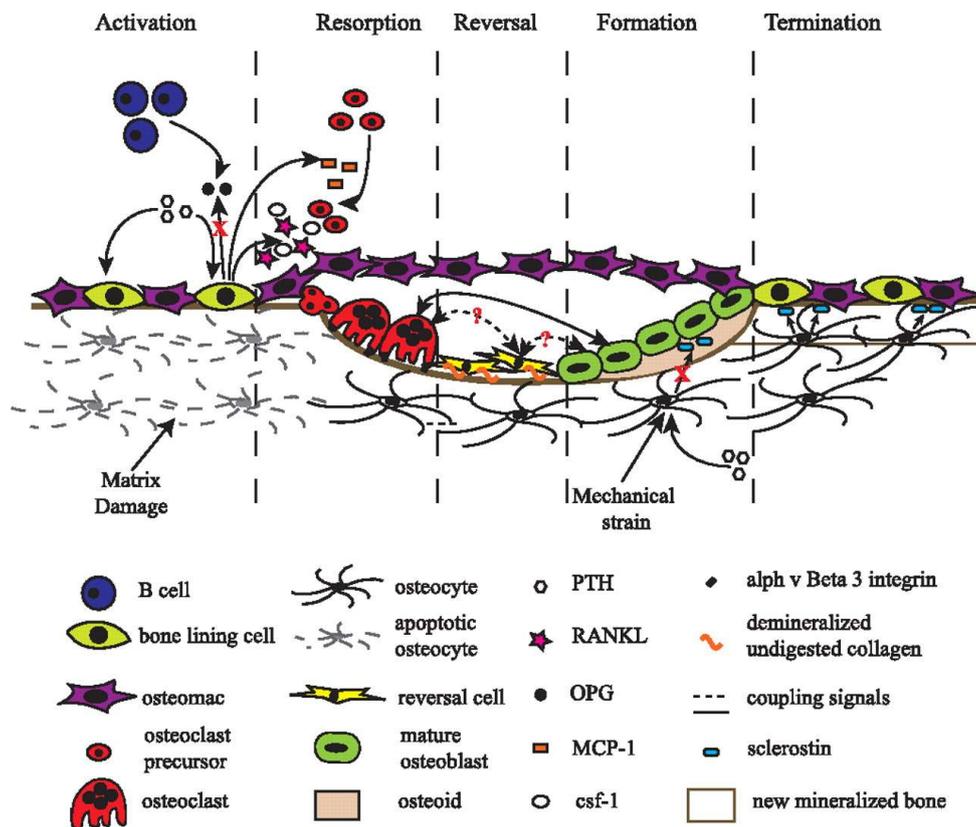
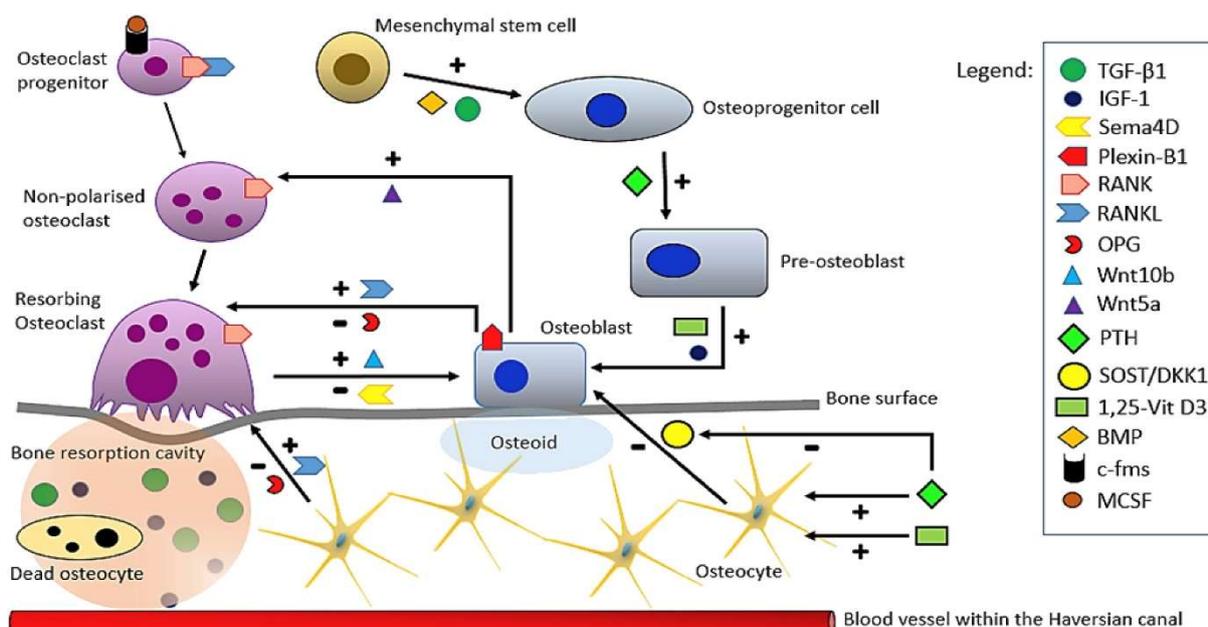


FIGURE 4 : DIFFERENTES PHASES DU REMODELAGE OSSEUX AU NIVEAU D'UNE BMU

Avant l'activation du remodelage, l'os est recouvert par des cellules bordantes. Le remaniement osseux s'accompagne de mécanismes apoptotiques locaux au niveau des ostéocytes. En réponse au relargage de la PTH, des préostéoclastes sont recrutés à la surface de l'os (*resorption*), le facteur RANKL induit leur différenciation. La phase d'inversion (*reversal*) permet d'éliminer le collagène non digéré de la surface de l'os. Puis les voies de signalisation activent la formation osseuse (*formation*). La PTH réduit la sécrétion de sclérostine par les ostéocytes permettant ainsi la formation osseuse. Enfin, la phase finale (*termination*) permet de rétablir la concentration de sclérostine initiale et de finaliser l'étape de minéralisation. Abréviations : PTH : Parathyroid hormone ; RANKL : RANK Ligand ; OPG : ostéoprotégérine ; MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1 ; csf-1 : Colony stimulating factor 1 [15].



**FIGURE 5 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LE REMODELAGE OSSEUX AU NIVEAU D'UNE BMU**

Les ostéocytes régulent la formation osseuse grâce au relargage d'antagonistes de la voie Wnt, SOST / DKK1, ce qui a pour effet d'inhiber l'action de la PTH. Dans la cavité de résorption osseuse, le calcium, TGF- $\beta$ 1 et IGF-1 sont relargués en réponse à l'activité ostéoclastique. Sema4D, sécrétée par les ostéoclastes inhibent la différenciation des ostéoblastes. A la fin de la phase de résorption, la migration des ostéoblastes est induite par la sécrétion de Wnt10b, ce qui entraîne à son tour l'inhibition de l'ostéoclastogénèse via la sécrétion d'OPG et de RANKL. Abréviations : TGF- $\beta$ 1 : *Transcription growth factor  $\beta$ 1* ; IGF-1 : *Insulin growth factor 1* ; RANK : *Receptor activator of nuclear factor kappa-B* ; RANKL : *RANK ligand* ; OPG : *osteoprotegerin* ; Wnt : *Wingless-related integration site* ; PTH : *Parathyroïd hormone* ; SOST : *Sclerostin* ; DKK1 : *Dickkopf related protein 1* ; BMP : *Bone morphogenic protein* ; c-fms : *colony stimulating factor 1 receptor* ; MCSF : *Macrophage colony stimulating factor* [16].

### 1.3.1. Les BMU : « basic multicellular unit »

Le remodelage osseux se produit par l'action concertée d'activité de plusieurs types cellulaires rassemblées autour d'une BME, dite « unité multicellulaire de base », décrites par *Frost et al.* Les BMU regroupent les ostéoclastes résorbant l'os, les ostéocytes de la matrice osseuse, les cellules bordantes recouvrant l'os, et les ostéoblastes recréant la matrice osseuse. C'est au sein de ces unités que se déroulent les différentes phases du remodelage osseux faisant intervenir l'activité de nombreuses cytokines, facteurs de croissance et facteurs hormonaux précédemment cités dans les **Figures 4** et **5** [7]. Ces derniers seront plus spécifiquement décrits dans le paragraphe *1.4 - Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage osseux*

### *1.3.2. La phase d'activation*

La première étape du remodelage implique la détection d'un signal d'initialisation au remodelage. Ce signal peut avoir plusieurs origines, telles qu'une stimulation mécanique importante, un signal hormonal (estrogène, PTH), ou encore suite à une lésion osseuse [17]. Dans des conditions basales, les ostéocytes secrètent le « transforming growth factor (TGF- $\beta$ 3) », qui inhibe l'ostéoclastogénèse [18]. Les dommages de la matrice osseuse contribuent à l'apoptose des ostéocytes et à une augmentation de l'ostéoclastogénèse.

De façon plus précise, la PTH est une hormone sécrétée par les glandes parathyroïdes, en réponse à une diminution du taux de calcium sérique. Elle agit de façon périphérique sur différents organes et tissus tels que les reins et l'os et active le récepteur transmembranaire couplé à la protéine G, à la surface des cellules ostéoblastiques. La liaison de la PTH à son récepteur entraîne en particulier l'activation de la protéine kinase A, la protéine kinase C et la voie de signalisation intracellulaire du calcium. Cela induit une cascade de signalisations ayant pour conséquence le recrutement des précurseurs des ostéoclastes, leur différenciation, et le début de la résorption osseuse [15].

### *1.3.3. La phase de résorption*

En réponse à cette phase d'activation, les ostéoblastes produisent en particulier une chimiokine : le « monocyte chemoattractant protein » (MCP-1), qui permet de recruter les précurseurs ostéoblastiques et d'augmenter l'ostéoclastogénèse induite par le facteur RANKL. De plus, les cytokines impliquées dans l'ostéoclastogénèse telles que le « Colony Stimulating Factor 1 » (CSF-1), le « Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand » (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), sont produites de façon plus importante par les ostéoblastes et sont également régulées par la PTH. L'expression d'OPG est réduite alors que la production de CSF-1 et RANKL est augmentée pour promouvoir l'activité des ostéoclastes. Le facteur CSF-1 est connu pour agir sur la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques alors que le facteur RANKL a un rôle dans la différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes matures. Les « matrix métalloprotéinases (MMPs) » sont également sécrétées par les ostéoblastes en réponse à un signal de remodelage. Les MMPs dégradent alors la surface non minéralisée des tissus osseux, et facilitent l'adhésion des ostéoclastes sur les sites minéralisés de la matrice. Les ostéoclastes créent ainsi un microenvironnement et entraînent la dissolution de la matrice minéralisée. Cette dissolution est liée au relargage d'ions H<sup>+</sup> par les ostéoclastes, créant ainsi un milieu acide et favorisant la dissolution de l'hydroxyapatite. Les ostéoclastes produisent ainsi des lacunes dites « lacunes de Howship ». Le reste de matrice osseuse organique est ensuite dégradée à l'aide d'enzymes lysant le collagène et agissant à pH bas.

#### *1.3.4. La phase d'inversion*

Cette phase suit la phase de résorption induite par les ostéoclastes. Les ostéoclastes meurent par apoptose et les lacunes formées sont recouvertes de matrice collagénique déminéralisée. Les cellules d'inversion vont éliminer ces résidus et préparer la surface de l'os pour permettre le recrutement des ostéoblastes.

Bien que leur nature ne soit pas tout à fait déterminée, les cellules d'inversion, probablement issues d'une lignée macrophagique, ont pour rôle de permettre la transition entre la résorption et la formation osseuse.

#### *1.3.5. La phase de formation*

Cette étape de formation osseuse dure plus longtemps que la phase de résorption. Elle implique la formation et la minéralisation d'un nouveau tissu osseux. Parmi les facteurs sollicités dans cette phase, nous citerons l'« Insulin-like growth factors I et II » (IGF-I et IGF-2) et le TGF- $\beta$ 1 qui restent des facteurs essentiels au recrutement des cellules souches mésenchymateuses sur le site de la résorption osseuse. Les préostéoblastes synthétisent alors une matrice extracellulaire. Les « bone morphogenic proteins » (BMP), sont synthétisées et vont jouer un rôle majeur dans la différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique.

Les ostéoblastes différenciés vont par la suite synthétiser une matrice ostéoïde qui va combler les lacunes de résorption. Les ostéoblastes, une fois la synthèse du tissu ostéoïde achevée, vont se transformer en cellules bordantes du tissu néoformé, puis les cellules emmurées dans cette matrice osseuse vont évoluer vers la cellule ostéocytaire.

#### *1.3.6. La phase de quiescence*

Cette étape correspond à la phase de repos, à la fin de la synthèse du tissu osseux néoformé. Lorsque le cycle de remodelage est réalisé, la quantité d'os formée reste la même que la quantité d'os présente avant le début du cycle.

Un déséquilibre entre les différentes phases de formation et de résorption peut conduire à des pathologies ostéoarticulaires, contribuer à une fragilité osseuse et à des risques importants de fractures. Les pathologies osseuses seront décrites dans la partie : [1.5. Déséquilibre du remodelage osseux et pathologies osseuses](#)

## 1.4. Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage osseux

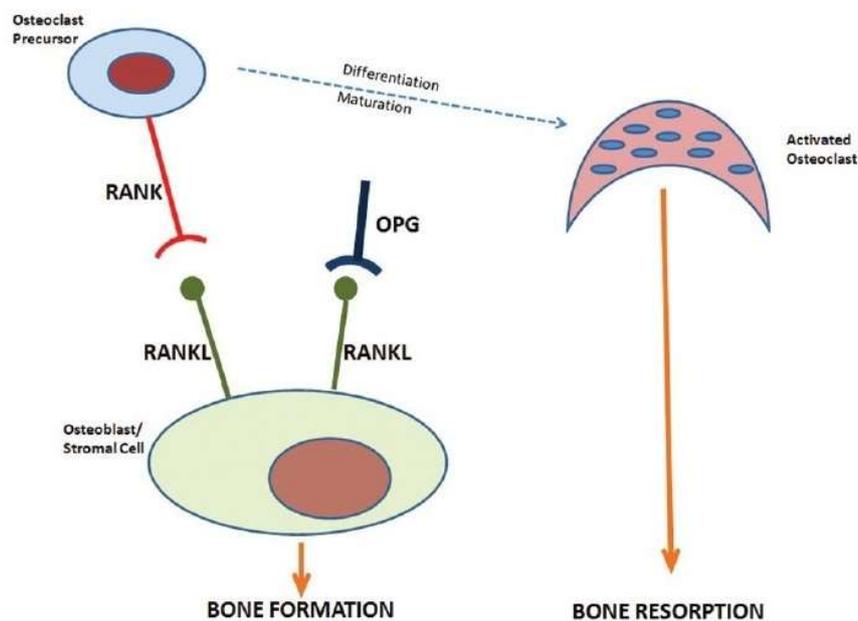
### 1.4.1. La voie RANK / RANKL / OPG

L'importance du système RANK / RANKL / OPG est bien définie dans la biologie osseuse (**Figure 6**).

L'ostéoprotégérine (OPG) joue un rôle important dans la régulation de sa densité et de sa masse osseuse. Le facteur RANKL a été identifié comme jouant un rôle particulier pour l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse.

Le facteur RANKL est une protéine transmembranaire de type I, appartenant à la famille des récepteurs TNF [19]. Il est exprimé par les précurseurs des cellules hématopoïétiques et par les ostéoclastes matures. Son récepteur le RANK, est exprimé par les cellules ostéogéniques stromales et les ostéoblastes.

Le facteur OPG agit comme un récepteur « leurre » dont l'association avec RANKL l'empêche de se lier à RANK. La surexpression d'OPG induit donc l'inhibition de la différenciation des ostéoclastes. La suppression d'OPG stimule quant à elle, le remodelage osseux [20-22]. L'expression d'OPG par les ostéoblastes est régulée notamment par des facteurs hormonaux tels que les œstrogènes ou encore par des facteurs de croissance, comme le TNF $\alpha$  [19, 23].



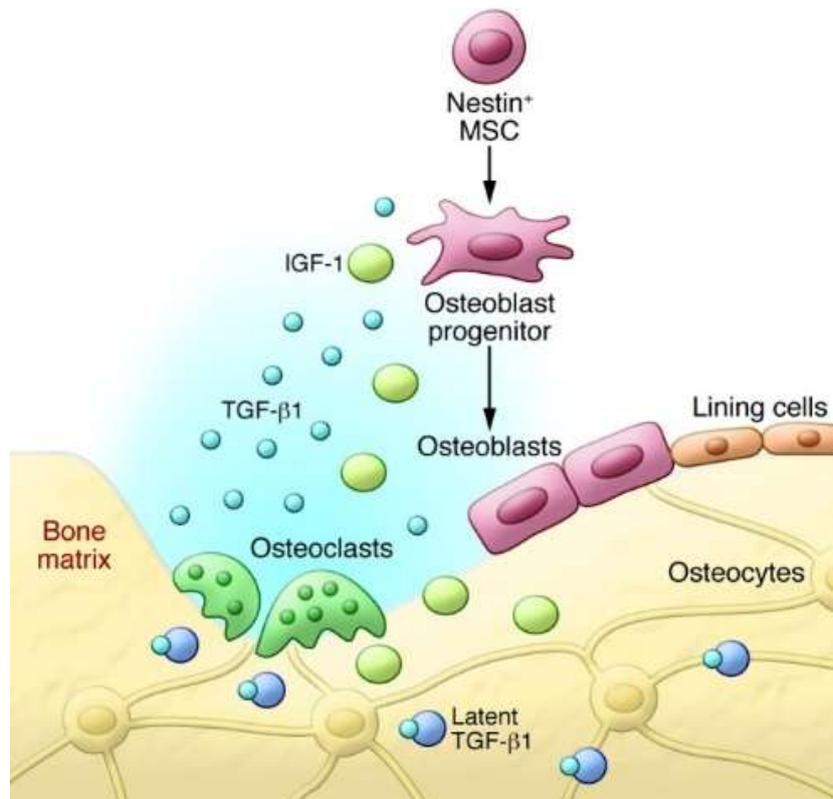
**FIGURE 6 : INTERACTIONS ENTRE LES RANKL RANK ET OPG AU COURS DE LA RESORPTION/FORMATION OSSEUSE**

Abréviations : RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ; RANKL : RANK ligand ; OPG : Osteoprotegerin [24]

### 1.4.2. Le TGF- $\beta$ et IGF-1

Le « **Transforming Growth Factor  $\beta$  1** » (TGF- $\beta$ 1), est un stimulateur chimiotactique de la différenciation des MSCs. Le TGF- $\beta$ 1 induit les signaux stimulant la synthèse des différentes BMPs. La voie de signalisation dans laquelle intervient le TGF- $\beta$ 1 promeut également la prolifération des cellules ostéoprogénitrices, la différenciation des lignées ostéoblastiques, l'activation de protéines kinases (MAPKs) et des protéines Smad 2/3 (**Figure 7**) [25].

L'« **Insulin Growth Factor 1** » (IGF-1), est également un facteur important dans la régulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) en ostéoblastes. Il est associé au maintien de la densité minérale osseuse réduisant en particulier les risques de fractures. En effet, une altération de la voie de signalisation du IGF-1 dans les MSCs entraîne une diminution de la masse osseuse [26-28]. Un modèle de génétique expérimentale chez les souris, dans lequel l'IGF-1 est invalidé, révèle une altération de la différenciation des ostéoblastes et une diminution de l'os trabéculaire formé [29].

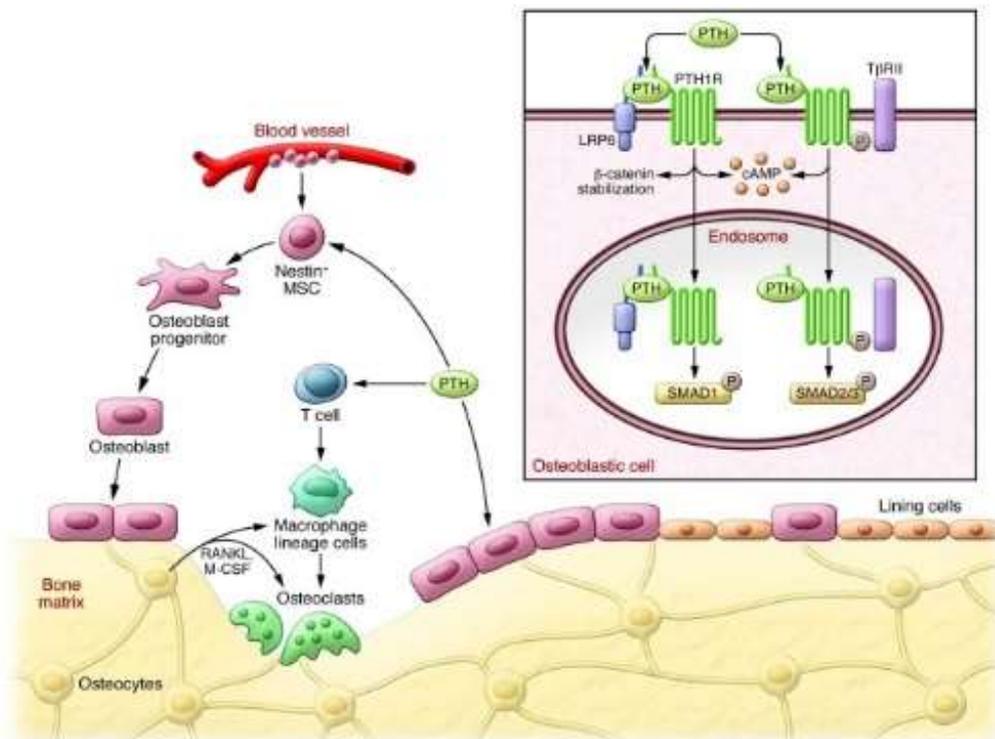


**FIGURE 7 : RECRUTEMENT DES MSCs PAR LE TGF-  $\beta$ 1 AU COURS DU REMODELAGE OSSEUX**

Le TGF- $\beta$ 1 induit la migration des MSCs (exprimant la nestine) jusqu'au site de remodelage [30, 31].  
Abréviations : MSC : Mesenchymal stem cells ; IGF-1 : Insulin growth factor 1 ; TGF- $\beta$ 1 : Transcription growth factor  $\beta$ 1

### 1.4.3. La PTH

La PTH est une hormone systémique, régulant l'homéostasie du calcium et jouant un rôle majeur dans le remodelage osseux en régulant les voies de signalisation ostéogéniques (**Figure 8**) [29]. La PTH est particulièrement impliquée durant la résorption osseuse par les ostéoclastes. Des facteurs de croissance et des cytokines sont relargués de la matrice osseuse tels que les facteurs TGF- $\beta$ , Wnts, et les BMPs. La PTH permet donc de réguler les activités cellulaires du tissu osseux, et de contrôler le processus de remodelage osseux.



**FIGURE 8 : MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT OSSEUX PAR LA PTH AU COURS DU REMODELAGE**

La PTH augmente l'activité ostéoclastique par une activation directe des cellules. Au cours du remodelage osseux, les facteurs tels que le TGF- $\beta$ , et IGF-1, sont libérés dans la moelle osseuse. La PTH orchestre la signalisation à travers les facteurs locaux TGF- $\beta$ , Wnts, et BMP. Ainsi, la PTH régule l'activité cellulaire des MSCs-nestin<sup>+</sup>, et des cellules T. Abréviations RANKL : RANK ligand ; PTH : Parathyroid hormone ; M-CSF : Macrophage colony stimulating factor ; PTH1R : Parathyroid hormone receptor 1 ; cAMP : cyclic Adenosin monophosphate. [30]

### 1.4.4. Les BMPs

Ces molécules sont impliquées dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes (**Figure 9**). Parmi les BMPs, les BMP2 et 7 sont les facteurs ostéoinducteurs les plus décrits pour stimuler la prolifération et la différenciation des MSCs.

La BMP2 est exprimée dès le premier jour de réparation d'une fracture. Les BMP6 et 9 ont également montré leur efficacité dans l'ostéoinduction *in vitro* [32]. Deux essais cliniques ont utilisé la BMP7 pour le traitement de fractures ouvertes du tibia et la BMP2 en ajout à des greffes d'os autologues pour le traitement de pseudarthroses [33, 34].

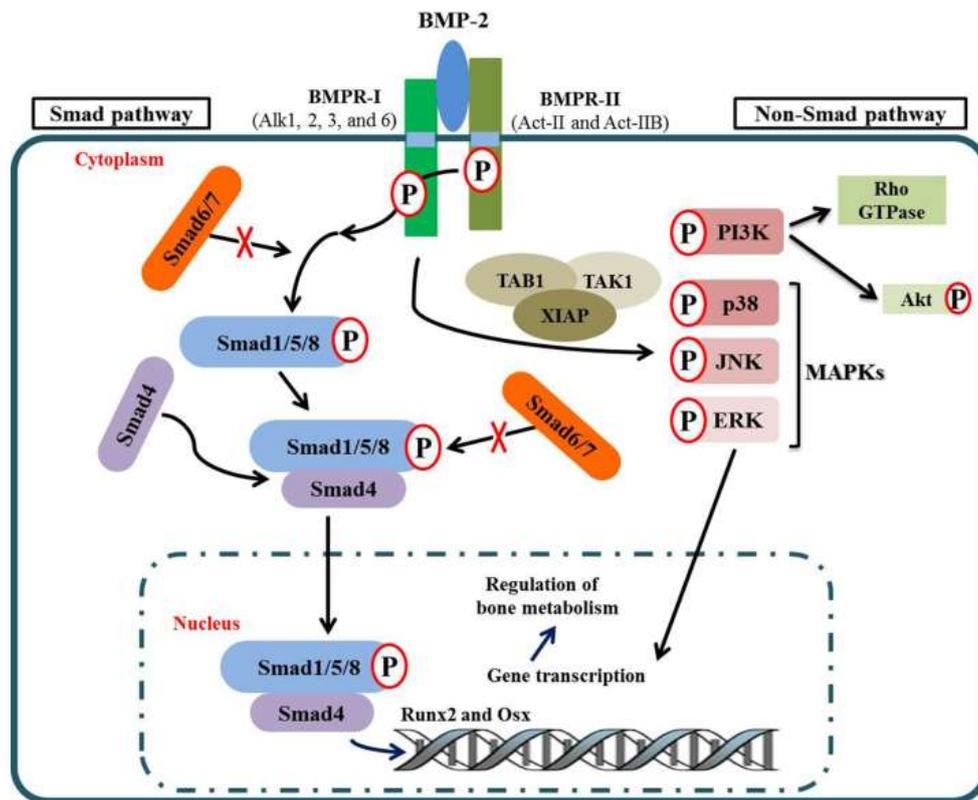


FIGURE 9 : VOIE DE SIGNALISATION DE LA BMP2

La voie de signalisation canonique dépendante de Smad est initiée par la liaison de BMP à son récepteur transmembranaire hétérodimérique (BMPR-I et BMPR-II). Cette liaison entraîne la phosphorylation du récepteur de type II (BMPR-II), qui va à son tour activer le récepteur de type I (BMPR-I). L'activation du récepteur entraîne la phosphorylation de Smad1/5/8 qui vont former un complexe avec Smad4, et transloquer jusqu'au noyau afin de moduler l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la régénération osseuse. Outre cette voie de signalisation, la BMP2 peut également activer la voie p38-ERK-JNK. Ces MAP kinases sont phosphorylées et transportées dans le noyau afin de moduler également l'expression de gènes spécifiques. *Abréviations* : BMPR : Bone morphogenic protein receptor ; BMP2 : Bone morphogenic protein 2 ; ERK : Extracellular signal regulated kinase ; JNK : c-JUN N-terminal kinases ; PI3K : phosphoinositide 3 kinase ; TAB1 : TAK1 activator ; TAK1 : TGFβ activated kinase 1 ; XIAP : X linked inhibitor of apoptosis protein ; MAPK : mitogen activated protein kinase. [25]

De multiples voies de signalisation, activées par les BMPs, sont impliquées dans les mécanismes d'ostéogénèse. La cascade de signalisation impliquant les BMPs est initiée au niveau de la surface cellulaire. Les BMPs se lient avec leurs récepteurs sous forme de dimères (BMPR-I et BMPR-II). L'activation de BMPR-II entraîne la phosphorylation de BMPR-I qui à son tour va phosphoryler les protéines Smad1, 5 et 8. Ces Smads activées vont ensuite se lier avec Smad4 qui est transloquée au niveau nucléaire (**Figure 9**). Le complexe Smad-Smad4, une fois

dans le noyau, active la transcription des gènes maîtres de la différenciation ostéoblastique tels « runtrelated transcription factor 2 » (Runx2) ou encore le facteur Osterix (Osx).

Les BMPs utilisent également des voies de signalisation indépendantes de la voie Smad, notamment *via* la voie de signalisation des MAP kinases. En effet, la voie p38/ERK/MAPK est également sollicitée pour l'induction de la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse [25].

### 1.5. Déséquilibre du remodelage osseux et pathologies osseuses

Lorsqu'une ou plusieurs voies de signalisation impliquées au niveau de la formation ou de la résorption osseuse sont dérégulées, c'est tout l'équilibre du tissu osseux, sa microarchitecture, ses fonctions biologiques, mécaniques, qui peuvent être modifiées. Le déséquilibre de ce remaniement osseux a pour conséquence un certain nombre de pathologies osseuses conduisant pour certaines à un risque accru de fractures.

#### 1.5.1. L'ostéoporose

L'ostéoporose, est une maladie caractérisée par une diminution de la masse et de la densité osseuse, rendant ainsi plus fragiles les structures osseuses et pouvant entraîner un grand risque de fractures. Cette pathologie est principalement due à une résorption osseuse accrue [35]. Deux formes d'ostéoporose ont été identifiées : l'ostéoporose de type I liée à une carence en œstrogènes résultant de la ménopause (également appelée ostéoporose post-ménopause), et l'ostéoporose de type II (également appelée ostéoporose corticale) (**Figure 10**).

Concernant l'ostéoporose de type I, un déficit en œstrogènes a un impact sur une des voies de signalisation impliquant le facteur RANKL. Il a été montré qu'une carence en œstrogènes entraînait en particulier une augmentation de l'ostéoclastogénèse [36].

Concernant l'ostéoporose de type II, celle-ci affecte à la fois les hommes et les femmes, et intervient après 75 ans. Elle ne semble pas être liée à un changement hormonal tel que celui identifié lors de la ménopause. Elle peut être causée en particulier par une forte carence en calcium [36].

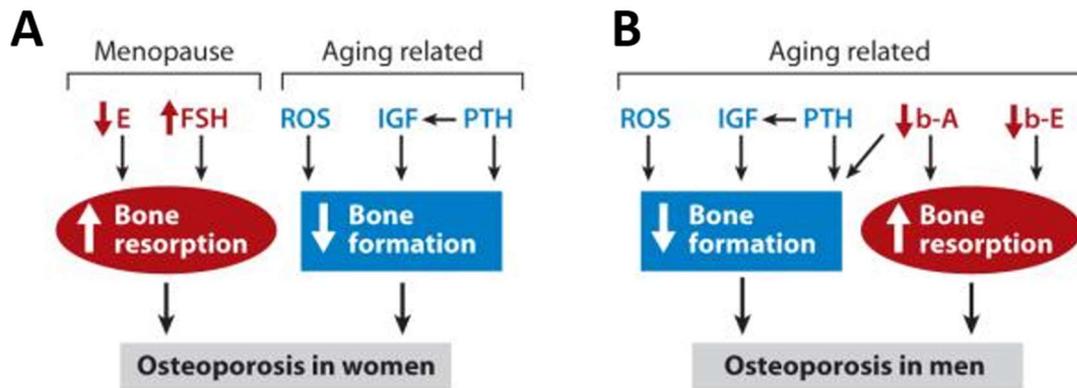


FIGURE 10 : MECANISME DE L'OSTEOPOROSE

(A) Mécanisme physiopathologique de l'ostéoporose chez la femme. (B) Mécanisme physiopathologique de l'ostéoporose chez l'homme. Les flèches symbolisent les augmentations et diminutions des concentrations des différentes molécules. Abréviations: A, androgen; b, bioavailable; E, estrogen; FSH, follicle-stimulating hormone; IGF, insulin-like growth factor; PTH, parathyroid hormone; ROS, reactive oxygen species [36].

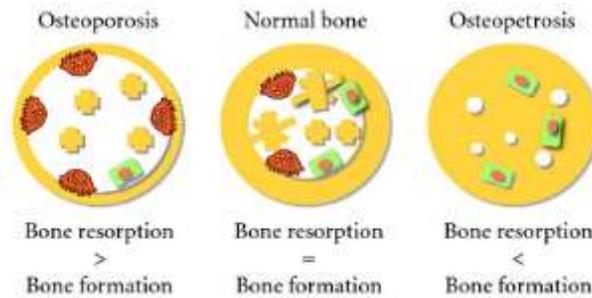
### 1.5.2. La maladie de Paget

La maladie de Paget se caractérise par une stimulation de la formation osseuse par les ostéoblastes. Elle peut conduire à une difformité osseuse et à de fortes douleurs [37]. Le déclenchement de cette maladie serait lié à une augmentation de l'activité de résorption des ostéoclastes, entraînant une augmentation de l'activité des ostéoblastes afin de combler les lacunes formées. L'os nouvellement formé possède cependant une structure désorganisée, un os trabéculaire anormal, des zones d'ossifications plus épaisses, d'autres beaucoup plus fines et d'une porosité anormale [36]. Cette pathologie atteint à la fois les hommes et les femmes.

### 1.5.3. L'ostéopétrose

L'ostéopétrose fait référence à une pathologie osseuse caractérisée par un épaississement et un durcissement du squelette (**Figure 11**).

D'un point de vue expérimental, ce phénotype a été observé à l'aide d'un modèle de souris surexprimant l'ostéoprotégérine. Ces souris qui présentent une diminution, voire une absence du nombre d'ostéoclastes au sein des structures osseuses. Des mutations affectant les ostéoclastes pourraient également être liées à cette pathologie [19, 36].



**FIGURE 11 : PATHOLOGIES LIEES AU DESEQUILIBRE DE LA RESORPTION/FORMATION OSSEUSE**

Les physiopathologies osseuses telles que l'ostéoporose, et l'ostéopétrose, sont liées à un déséquilibre entre la formation osseuse et la résorption osseuse, conduisant à une altération des propriétés histomorphométriques du tissu osseux et de sa microarchitecture [38].

Ainsi ces différents types de pathologies osseuses, peuvent conduire à des fragilités de sites et contribuer à des fractures de volumes plus ou moins importants. De part les activités cellulaires liées au remaniement tissulaire, les lésions osseuses de petit volume pourront être réparées et conduire à un tissu fonctionnel. Deux types de mécanismes sont sollicités : l'ossification endochondrale et membranaire (décrits dans les paragraphes : 5.1.1 *Ossification membranaire* et 5.1.2 *Ossification endochondrale*).

Pour des pertes osseuses massives et complexes, le chirurgien devra alors avoir recours à d'autres techniques de reconstruction osseuse. Cette partie sera présentée dans le paragraphe 2. [LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION OSSEUSE](#).

## 2. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION OSSEUSE

En cas de lésions trop importantes (fracture de grande taille, ostéotomie chirurgicale, résection d'une tumeur osseuse), l'os perd sa capacité à se régénérer seul et de façon fonctionnelle [39].

Selon le volume, la complexité, et le site de ces lésions, différentes stratégies de reconstruction sont proposées. Ces stratégies devront être également adaptées aux patients et pourront dans certains cas faire appel à une médecine personnalisée.

### 2.1. Les plaques de reconstruction

Les plaques et vis de reconstruction sont des dispositifs synthétiques très utilisés, notamment en orthopédie, ou encore pour les reconstructions mandibulaires. Les métaux les plus utilisés sont l'acier inoxydable, le titane et le vitallium (alliage de cobalt, de chrome et de molybdène) [40]. Ces approches permettent une cicatrisation rapide si le tissu mou disponible localement

est suffisant. De plus l'évolution de la technique rend cette approche moins invasive et moins délétaire pour le réseau vasculaire environnant. Les inconvénients majeurs de ces plaques et vis sont liés à la présence d'un matériel étranger, à des risques d'infection et/ou de rejet.

## 2.2. Les greffes osseuses

Il existe principalement deux types de greffes possibles : les autogreffes et les allogreffes.

L'autogreffe réalisée à partir d'os du patient, est toujours considérée comme la technique de référence garantissant une parfaite biosécurité pour le patient. Cette méthode est la plus efficace en termes de régénération osseuse puisqu'elle favorise l'ostéoconduction, induit la différenciation des cellules souches locales en cellules osseuses (ostéoinduction) sans aucune réponse immunitaire ou rejet associés. Cependant, l'autogreffe présente certains désavantages, tels que la quantité limitée d'os disponible et une morbidité au niveau du site donneur [41]. Les allogreffes peuvent permettre de pallier ces différents inconvénients.

L'allogreffe consiste à transplanter de l'os cortical et trabéculaire d'un tissu donneur vers le patient. Le plus souvent, ces os sont prélevés au niveau de pelvis de cadavre, ou de tête fémorale retirée lors de remplacement total de hanche. Les greffes d'os allogéniques sont ostéoconductrices, mais présentent une ostéoinduction très limitée. Néanmoins, les inconvénients liés à une telle technique sont principalement le risque de transmission virale, des infections bactériennes, et des risques de rejet en dépit des traitements et des procédures de préparation des allogreffes [41].

En effet, dans le cadre des allogreffes, les patients doivent subir des traitements immunosuppresseurs afin d'éviter un rejet du greffon.

Les méthodes de préparation du greffon peuvent varier (utilisation de banque de tissu osseux, os lyophilisé, cryoconservation, ...), entraînant pour certaines de ces méthodes une diminution de la qualité de la greffe.

Un autre facteur pouvant influencer la qualité de l'allogreffe est la façon dont le matériel biologique est traité avant implantation. Il peut être déminéralisé, lyophilisé, congelé à l'état frais, stérilisé...

Toutes ces techniques peuvent avoir des effets variables sur les propriétés mécaniques du tissu osseux [42].

Enfin, un dernier critère à prendre en considération, est le risque d'absence de consolidation de la lésion dû à la différence de qualité entre l'os receveur et l'os donneur [43].

Les différents avantages et inconvénients de ces types de greffes sont résumés dans le **Tableau 1**.

	Avantages	Inconvénients
Autogreffe	Ostéogénique Ostéoconductrice Ostéoinductrice	Augmentation de la morbidité du patient (douleur, infection du site donneur)  Quantité disponible limitée
Allogreffe	Ostéoconductrice  Disponibilité importante  Pas de morbidité au niveau du site donneur	Perte des propriétés ostéogéniques  Manque de vascularisation  Fort risque de rejet  Risque de transmission virales  Coût élevé

**TABLEAU 1 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTS TYPES DE GREFFES OSSEUSES**

Adapté de [16]

### 2.2.1. Greffe d'os non vascularisé

Le premier transfert de lambeau non vascularisé a été réalisé en 1974 à l'aide d'un morceau de fibula, dans le but de reconstruire une lésion traumatique du tibia d'une taille de 12,5 cm [44].

Site	Nombre de transplantations
<b>Donneur</b>	
Péronné	198
Crête illiaque	180
Radius	4
Côtes	1
Métatarse	1
Total	384
<b>Receveur</b>	
Mandibule	267
Maxillaire	20
Clavicule	1
Humerus	8
Radius	16
Pelvis	2
Ulna	5
Main	3
Fémur	11
Tibia	47
Pied	4
Total	384

**TABLEAU 2 : PRESENTATION DES SITES DONNEURS ET RECEVEURS POUR LA TRANSPLANTATION D'OS**

Adapté de [44]

Cette technique est principalement utilisée pour des petites lésions mandibulaires avec peu ou pas de perte des tissus mous environnants. De façon générale, la greffe osseuse est placée dans un site receveur déjà bien vascularisé. Les sites donneurs les plus répandus pour une greffe d'os non vascularisés sont le péroné et la crête iliaque (**Tableau 2**).

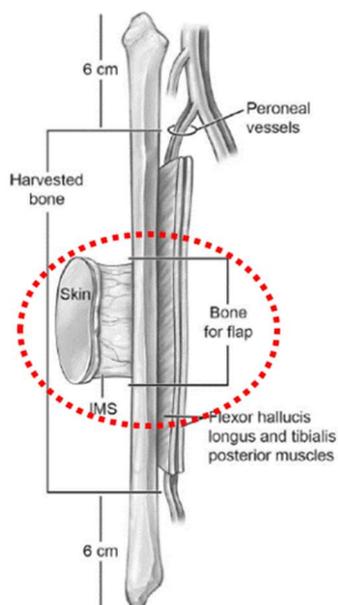
Le principal inconvénient de cette technique est la fragilité du réseau vasculaire post-opération, empêchant, entre autre, un traitement radiothérapique à la suite. Le second inconvénient correspond à des complications propres à la présence d'un second site opéré (morbidité du site donneur). Les travaux d'Okoturo [45] ont montré, qu'à court terme, les greffes de crête iliaque non vascularisées dans le cadre de reconstruction mandibulaire présentaient néanmoins un faible taux de complication.

### 2.2.2. Greffe de lambeau libre vascularisé

L'os vascularisé, lorsqu'il est greffé, permet une régénération tissulaire « indépendante » du site receveur. A titre d'exemple, le transfert de lambeau libre de péroné comme première greffe osseuse microchirurgicale a été décrit en 1975 par Taylor [46], puis utilisé pour une reconstruction mandibulaire à la fin des années 1980 [47, 48] par l'équipe de Hidalgo *et al.*

Comme pour la greffe non vascularisée, les deux sites donneurs privilégiés sont le péroné (**Figure 12**) et la crête iliaque (**Figure 13**).

La greffe de lambeau libre du péroné autorise un prélèvement de tissu jusqu'à 25 cm d'os. Une des limites de cette technique est la quantité de tissu mou qui peut être transférée [49].



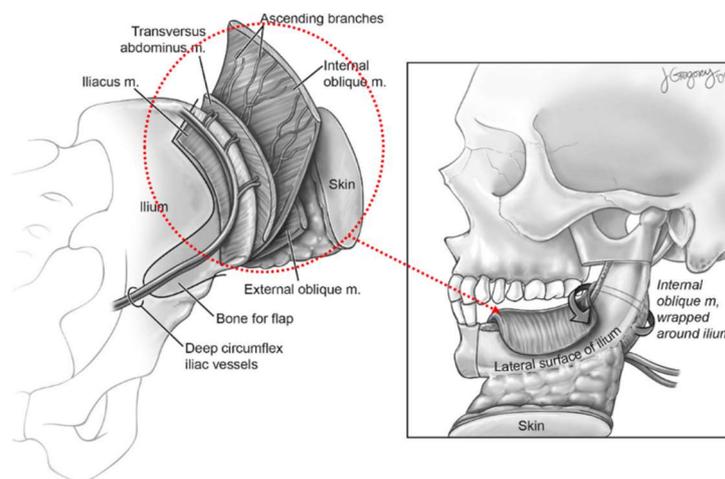
**FIGURE 12 : PRELEVEMENT D'UN LAMBEAU LIBRE VASCULARISE AU NIVEAU DU PERONE**

Les pointillés rouges représentent la portion de lambeau libre vascularisé prélevé au niveau du péroné [49]

La greffe à partir de la crête iliaque, quant à elle, permet par exemple, de par sa forme, d'avoir un angle osseux similaire à celui de la mandibule. De plus, l'os de la crête iliaque possède une hauteur comparable à celle de la mandibule native, ce qui en fait un excellent support pour les implantations dentaires. Cependant, il ne permet pas la reconstruction de lésion de taille supérieure à 9 cm [49, 50].

Les avantages et inconvénients de ces deux sites de prélèvement osseux sont présentés dans le **Tableau 3**.

Au côté de la crête iliaque et du tibia, le radius peut également faire l'objet d'un prélèvement tissulaire.



**FIGURE 13 : PRELEVEMENT D'UN LAMBEAU LIBRE AU NIVEAU DE LA CRETE ILIAQUE**

Les pointillés rouges représentent la portion de lambeau libre vascularisé prélevé au niveau de la crête iliaque. La flèche indique la zone greffée [49]

Toutefois, le péroné et la crête iliaque offrent tous deux des sites de prélèvement qui présentent un excellent apport sanguin et semblent conserver leurs caractéristiques osseuses lorsqu'ils sont transplantés.

Enfin, les os greffés répondent à la loi de Wolff et au stress induit par le site receveur [51]. La loi de Wolff est un principe énoncé à la fin des années 1890 stipulant que « la forme extérieure d'un os s'adapte en fonction des contraintes auxquelles l'os est soumis » [52].

Origine	Avantages	Inconvénients
Crête iliaque	Gros volume osseux Riche en cellules progénitrices et facteurs de croissance Fournit à la fois de l'os cortical et spongieux	Risque de lésions nerveuses et artérielles Hématome Douleur chronique au niveau du site opéré Morbidity importante Délai de guérison élevé Risque de fracture du pelvis et de luxation de la hanche Coûteux Risque d'infection
Radius distal	Plus faible renouvellement osseux que la crête iliaque Douleurs post-opératoires plus faibles que la crête iliaque Facilité de prélèvement (petite incision)	Risque de lésion du nerf radial supérieur Risque de fracture Infection
Tibia	Facilité d'accès Faible temps opératoire Moins d'impact sur la démarche du patient que la crête iliaque	Risque de fractures Moins de volume osseux que la crête iliaque Infection

TABLEAU 3 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTS SITES DE PRELEVEMENT OSSEUX

[25]

### 2.3. Technique d'Ilizarov

Dans le cadre de pertes de tissu osseux au niveau des os longs, la procédure la plus commune pour la reconstruction est le transfert d'os libre vascularisé (décrit précédemment), ainsi que l'ostéosynthèse grâce à des fixateurs externes en suivant la méthode d'Ilizarov décrite dans les années 1970.

Cette technique consiste à poser un fixateur externe autour du membre lésé. Cette cage métallique est fixée à l'os par des broches de mise en tension, comme illustré dans la **Figure 14**. Cette technique permet l'allongement de structures osseuses. La structure métallique ronde permet une bonne répartition du stress mécanique le long du membre, et son aspect modulable lui permet de s'adapter au patient. Bien que les résultats obtenus après l'utilisation de la technique d'Ilizarov soient satisfaisants, sa mise en place reste délicate. Le matériel requis pour cette technique doit être bien toléré en raison de son important volume, et les risques d'infection restent présents [53]. Enfin, d'un point de vue pratique, le patient reste très limité dans ses mouvements tout au long du traitement du fait du volume de la cage.

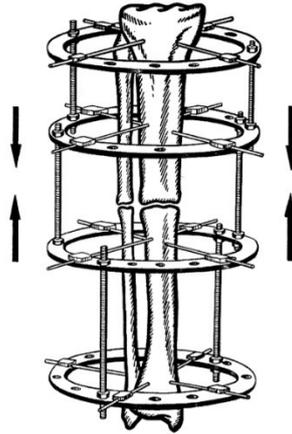


FIGURE 14 : SCHEMA ILLUSTRANT LA TECHNIQUE D'ILIZAROV

La cage métallique permet le maintien des extrémités osseuses. Les flèches représentent le sens de croissance de l'os nouvellement formé [53].

## 2.4. Technique de Masquelet

### 2.4.1. Principe de la technique

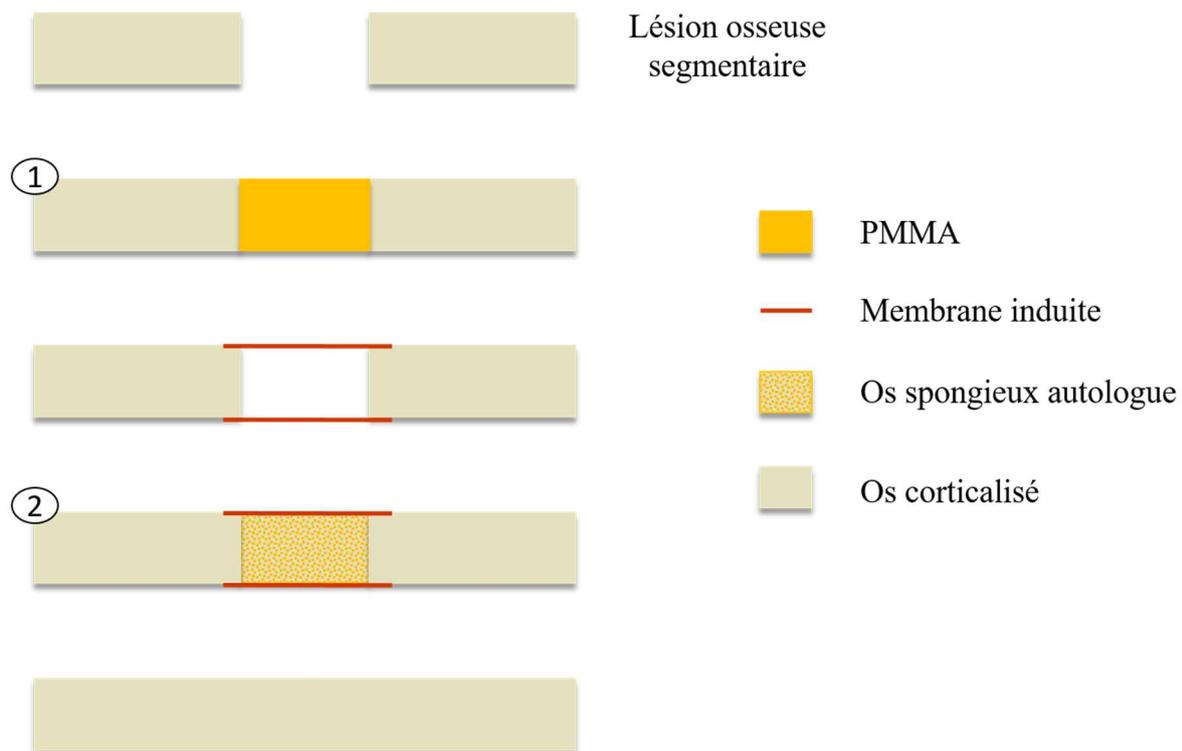
Masquelet a mis au point, dans les années 2000, une technique permettant de limiter les mécanismes de résorption osseuse des greffes osseuses. Cette technique est peu à peu devenue une référence dans le domaine de l'orthopédie et la chirurgie maxillo-faciale [54]. Une étude clinique est actuellement en cours, comparant l'efficacité de la technique d'une cage métallique en titane, par rapport à la technique de Masquelet pour le traitement de larges lésions au niveau des os longs. (Référence de l'étude clinique en cours : NCT02015390 [55]).

La reconstruction osseuse par la technique de Masquelet se fait en deux étapes chirurgicales (**Figure 15**).

La première étape comprend un débridement radial des extrémités osseuses et tissulaires. Un ciment chirurgical (polyméthacrylate de méthyle, PMMA) est ensuite inséré au niveau de la lésion osseuse. Des plaques d'ostéosynthèses servent à maintenir les extrémités osseuses.

La seconde étape est réalisée deux mois plus tard, lorsque les tissus mous sont complètement cicatrisés, et qu'une membrane dite « induite » (MI) s'est formée autour du ciment utilisé dans cette technique comme conformateur. La membrane est incisée, le PMMA est retiré. Les extrémités osseuses sont avivées, et la cavité créée par le retrait du ciment est comblée avec de l'os autologue spongieux provenant le plus souvent de la crête iliaque. L'absence d'infection pendant les deux mois suivant la première étape est une bonne indication pour procéder à l'étape chirurgicale suivante [56].

Ce ciment ou conformateur, a pour principales missions d'empêcher l'affaissement des tissus mous et la pénétration de tissus fibreux dans la cavité. Il montre également un rôle biologique puisqu'il induit la formation d'une membrane fibreuse vascularisée l'entourant, en réaction à un corps étranger [54, 57].



**FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TECHNIQUE DE MASQUELET**

(1) Mise en place du PMMA au niveau du défaut osseux et induction de la formation de la membrane ; (2) Retrait du PMMA et comblement de la membrane induite par de l'os spongieux autologue. *Abréviation : PMMA : polyméthacrylate de méthyle*

#### 2.4.2. Rôle de la membrane induite

Plusieurs études ont démontré que cette membrane ainsi formée au contact du conformateur exerçait un rôle biologique sur la réparation de la lésion osseuse.

L'étude histologique de la membrane induite, obtenue dans un modèle expérimental réalisé chez le lapin [56], a permis de mettre en évidence la présence d'un épithélium pseudo-synovial richement vascularisé. Cette analyse histologique et immunohistochimique montre également la présence de fibroblastes et de myofibroblastes, de collagène, ainsi qu'une sécrétion de facteurs de croissance ostéogéniques et angiogéniques (VEGF, TGFβ1 et BMP2).

Le concept de membrane induite ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la reconstruction osseuse. Enfin, elle offre une protection de la greffe contre la résorption, un cocktail de facteurs de croissance pouvant activer la régénération osseuse.

#### *2.4.3. Avantages, inconvénients et améliorations à apporter*

Les avantages de cette technique sont non négligeables. En effet, elle s'applique à la reconstruction osseuse de volumes importants et de formes complexes. Bien que cette technique se déroule en deux étapes chirurgicales, elle est relativement simple à mettre en place. De plus, en cas d'échec, elle peut être à nouveau reprise après un faible temps de latence.

Cependant, un des inconvénients principaux est la présence de deux sites opératoires lors du deuxième temps chirurgical (prélèvement de l'autogreffe). Ainsi, il serait intéressant de supprimer ce deuxième site de prélèvement afin de limiter les risques pour le patient. Le remplacement de la greffe d'os autologue par la mise en place d'un matériau ostéoinducteur au niveau de la cavité laissée par le ciment pourrait être une alternative, et fait partie des stratégies d'amélioration de cette technique.

Dans ce même objectif, et pour limiter les risques infectieux, l'utilisation d'un PMMA couplé à des antibiotiques permettrait de prévenir les infections [58]. Parmi ces antibiotiques, la gentamycine est l'antibiotique le plus fréquemment chargé dans les ciments osseux car il possède un large spectre antimicrobien et possède la capacité de supporter les hautes températures (générées notamment pendant la polymérisation du ciment). D'autres antibiotiques peuvent également être inclus dans le ciment, tels que la clindamycine ou encore la vancomycine [59].

Dès les années 2000, la BMP7 a été associée avec la greffe d'os autologue afin de stimuler la formation d'os cortical. De nombreux travaux expérimentaux ont démontré l'intérêt de la BMP7 et de la BMP2 dans la régénération osseuse [32]. Bosemark et son équipe ont montré que l'ajout de BMP7, lors du comblement du défaut, permettait d'augmenter le potentiel ostéoinducteur de cette technique de Masquelet [60]. Néanmoins, leur utilisation clinique reste limitée à certaines applications et dans tous les cas ne peuvent être utilisées dans un contexte oncologique.

Enfin, actuellement, le ciment chirurgical utilisé pour la première étape de comblement est du PMMA. Ce conformateur présente cependant quelques inconvénients, et notamment la fusion avec les extrémités osseuses de la lésion, ce qui rend son retrait complexe et augmente les risques de lésion des tissus environnant ou une détérioration de la membrane induite. Or, d'autres matériaux pourraient potentiellement être utilisés (silicone, prothèse d'expansion adaptée, ...), permettant par exemple de limiter la fusion des extrémités osseuses avec le ciment. Cette alternative a notamment été étudiée au sein de notre laboratoire [61].

#### 2.4.4. Technique de Masquelet et reconstruction en territoires irradiés

La reconstruction osseuse des territoires irradiés soulève de nombreux problèmes liés aux dommages induits par la radiothérapie sur les sites receveurs [62]. Compte tenu des volumes importants des lésions tissulaires suite à la résection de tumeur, la technique de Masquelet représente une stratégie de choix pour reconstruire de telles lésions complexes. La radiothérapie, réalisée au cours des différentes étapes de reconstruction, peut entraîner des modifications de la fonction biologique de la membrane induite.

La littérature a montré que la radiothérapie, après la première étape chirurgicale, pouvait entraîner des modifications histologiques de la membrane, sans toutefois avoir un effet significatif sur son épaisseur. Des travaux réalisés ont montré que les propriétés biologiques de la membrane semblaient préservées lorsque le traitement de radiothérapie avait lieu avant les deux étapes chirurgicales [61].

Ainsi, les différentes techniques de reconstruction osseuse présentées dans ce paragraphe, peuvent s'avérer inefficaces pour des situations cliniques complexes. L'ingénierie tissulaire peut apporter d'autres solutions innovantes qui peuvent permettre de palier les inconvénients cités ou améliorer les techniques existantes.

### 3. L'INGENIERIE TISSULAIRE

#### 3.1. L'ingénierie tissulaire : définition

Les termes d'ingénierie tissulaire et de biomatériaux ont été définis en 1987 comme suit : « *La mise en œuvre des principes et méthodes d'ingénierie et des sciences de la vie pour une compréhension des structures et fonctions des tissus normaux et pathologiques, et du développement de substituts biologiques pour restaurer, maintenir et améliorer la fonction de ces tissus* [63] ». L'ingénierie tissulaire est donc un domaine interdisciplinaire et translationnel faisant intervenir différents acteurs, cellulaires, moléculaires et mécaniques, afin de régénérer de nouveaux tissus dans un environnement spécifique (**Figure 16**) [64, 65].

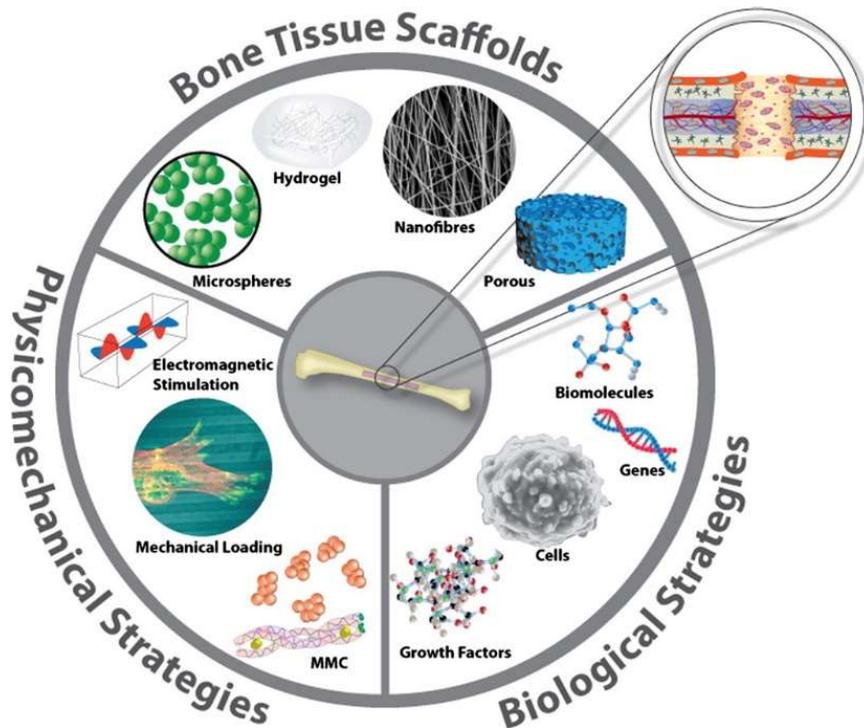


FIGURE 16 : COMPOSANTS FONDAMENTAUX POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

[66]

Le développement de la médecine régénératrice et de l'ingénierie tissulaire depuis ces dix dernières années relève d'un véritable besoin clinique lié à une population vieillissante, et qui sollicite des stratégies de reconstruction innovantes, garantissant une parfaite biosécurité pour les patients.

D'un point de vu démographique, selon l'Organisation des Nations Unies (ONU), en 2013, 841 millions de personnes avaient plus de 60 ans. En 2050, les estimations prévoient environ 2 milliards de personnes ayant plus de 60 ans [39, 64, 67].

Face à cette poussée démographique et aux difficultés rencontrées par les stratégies de reconstruction osseuse précédemment citées (autogreffes, allogreffes, ...), les chirurgiens ont de plus en plus recours à l'utilisation de biomatériaux et de substituts osseux. Ceux-ci existent depuis de très nombreuses années et possédaient des fonctions de suppléance et/ou de comblement. Avec l'ingénierie tissulaire, ces matériaux ont pris une autre dimension biologique. Ils doivent offrir un véritable environnement tridimensionnel, un fort pouvoir ostéogène conféré ou non par l'intermédiaire de composantes cellulaires et / ou de facteurs biochimiques. L'interface entre la science des matériaux, la biologie et la physique a fait naître de nouveaux biomatériaux pour de nombreuses applications médicales. Le paragraphe suivant présente le cahier des charges d'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

### 3.2. Le cahier des charges d'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Un grand nombre de travaux ont été rapportés dans la littérature au cours de ces dernières décennies, décrivant à la fois le développement de matériaux naturels, synthétiques, utilisés seuls, ou associés à des cellules et / ou des facteurs de croissance.

Afin de correspondre au mieux au tissu cible, le tissu osseux, le biomatériau utilisé pour le développement d'un produit d'ingénierie tissulaire doit présenter des caractéristiques structurales, biologiques et mécaniques résumées dans le **Tableau 4**. Il doit être biocompatible, biodégradable, posséder des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu cible, et présenter une porosité adaptée à la colonisation cellulaire et tissulaire.

Biocompatibilité	Promouvoir une activité cellulaire normale, sans induire de cytotoxicité au niveau du tissu hôte, et plus particulièrement lors de sa dégradation.
Biodégradabilité (bioresorbabilité)	Avoir un taux de dégradation de la matrice contrôlable (ou non) au court du temps, afin de céder la place à l'os néoformé.
Propriétés mécaniques	Posséder des propriétés mécaniques similaires à la fois à celles de l'os cortical et de l'os spongieux.
Porosité Taille des pores	Posséder une porosité suffisante et un diamètre optimal des pores pour permettre la diffusion de nutriments, de l'oxygène, la migration, la prolifération et l'invasion tissulaire du matériau

TABLEAU 4 : CAHIER DES CHARGES D'UN BIOMATERIAU POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

Adapté de [16]

En terme de porosités, il existe différentes échelles. On parle de macroporosité lorsque la taille des pores est supérieure à 100  $\mu\text{m}$ . Lorsque la taille des pores est inférieure à 100  $\mu\text{m}$ , on parle alors de microporosité. Le terme de porosité, ou volume poreux, du matériau désigne le pourcentage de volume d'un matériau étant constitué de pores. Il a été démontré qu'une taille de pore minimum de 100  $\mu\text{m}$  est nécessaire pour favoriser une colonisation cellulaire. Pour une croissance osseuse optimale, la taille des pores idéale est de l'ordre de 200 à 350  $\mu\text{m}$  [41].

La notion de microporosité d'un biomatériau est tout aussi importante pour ces propriétés biologiques. En effet, Woodard *et al.*[68], ont montré qu'une matrice de HA contenant des micropores permettait une minéralisation en site ectopique alors que la même matrice, macroporeuse ne permettait pas l'observation de ce processus de minéralisation. Cela a également été mis en évidence pour la création d'un nouveau réseau vasculaire [69, 70].

Enfin, ce biomatériau doit être **ostéoconducteur** et faciliter la néoformation osseuse à son contact. Idéalement, il doit aussi être **ostéoinducteur**, à savoir, être capable de recruter les

cellules indifférenciées et de les orienter vers un lignage ostéoblastique) [71]. Mais il doit également permettre la néovascularisation des tissus néoformés.

### 3.3. Les différents types de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Nous présenterons dans ce paragraphe les principales familles de matériaux dédiés à la régénération osseuse. Les différents exemples de matériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire osseuse sont listés dans le **Tableau 5**, ainsi que leurs avantages et inconvénients pour leur utilisation dans le cadre de la régénération osseuse.

Matériau	Exemples	Avantages	Inconvénients
Polymères	Naturels Protéines : collagène, fibrine, gélatine  Polysaccharides : alginate, agarose, chitosane, dextrane, pullulane, cellulose	Biodégradabilité Biocompatibilité Bioactivité	Faible résistance mécanique Taux de dégradabilité élevé Forte variation inter-lots
	Synthétiques Poly-(ε-Caprolactone), PolyGlycolic Acid, PolyLactic Acid, Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)	Biodégradabilité Biocompatibilité	Faible résistance mécanique Forte concentration d'acide libérée lors de la dégradation
Céramiques	Phosphates de calcium Hydroxyapatite (corallien ou synthétique), β-phosphate tricalcique, Phosphate dicalcique dihydraté	Biocompatibilité Biocompatibilité Bioactivité Ostéoconductivité	Taux de dégradation variables Fragile Faible ténacité
	Bio-verres Verre bioactif de silicate (45S5), verre bioactif de borate (Ryrex®)		
Métaux	Titane et ses alliages, Tantale, Acier inoxydable	Excellentes propriétés mécaniques Biocompatibilité	Faible adhérence au tissu Corrosif Risque de toxicité lié au relargage d'ions

**TABLEAU 5 : LES BIOMATERIAUX POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

Adapté de [41]

### 3.3.1. Les polymères

- Les polymères naturels

Les polymères naturels peuvent être des composants de la structure native de la matrice extracellulaire des tissus (collagène), ou peuvent se trouver dans la nature, tels que les polysaccharides (alginate, chitosane, pullulane, dextrane). Ces biomatériaux offrent pour la plupart une bonne biocompatibilité et une dégradation rapide. Certains de ces polymères naturels sont dits « bioactifs » : ils ont la capacité de stimuler une réponse biologique entraînant une interaction entre le matériau et le tissu hôte [72, 73].

Les matrices constituées de **collagène de type I** sont un premier exemple. Le collagène de type I est le composant principal de la phase organique de l'os. Il constitue un matériel de choix pour le développement de matrices pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Le collagène contribue en particulier à l'initiation et à l'orientation du dépôt d'apatite [74], et à la croissance vasculaire, fournissant ainsi un environnement favorable à la régénération osseuse. Ce polymère naturel est produit sous différentes formes (éponge de collagène [75], gel injectable, ...). Il est également utilisé en tant que réservoir, comme systèmes de relargage de molécules pharmaceutiques, et de facteurs de croissance. Il peut être aussi associé à des nanoparticules fonctionnalisées (ou non).

La **gélatine** est une forme de collagène dénaturée, et possède une immunogénicité plus faible que celle du collagène [76].

Le **chitosane**, est dérivé d'un polysaccharide naturel (chitine) trouvé dans les crustacés. Le chitosane est connu pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, et ses propriétés antibactériennes intrinsèques [77, 78]. Il reste toutefois nécessaire de contrôler son caractère inflammatoire pour les applications biomédicales.

L'**alginate**, ou acide alginique, est un polysaccharide anionique présent dans les cellules d'une algue marine. Il est capable, une fois extrait, d'absorber jusqu'à 300 fois son propre poids en eau, ce qui en fait un candidat de choix pour le transport de molécules hydrosolubles et l'encapsulation de cellules [25].

Le **pullulane** est un polysaccharide neutre et non immunogénique, obtenu à partir de la fermentation d'amidon par *Aureobasidium pullulans*. Il est utilisé en ingénierie tissulaire le plus souvent sous une forme réticulée [79-82].

Le **dextrane**, est un autre polysaccharide, soluble dans l'eau, obtenu à partir de *Leuconostoc mesenteroides*. Son extraction ayant un coût relativement faible, son utilisation peut être envisagée en grande quantité. Ce polymère est utilisé en particulier pour la fabrication de nanoparticules afin de servir de transporteur à des molécules thérapeutiques [83]. Il a pu montrer son utilité en ingénierie tissulaire, notamment en servant de vecteur pour des cellules souches mésenchymateuses pour des applications dans le domaine cardiovasculaire ou osseux [84-87].

Les principaux avantages et les inconvénients de ces polymères naturels sont présentés dans le **Tableau 6**. Leurs principales limites sont leur vitesse de dégradation et leurs propriétés mécaniques trop faibles (**Tableau 7**), par rapport à celles de l'os (ou à des matériaux à base de phosphate de calcium) ce qui peut limiter leurs applications pour la régénération de grands volumes osseux. Des problèmes de disponibilité de matériaux et reproductibilité des lots produits peuvent également s'ajouter à ces limites [88].

Polymères pour l'ingénierie tissulaire	Avantages	Inconvénients
Collagène	Composant majeur de la matrice extracellulaire Grande disponibilité Facile à purifier à partir d'organismes vivants Peu immunogénique Biodégradable Biocompatible Bioresorbable Non toxique Différentes formulations disponibles	Prix élevé du collagène de type I Variabilité entre les différents échantillons de collagène Faible capacité à induire la minéralisation
Chitosane	Grande biodégradabilité Biocompatibilité Capacité à promouvoir la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes <i>in vitro</i> Structure poreuse Bonnes propriétés mécaniques	Réaction inflammatoire Faible solubilité Faible capacité à induire la minéralisation
Alginat	Facilement manipulable Non toxique Biodégradable Peu coûteux	Faible stabilité mécanique

**TABLEAU 6 : LES POLYMERES NATURELS POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

[25]

Matériau	Module de Young*	Références
Collagène de type I	5 ± 1.0 GPa	[89]
Polymères synthétiques (PLA, PGA)	entre 7 Mpa et 4 GPa	[90]
TCP	1.75 - 5.48 MPa (compressive strength)	[66]
HA	0.61 - 1.06 MPa	
Os cortical	7 - 30 GPa	[91]
Os spongieux	0.5 – 0.05 GPa	

**TABLEAU 7 : PROPRIETES MECANIQUES DES POLYMERES NATURELS EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE COMPAREES AUX BIOMATERIAUX A BASE DE PHOSPHATE DE CALCIUM OU CELLES DU TISSU OSSEUX**

\*Le module de Young, ou encore module d'élasticité, correspond à la constante qui permet de mesurer la réponse d'un matériau (déformation, ...), lorsqu'il est soumis à des contraintes de traction ou de compression. Plus le module de Young est élevé, plus le matériau est dit « rigide ».

HA : Hydroxyapatite ; TCP : Tricalcium phosphate ; PLA : Polylactic acid ; PGA : Polyglycolic acid

- Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques peuvent offrir de nombreux avantages pour l'ingénierie tissulaire. En effet, ces polymères sont disponibles de façon illimitée, produits de façon reproductible, sous différentes formes, possèdent également une certaine polyvalence en terme de porosité, de taille de pores, de vitesse de dégradation, et des propriétés mécaniques contrôlables.

Les polymères synthétiques les plus utilisés en ingénierie osseuse sont l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), l'acide poly(lactique-co-glycolique) ou encore et le poly-(ε-caprolactone) [92].

Le **PLA**, le **PGA**, et le **PLGA** sont largement utilisés comme systèmes de délivrance de principes actifs tels que les facteurs de croissance. Leurs produits de dégradation sont l'acide glycolique et l'acide lactique, présents naturellement dans le corps humain, et sont donc éliminés par les voies métaboliques classiques. Cependant, une concentration élevée de ces produits de dégradation peut être toxique. *In vivo*, de nombreux travaux témoignent d'une réponse inflammatoire liée à l'implantation de ces polymères [41]. De même que pour les polymères naturels, ces polymères synthétiques présentent de faibles propriétés mécaniques. Enfin, la plupart de ces polymères synthétiques sont peu ou pas bioactifs [88].

Le **poly-(ε-caprolactone) (PCL)**, est un polymère bio-résorbable, biocompatible, et facile à manipuler. Il est utilisé principalement dans le cadre de l'ingénierie osseuse et cartilagineuse. Le PCL est plus stable à température ambiante que le PLA et est moins onéreux [93]. De plus, ce polymère est déjà approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration) [92, 94, 95].

### 3.3.2. Les matériaux à base de phosphate de calcium

Comme nous l'avons vu précédemment, le tissu osseux est composé d'une phase organique, et d'une phase minérale sous forme de phosphate de calcium apatitique. Les matériaux phosphocalciques utilisés en ingénierie tissulaire osseuse peuvent être d'origine synthétique (Hydroxyapatite (HA) et  $\beta$ -Phosphate tricalcique ( $\beta$ -TCP)) ou naturelle (hydroxyapatite corallienne), et sont utilisés comme substitut osseux depuis les années 1980. Ils peuvent être synthétisés suivant différentes formes, et présenter différentes porosités et taille de pores.

Les céramiques à base de phosphate de calcium obtenues sont connues pour leurs propriétés ostéoconductrices, biocompatibles, non immunogéniques, et leur haut niveau de résistance mécanique [96]. Certaines d'entre elles présentent des propriétés d'ostéoinduction de par leur microstructure [97]. Cette famille de biomatériaux contient principalement du phosphate tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , TCP) et/ou des apatites avec en particulier l'hydroxyapatite (HA).

La principale caractéristique de l'hydroxyapatite est la possibilité d'avoir un grand nombre de substitutions. Les apatites stoechiométriques sont en général représentées par la formule chimique :  $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ , où Me est un métal bivalent,  $\text{XO}_4$  un anion trivalent et Y un anion monovalent. L'hydroxyapatite stoechiométrique est donc représentée par la formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , avec un ratio Ca/P de 1,67 [98].

L'hydroxyapatite (**HA**) (composant inorganique majeur de l'os naturel) et le  **$\beta$ -TCP** (ratio Ca/P de 1.5) sont deux phosphates de calcium biocompatibles. *In vitro*, l'HA a montré sa capacité à stimuler la différenciation de MSCs et induire la formation de tissu osseux en site ectopique. Le hydroxyapatite est un composé stable, mais peu soluble dans l'eau, alors que le  $\beta$ -TCP est moins stable que l'hydroxyapatite mais bien plus soluble en milieu aqueux [99, 100]. L'hydroxyapatite stœchiométrique est capable d'ostéointégration avec le tissu néoformé. De plus, sa dégradation lente et contrôlée, ainsi que les produits de dégradation, peuvent induire une réponse ostéogénique de la part du tissu hôte. Alors que les couches de surface du  $\beta$ -TCP permettent d'améliorer les liaisons avec le tissu osseux adjacent [97, 101].

Ces études suggèrent que le matériau à base de phosphate de calcium peut montrer des propriétés d'ostéoinduction quand il possède des caractéristiques chimiques et structurales spécifiques. Cependant, il faut noter que l'hydroxyapatite stœchiométrique se dégrade très lentement, alors que le  $\beta$ -TCP se dégrade de façon plus rapide [72, 102, 103].

### 3.3.3. Les bio-verres ou verres bioactifs

Les bio-verres sont des matériaux composés de calcium, de phosphore et de silicate (son constituant principal) [101]. Les verres bioactifs possèdent une structure amorphe. Ils possèdent des propriétés ostéoconductrices. Ils sont biodégradables et leur vitesse de dégradation peut être contrôlée.

*In vitro*, les bio-verres ont montré qu'ils pouvaient entraîner le dépôt d'une couche d'hydroxyapatite, et stimuler la prolifération, la différenciation des précurseurs ostéoblastiques et des cellules stromales de la moelle osseuse [96, 104]. D'autres auteurs ont également montré la capacité des bio-verres à différencier *in vitro* des cellules souches humaines issues du tissu adipeux [105]. Le premier bio-verre à avoir été développé est le 45S5 Bioglass®, mis au point par Hench dans les années 60 et utilisé en clinique depuis 1985 [106, 107]. Ce bio-verre est notamment commercialisé par la société Noraker, sous forme de granules, dans le cadre de la médecine régénérative osseuse (GlassBONE™).

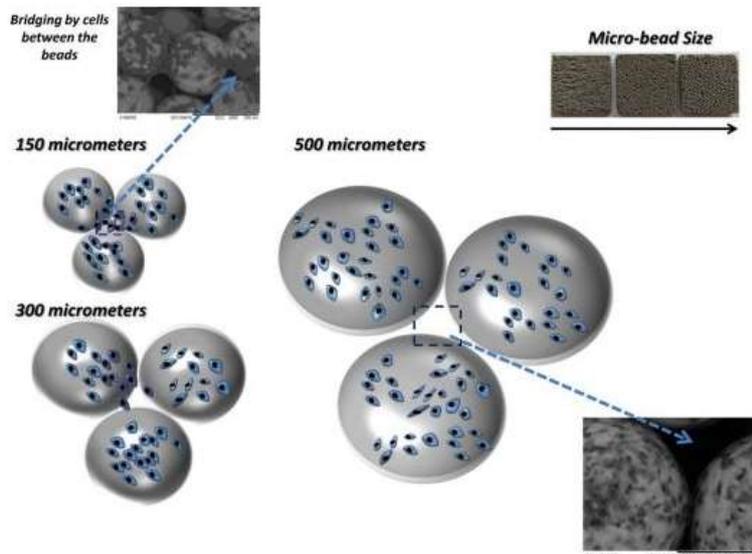
Cependant, tout comme les autres types de céramiques, les verres bioactifs restent très fragiles : ils ne peuvent pas résister à certaines contraintes mécaniques et ne peuvent donc pas être utilisés seuls dans le cadre d'implantations au niveau de sites osseux où résident de fortes contraintes mécaniques [66, 108].

### 3.3.4. Les métaux

Les matériaux métalliques tel que le titane ou le tantale font partie d'une famille possédant un module d'élasticité comparable (ou plus élevé) à celui de l'os cortical [109], ce qui les rend idéaux pour les applications en orthopédie et en chirurgie maxillo-faciale, et des sites de reconstruction où résident d'importantes contraintes mécaniques. Le titane et le tantale sont connus pour être biocompatibles, hautement résistants à la corrosion, robustes et peu biodégradables. Ce type de matériau est souvent utilisé et recouvert d'hydroxyapatite (par exemple), dans le cadre de prothèses de hanche afin de promouvoir la croissance osseuse d'une part, et la stabilité de la prothèse d'autre part [110, 111].

Cependant ces biomatériaux présentent également quelques limites. Les limites principales sont les faibles interactions biologiques entre la surface de ces matériaux et le milieu vivant. De nombreux travaux de la littérature rapportent des modifications et différents types de fonctionnalisations de ces surfaces pour améliorer leur bioactivité. Parmi ces modifications, les revêtements de ces matériaux par de l'hydroxyapatite sont largement décrits dans la littérature [112]. Les efforts dans ce domaine portent sur les méthodes de revêtement pour améliorer la stabilité à long terme de cette fonctionnalisation.

L'équipe de P. Laval (INSERM U1121, Strasbourg), en interaction avec la société PROTIP Medical, a développé un matériau à base de titane sous forme de billes de différentes tailles. Les différentes tailles de billes permettent, lorsqu'elles sont assemblées, de former une structure poreuse dont la taille varie en fonction de la taille des billes (**Figure 17**). Les auteurs ont pu montrer que les cellules colonisaient le matériau et migraient de façon différentes en fonction des tailles de billes et donc des tailles de pores. L'ensemble des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont permis le développement du premier larynx artificiel et les premières implantations cliniques [113].



**FIGURE 17 : IMPLANTS EN TITANE DE DIFFERENTES POROSITES**

Des billes de titane, de différentes tailles (150, 300, and 500  $\mu\text{m}$  de diamètre), ont été synthétisées déterminant ainsi porosité de la structure et la colonisation cellulaire [114].

D'autres types d'implants de titane poreux ont également été étudiés, et montrent l'importance de la taille des pores pour favoriser une colonisation du matériau par le tissu osseux [115, 116].

Une des limites principales des métaux est la probabilité de relargage de particules de corrosion toxiques, ce qui pourrait mener à des réactions inflammatoires importantes.

Enfin, le module élastique de ce type de métal est largement supérieur à celui de l'os cortical. Cette différence peut entraîner un défaut de transmission du signal de « stress », du matériau à l'os, et conduire à une activité de résorption osseuse anormale [111, 117].

### 3.3.5. Les hydrogels

Les hydrogels sont composés d'approximativement 90% d'eau. Leur dégradation se fait, le plus souvent, par digestion enzymatique, ou par hydrolyse. De plus, ils peuvent pour certains être synthétisés en absence de solvants dans des conditions favorisant la biocompatibilité. Ils possèdent des caractéristiques structurales proches de celles des matrices extracellulaires de nombreux tissus, et offrent une bonne reproductibilité de production [118, 119].

L'un de leur point fort est qu'ils sont, en général, facilement manipulables. Ils peuvent être produits sous forme injectable ce qui réduit le caractère invasif de leur implantation en site osseux [120, 121].

Cependant, les hydrogels sont rarement utilisés seuls en ingénierie tissulaire osseuse à cause de leurs faibles propriétés mécaniques [122]. Les hydrogels peuvent toutefois servir de

système de relargage de molécules pharmaceutiques, d'anticorps, de facteurs de croissance, d'acides nucléiques ou encore utilisés comme vecteurs de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire [122].

Les biomatériaux naturels tels que le chitosane, le collagène ou encore le pullulane, sont décrits précédemment dans le paragraphe « 3.3.1. *Les polymères : les polymères naturels* » font également partie des composés permettant d'obtenir des hydrogels.

En ce qui concerne les hydrogels synthétiques, ceux-ci offrent des avantages non négligeables par rapport aux hydrogels naturels car ils peuvent être produits de façon reproductible, à volonté. Ils induisent pour la plupart une faible réaction immunogène. Parmi les différents hydrogels synthétiques existants, les polyacrylates, les polyéthylènes glycol (PEG), et les polyphosphoesters sont ceux qui sont les plus utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse.

### 3.3.6. *Les composites*

La combinaison de céramiques avec des polymères naturels ou synthétiques sont parmi les stratégies les plus prometteuses en ingénierie tissulaire osseuse afin d'augmenter les propriétés ostéoinductrices, ostéoconductrices et mécaniques.

Les polymères principalement utilisés pour le développement de ces matériaux composites sont le collagène, le chitosane, le PLGA et ou encore le PLA [76, 123].

Concernant la phase minérale, l'hydroxyapatite, sous différentes formes et différentes tailles (de l'échelle nanométrique à l'échelle micrométrique), est le plus souvent associée à ces polymères [124].

Les composites développés à l'aide de polymères naturels semblent présenter une meilleure biocompatibilité et biodégradabilité que les composites constitués de polymères synthétiques [72]. Les matrices de collagène-HA ont montré par exemple, qu'elles stimulaient la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses humaines *in vitro* et la néoformation osseuse après implantations dans des modèles murins [76, 125].

D'autre part, Fricain *et al* [126], ont démontré les capacités ostéoinductrices et ostéoconductrices d'un composite constitué de particules d'HA dispersées dans une matrice de polysaccharides (pullulane et dextrane). L'ostéoinduction a été démontrée après implantation de la matrice en site ectopique pendant 30 et 60 jours d'implantation en sous cutanée chez la souris, et après 1 à 6 mois d'implantation intramusculaire chez la chèvre. Ce matériau a aussi été implanté en site osseux et les résultats obtenus ont confirmé les observations précédentes [126, 127]. Le TCP est également souvent utilisé en tant que charge pour le développement de tels produits composites.

Compte tenu de l'efficacité de ces matrices composites démontrées à l'aide de différents modèles précliniques, un grand nombre d'entre eux sont disponibles commercialement

(Tableau 8) [128]. L'Annexe 1 présente une liste des essais cliniques réalisés ces dernières années à l'aide de biomatériaux composites.

Entreprise	Produit	Composition	Forme	Applications
Biomet Osteobiologics	ProOsteon® 500R	Composite d'HA dérivé du corail / Carbonate de calcium	Granule Bloc	Comblement osseux
Zimmer/Neu Coll	Collagraft®	Collagène de type I (bovin) / HA, TCP	Bandelette	Comblement de fracture d'os longs
Orthovita	Vitoss®	20% de collagène / 80% de $\beta$ TCP	Bandelette	Comblement osseux
Geistlich Biomaterials	Bio-Oss Collagen®	10% de collagène (porcin) / 90% de Bio-Oss (HA)	Bandelette	Comblement de lésion parodontale
Baxter	TricOs T®	Fibrin / TCP	Granules	Comblement osseux
JRI Orthopaedics	RegenOss®	Fibres de collagène de type I / Nanocrystals d'hydroxyapatite enrichies avec du magnésium	Patch Bandelette	Comblement de fracture d'os longs, Traitement de fusion vertébrale
Pionner surgical	NanOss® Bioactive 3D	Collagène / Nano-HA	Bandelette	Comblement osseux
Maxigen Biotech Inc	FormaGraft®	Collagène de type I / HA, TCP	Granules Bandelette	Comblement osseux
Exactech	OpteMx™	Combinaison de HA/TCP biphasique	Granules Stick Cylindre de différentes tailles	Comblement osseux
Medtronic Spinal & Biologics	MasterGraft® Granules	Calcium-phosphate biphasique	Granules	Comblement de lésion parodontale
	MasterGraft® Matrix	Calcium, phosphate et collagène	Bloc	
	MasterGraft® Putty	Calcium phosphate et collagène	Pate malléable	
DePuy Synthes	HEALOS® Bone Graft Replacement	Matrice de collagène minéralisée	Bandelette	Chirurgie de la colonne vertébrale peu invasive
	Norian® SRS® Fast Set Putty	Calcium phosphate	Pate malléable	Comblement osseux
	chronOS®	$\beta$ -tricalcium phosphate	Granules Blocs	Comblement osseux

TABLEAU 8 : BIOMATERIAUX COMMERCIALISES ET APPLICATIONS CLINIQUES

Abréviations : HA : Hydroxyapatite ; TCP : Tricalcium phosphate [25]

Bien que déjà utilisés en clinique, la plupart de ces substituts osseux présentent encore un grand nombre de limites. Ces limites sont souvent mentionnées dans la littérature sous le terme « VOIDS » pour « Vascularisation, Osseointégration, Infection, Degradability, Strength » et sont résumés dans le **Tableau 9**. Parmi celles-ci, un déficit de vascularisation de ces biomatériaux ne peut permettre une régénération totale de la lésion osseuse, voir conduire à une nécrose du tissu néoformé.

Plusieurs stratégies sont proposées pour pallier à ces insuffisances et seront en partie décrites dans le paragraphe **3.4. Stratégie d'ostéoinduction et de vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse**

VOIDS	Limites liées aux produits d'ingénierie tissulaire osseux
<u>V</u> ascularisation	Faible vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse
<u>O</u> stéointégration	Faible intégration de l'implant au niveau du tissu hôte
<u>I</u> nfection	Risque d'infection de la zone implantée
<u>D</u> égradation	Cinétique de dégradation et résorption peu compatible avec la néoformation osseuse
Résistance ( <u>S</u> trength)	Faible rigidité et résistance à la contrainte

**TABLEAU 9 : LIMITES DES PRODUITS D'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

[90]

### 3.3.7. Les matériaux imprimés en trois dimension (3D) par biofabrication

La biofabrication est une approche ayant pris une ampleur considérable ces dernières années, appuyée par une quantité croissante de publications. Les technologies proposées pourraient constituer des alternatives à l'ingénierie tissulaire telle qu'on la connaît.

Le terme de biofabrication a été introduit en 1994, et est utilisé dans de nombreuses disciplines technologiques comme les biotechnologies ou la biologie de synthèse [129]. La définition la plus large de la biofabrication est « *l'utilisation d'un procédé pour engendrer un produit présentant une fonction biologique* ». La biofabrication peut s'appliquer notamment au domaine de la médecine régénératrice et réparatrice. Dans ce domaine, on distingue la bio-impression *ex vivo* et la bio-impression *in situ*.

- La bio-impression *ex vivo*

La bio-impression *ex vivo* consiste à créer des produits d'ingénierie tissulaire à l'aide de bio-imprimantes. Plusieurs bio-imprimantes ont été développées : les imprimantes à jet d'encre,

les imprimantes par extrusion dont les têtes d'impression sont constituées de micro-seringues et les imprimantes assistées par laser.

Les *imprimantes à jet d'encre* permettent d'imprimer des cellules vivantes selon des motifs prédéfinis. Leur principal inconvénient est la faible densité cellulaire utilisable (inférieure à 5 millions de cellules/mL).

Concernant les *imprimantes à extrusion*, des biomatériaux (alginate, agarose, ...) sont extrudés de façon continue au travers de buses de quelques centaines de micromètres de diamètre. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de réaliser l'impression dans le même temps des échafaudages et des cellules.

Enfin, les *imprimantes assistées par laser* reposent sur une source laser pulsée, une lame donneuse (cible) recouverte d'une fine couche de bio-encre à imprimer, et une lame receveuse disposée à quelques micromètres ou millimètres de la première qui reçoit les éléments imprimés. Cette approche permet d'utiliser des bio-encres complexes contenant par exemple de l'hydroxyapatite, des cellules et de la matrice extracellulaire.

Plusieurs tissus, de complexité variable, ont pu être reconstruits en utilisant ces différentes technologies d'impression *ex vivo* (*i.e.* une portion de mandibule de morphologie adaptée à la perte de substance) [130].

- La bio-impression *in situ*

La bio-impression *in situ* consiste à bio-imprimer des cellules, de la matrice, des facteurs de croissance directement au niveau de la perte tissulaire pour favoriser la régénération du tissu lésé. L'avantage de cette approche est de se dispenser des étapes de maturation *in vitro* qui sont longues, coûteuses et favorisent les risques de contamination. Ces technologies *in situ*, dès lors qu'elles pourront être adaptées dans les centres hospitaliers, dans les blocs opératoires, ouvriront d'importantes perspectives pour la médecine personnalisée. A ce jour, ces données restent encore à l'état expérimental et la démonstration de la fonctionnalité de tels produits devra être faite.

### 3.4. Stratégie d'ostéoinduction et de vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse

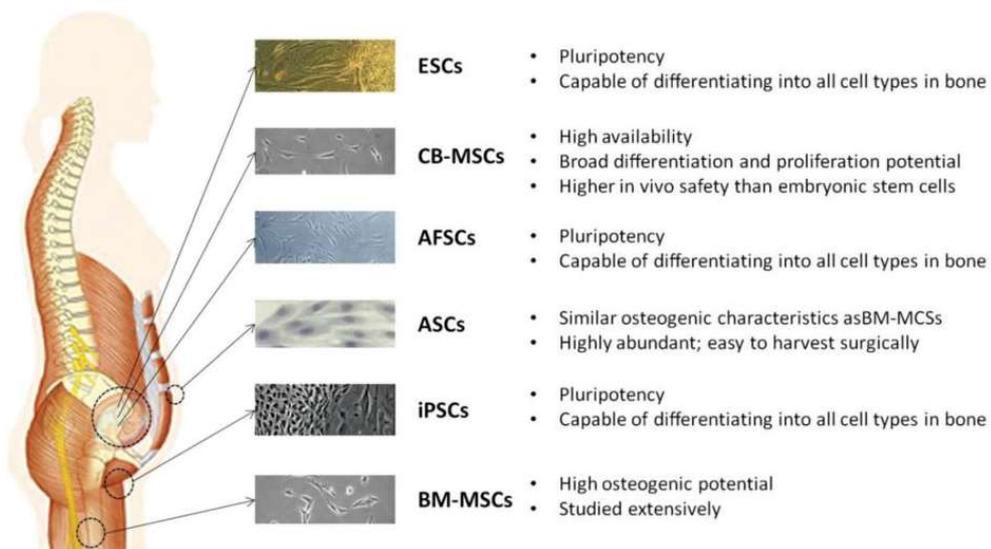
#### 3.4.1. Ostéoinduction et cellularisation de biomatériaux

L'association des biomatériaux avec une composante cellulaire permet de pallier les insuffisances des matériaux utilisés seuls. Le choix de la composante cellulaire reste complexe dès lors que les essais restent expérimentaux ou cliniques.

Les cellules souches constituent des outils fondamentaux dans le domaine de la médecine régénératrice [131]. Ces cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables

d'autorenouveaulement perpétuel, et offrant un potentiel de différenciation lié au microenvironnement spécifique (biochimique, mécanique), dans lequel elles sont placées [132].

De nombreuses études se sont intéressées aux types de cellules capables de jouer un rôle dans la régénération osseuse [133]. Les cellules souches embryonnaires (ESC), les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC), les cellules souches pluripotentes induites (iPS), les cellules souches dérivées de la pulpe dentaire, et enfin les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) (**Figure 18**) [134] sont autant de sources cellulaires utilisées pour développer des produits d'ingénierie tissulaire.



**FIGURE 18 : CELLULES SOUCHES UTILISEES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

*Abréviations : ESCs-Embryonic stem cells ; CB-MSCs-Cord blood mesenchymal stem cells ; AFSCs-Amniotic fluid derived stem cells ; ASCs-Adipose derived stem cells ; iPSCs-Induced pluripotent stem cells ; BM-MSCs-Bone marrow mesenchymal stem cells [132]*

- Les cellules souches embryonnaires (ESC)

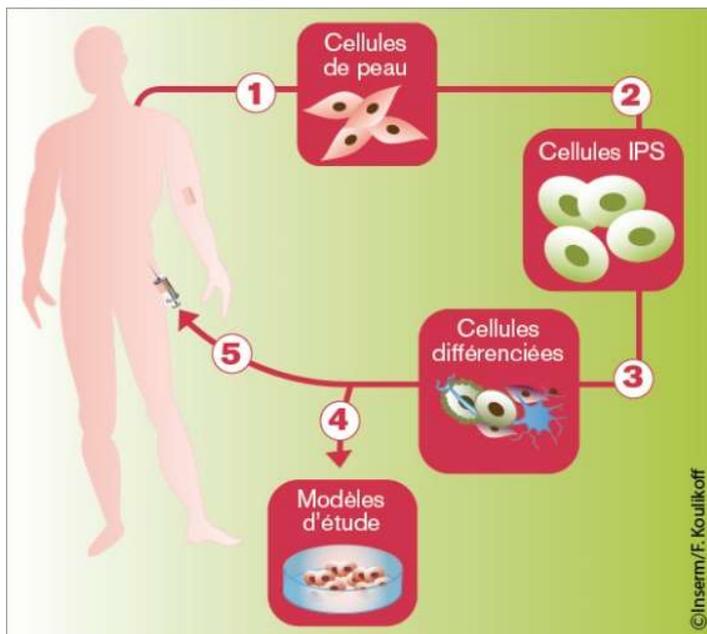
Les cellules souches embryonnaires sont des cellules indifférenciées, dérivées des stades embryonnaires précoces. Ces cellules sont qualifiées de « pluripotentes ». Cela signifie qu'elles ont le potentiel de se différencier en n'importe quel type cellulaire du corps humain [131, 132]. Elles peuvent donc être utilisées comme source unique de cellules, pour produire une lignée de cellules osseuses, ou encore d'autres types cellulaires comme les progéniteurs endothéliaux. Une des caractéristiques de ces cellules souches embryonnaires est leur faible immunogénicité.

Cependant, bien qu'elles possèdent un très fort potentiel pour la régénération osseuse, les cellules souches embryonnaires sont soumises à une réglementation spécifique, tant au niveau expérimental que clinique. En effet, des données expérimentales ont montré qu'une

culture prolongée de ces cellules embryonnaires pouvait conduire à l'apparition de caryotypes anormaux. De plus, leur implantation *in vivo* peut également contribuer à la formation de tératomes. Ainsi, leur utilisation en France reste limitée à quelques applications [135].

- Les cellules pluripotentes induites (iPS)

Les iPS ou cellules souches pluripotentes induites, sont des cellules souches isolées à partir de fibroblastes de peau (**Figure 19**). Ces cellules sont reprogrammées par modification génétique. Pour cela, 4 facteurs de transcription sont utilisés : Oct4, Sox2, Klf4 et Myc. Cette technique a été mise au point par Yamanaka en 2006 [136]. Il a démontré, à l'aide d'iPS murines, puis humaines, que celles-ci avaient la capacité de se différencier vers tous les types cellulaires et possédaient des propriétés identiques à celles des cellules souches embryonnaires. De même que pour les ESC, le risque de stimuler le développement d'une tumeur reste à prendre en considération pour des essais cliniques [135, 137, 138].



**FIGURE 19 : LES iPS EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

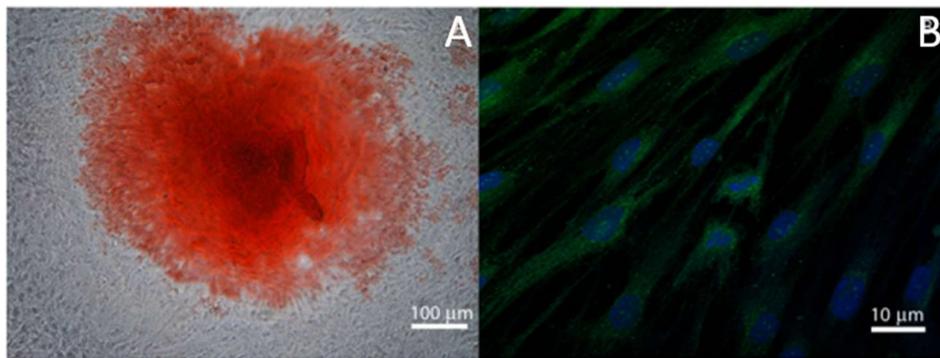
Les iPS sont obtenues à partir de cellules adultes spécialisées, le plus souvent des cellules de la peau (1). Ces cellules sont génétiquement modifiées (2) pour redevenir immatures, semblables à des cellules souches embryonnaires. Il est alors possible de guider leur « re-différenciation » en cellules spécialisées (cellules cardiaques, hépatiques, rétinienne, nerveuses...) (3) qui seront utilisées comme modèle d'étude (4) ou, comme cellules thérapeutiques (5). *Abréviations : iPS : induced pluripotent stem cells* [139].

- Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont présentes dans de nombreux tissus, tels que la moelle osseuse, le périoste, les muscles, le gras, le sang de cordon ombilical, le placenta, le cerveau ou encore la peau. Elles contribuent à la régénération de tissus lésés, ainsi qu'au maintien de leur homéostasie. Contrairement aux cellules souches embryonnaires qui sont pluripotentes, les cellules souches adultes sont dites « multipotentes », c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en un nombre limité de lignées cellulaires [131].

Les **cellules souches mésenchymateuses** (MSCs) sont des cellules souches adultes. Les MSCs peuvent être obtenues à partir d'un certain nombre de tissus adultes incluant le tissu adipeux, la moelle osseuse, la pulpe dentaire et le périoste. L'équipe de Friedenstein a été la première à montrer, à la fin des années 1960, que la moelle osseuse contenait des cellules stromales capables de différenciation ostéogénique et nécessaires à la création de la niche hématopoïétique [140]. Les protocoles pour induire leur différenciation en cellules osseuses, cartilagineuses et adipeuses sont bien connus et largement utilisés en ingénierie osseuse [141-143].

Les **cellules souches issues de la pulpe dentaire** sont des cellules souches adultes pouvant se différencier en ostéoblastes, odontoblastes, chondrocytes, et cellules endothéliales (**Figure 20**) [144, 145]. Des études ont confirmé leur potentiel ostéogénique une fois hébergées dans des matrices tridimensionnelles pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse [146, 147].



**FIGURE 20 : CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE DIFFERENCIÉES EN OSTEOBLASTES**

(A) Marquage au rouge Alizarine, montrant la formation de nodules minéralisés par les cellules souches issues de la pulpe dentaire. (B) Immunomarquage de l'ostéocalcine confirmant la différenciation des cellules souches issues de la pulpe dentaire vers le lignage ostéoblastique [145].

Les **cellules souches dérivées du tissu adipeux** (ADSCs) sont des cellules facilement accessibles et offrent un large éventail de différenciation cellulaire. Ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules ostéogéniques, chondrogéniques, adipogéniques, neurales et endothéliales. Le potentiel de différenciation ostéogéniques de ces ADSCs a été à la fois démontré *in vitro* [148] mais également *in vivo* [149]. De par la facilité de prélèvement de ces cellules et la quantité de matériel disponible, ces cellules constituent une source cellulaire de choix pour une application en ingénierie tissulaire osseuse.

La fraction **SVF**, ou « stromal vascular fraction », issue du tissu adipeux, offre des perspectives cliniques importantes. Cette fraction contient en particulier des progéniteurs angiogéniques et vasculaires. L'équipe de I. Martin, a notamment démontré le potentiel ostéogène et angiogène de cette fraction SVF ensemencée dans une matrice phosphocalcique, cultivée dans un système de bioréacteur, puis implantée ectopiquement [150]. Cette même équipe a

poursuivi ces travaux par des implantations de granules de céramique phosphocalcique, supplémentés en fraction SVF sans expansion cellulaire, dans un modèle de fractures chez le rat. La néoformation d'un nouveau tissu osseux vascularisé, obtenu *in vivo*, sans expansion cellulaire en 2D, puis en 3D, démontre l'intérêt des sollicitations mécaniques en 3D, pour obtenir un produit d'ingénierie tissulaire performant et fonctionnel. Un essai clinique, utilisant cette fraction SVF mélangée à des granules de céramiques, a été réalisé par ces équipes [151, 152]

Pour résumer, les différents types de cellules souches présentés précédemment sont donc tous capables de jouer un rôle dans la régénération du tissu osseux. Néanmoins, pour une pratique clinique, seules les cellules autologues, prélevées chez le patient, peuvent être utilisées, afin de limiter le risque de rejet par le patient. Les cellules sont le plus souvent amplifiées en deux dimensions, puis en trois dimensions, au sein de matrices 3D avant d'envisager l'implantation du produit. Ces étapes de production des produits d'ingénierie tissulaire peuvent être longues, et incompatibles avec certaines situations cliniques. De nombreux laboratoires travaillent sur des méthodes alternatives permettant de réduire ces différentes étapes, du prélèvement de cellules chez le patient, leur association à un vecteur matériel en salle de chirurgie, afin de réaliser l'implantation du substitut directement au bloc opératoire. Les travaux du Pr I. Martin en sont un exemple.

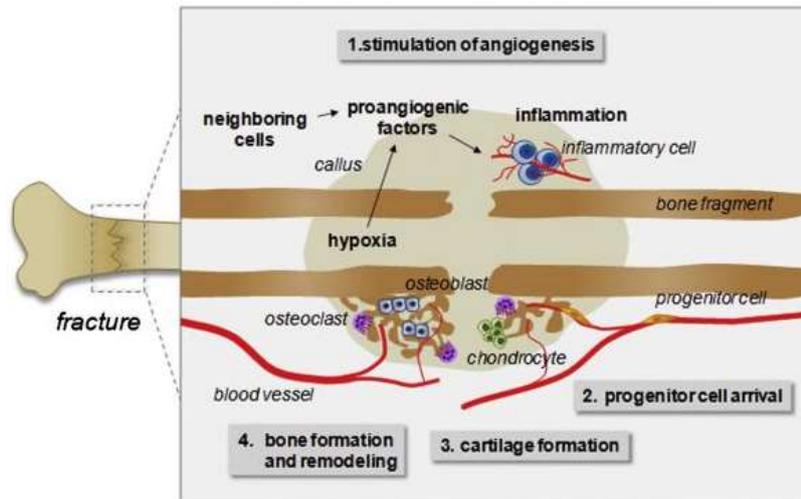
Les essais cliniques en cours et démontrent les capacités régénératrices de ces produits d'ingénierie tissulaire chez les patients (**Annexe 2**). Cependant, comme décrit dans la littérature, leur nombre reste encore très limité. Ce faible nombre d'essais cliniques peut être dû aux aspects réglementaires liés à l'utilisation de ces produits d'ingénierie tissulaire, mais aussi aux infrastructures nécessaires pour mettre en place des produits en conditions BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication), et assurent la qualité du produit implanté et la sécurité du patient.

#### 3.4.2. La pré-vascularisation de biomatériaux

La présence d'un réseau vascularisé à l'intérieur du tissu osseux a été découverte pour la première fois au 17<sup>ème</sup> siècle par Leewenhoek, et a été ensuite confirmée au 20<sup>ème</sup> siècle par les groupes de Trueta, Brookes, et Thompson [153-156].

Le système vasculaire du squelette joue un rôle important dans le processus de développement osseux, ou encore lors de la régénération et le remodelage. Les vaisseaux sanguins permettent l'apport d'oxygène, de nutriments, de différents facteurs hormonaux, des facteurs de croissance (comme le VEGF), ou encore des neurotransmetteurs produits par l'environnement cellulaire et tissulaire afin de maintenir la survie des cellules osseuses et de stimuler leur activité [153, 157]. La réponse angiogénique et la vascularisation sont des

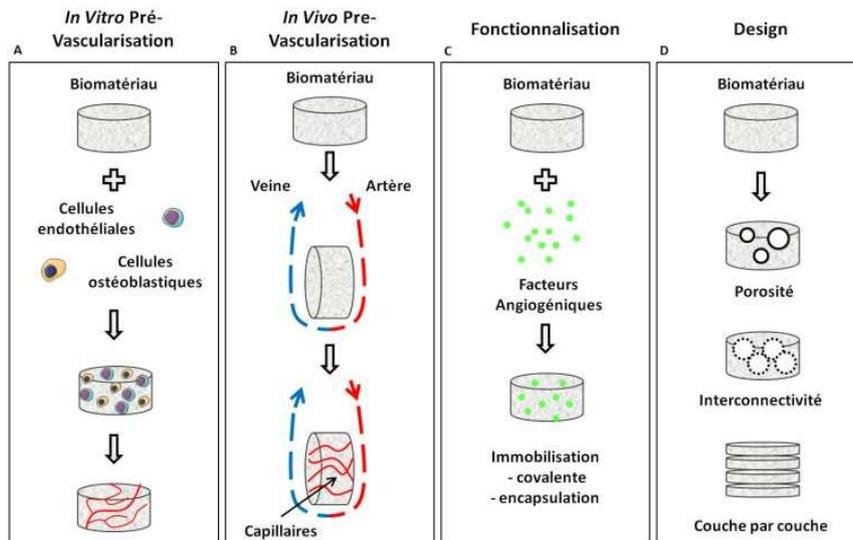
événements majeurs pour la reconstruction du tissu lésé. Ces principaux événements sont décrits dans la **Figure 21**.



**FIGURE 21 : REPOSE ANGIOGENIQUE DURANT LE REPARATION D'UNE FRACTURE**

Suite à la rupture des vaisseaux lors d'une fracture, la concentration en oxygène diminue et le site de fracture devient hypoxique. L'activation de la voie de signalisation de l'hypoxie stimule la production de VEGF par les différents types cellulaires présents sur les sites de la lésion (1). Le réseau vasculaire permet l'arrivée au niveau de la fracture de cellules progénitrices (2), qui vont permettre d'initier la formation du cal cartilagineux (ossification endochondrale) (3). Le remodelage osseux suit, afin de permettre la formation d'un tissu fonctionnel (4) [158].

De nombreux travaux et revues de la littérature décrivent différentes techniques de vascularisation (**Figure 22**) au service de l'ingénierie tissulaire osseuse [158, 159].



**FIGURE 22 : METHODES DE PRE-VASCULARISATION DES BIOMATERIAUX**

(A) Mise en place de co-cultures de cellules ostéogéniques et endothéliales au sein d'une structure tridimensionnelle. (B) Formation d'une boucle artério-veineuse, au sein de la matrice. (C) Fonctionnalisation des matrices avec des facteurs angiogéniques. (D) Structuration du matériau. Issu de [160].

Parmi ces techniques, les stratégies de prévascularisation (**Figure 22A**) par des co-cultures de MSCs avec des cellules vasculaires endothéliales ont été très largement décrites depuis les années 2000 [161]. En ce qui concerne la composante cellulaire endothéliale, les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) peuvent représenter une source potentielle de cellules souches adultes, utilisées pour promouvoir la vascularisation de l'os lors de la régénération. Les EPCs sont des cellules précurseurs résidant en particulier dans la moelle osseuse ou le sang périphérique. De plus, il a été identifié que les EPCs interagissent avec les MSCs pour promouvoir leur activité ostéogénique, notamment en sécrétant des facteurs de croissance tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ou encore des Bone Morphogenic Proteins (BMPs). Ces données ont pu être montrées *in vitro* et *in vivo* [162-164].

La vascularisation *in vivo* quant à elle (**Figure 22B**), consiste à placer préalablement le matériau au niveau d'un tissu vascularisé, tel que le muscle, afin que de nouveaux vaisseaux le colonisent. Ce produit vascularisé sera ensuite implanté dans un deuxième temps opératoire au niveau du site lésé.

L'utilisation de facteurs de croissance (**Figure 22C**) est également une alternative qui sera décrite dans le paragraphe « 3.4.4. *Fonctionnalisation de biomatériaux par des facteurs de croissance* ».

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, le contrôle de la macro- et micro-structure du matériau et l'interconnectivité des pores, (**Figure 22D**) peuvent également promouvoir la néovascularisation.

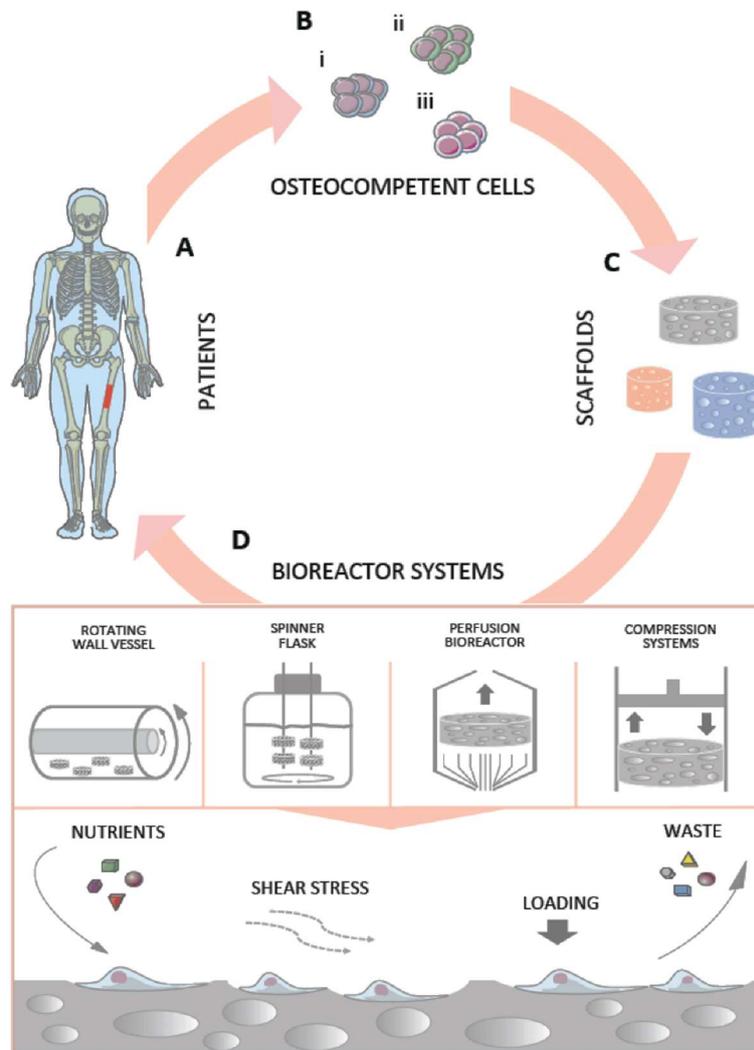
### 3.4.3. *Culture dynamique des produits d'ingénierie tissulaire*

La culture en condition dynamique des produits d'ingénierie tissulaire au sein de bioréacteur est une des approches technologiques pour améliorer la cinétique de reconstruction tissulaire. Un bioréacteur est un système permettant de cultiver des cellules, en trois dimensions, en conditions dynamiques, dans un environnement contrôlé.

Les bioréacteurs doivent faciliter la distribution uniforme des cellules en 3D, fournir et maintenir les éléments nécessaires à la survie des cellules (oxygène, nutriments, ...), stimuler mécaniquement les cellules, et être automatisé, afin de pouvoir contrôler la reproductibilité de la culture dynamique.

Plusieurs types de bioréacteurs existent : les chambres de culture rotatives, les chambres de culture à agitation, les bioréacteurs à perfusion, et les bioréacteurs à compression (**Figure 23**). Les deux premiers bioréacteurs (rotation et agitation), permettent d'obtenir un milieu de culture homogène. En revanche, ils ne permettent pas de perfuser correctement le matériau. Les deux autres types de bioréacteurs (perfusion et compression), bien que plus complexes à utiliser semblent plus efficaces à favoriser la perfusion du matériau [165]. Un grand nombre

de bioréacteurs sont disponibles commercialement. Nous citerons par exemple les entreprises TA Instruments, Celleg Biotech AG, ou encore GE Healthcare.



**FIGURE 23 : BIOREACTEURS UTILISES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

(A) Les patients souffrant d'une lésion osseuse (en rouge) due à une pathologie ou à un traumatisme nécessitent une reconstruction osseuse. (B) Des cellules de ce patient sont prélevées (i-cellules adultes ; ii-iPs ; iii-blastocystes). (C) Ces cellules sont ensuiteensemencées sur des matériaux et (D) cultivées sous différentes contraintes physiques grâce à un bioréacteur avant de réimplanter le produit d'ingénierie tissulaire construit [166].

#### 3.4.4. Fonctionnalisation de biomatériaux par des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines qui agissent comme des molécules de signalisation. Ils agissent de façon autocrine ou paracrine. Ces protéines peuvent activer le réseau de communication cellulaire et influencer des fonctions telles que la prolifération cellulaire, leur différenciation, le dépôt de matrice extracellulaire, et d'autres fonctions biologiques. Les facteurs de croissance sont utilisés en ingénierie tissulaire pour stimuler une fonction biologique donnée, comme l'ostéoinduction ou encore la vascularisation). Ces facteurs sont généralement « véhiculés » par des biomatériaux de différentes natures (polymères, matériaux phosphocalciques, ...). Nous citerons principalement dans ce paragraphe l'intérêt des BMPs et des facteurs angiogéniques tels que le VEGF ou encore le rôle joué par le FGF en ingénierie tissulaire osseuse.

- Les « bone morphogenic proteins » (BMPs) en ingénierie tissulaire osseuse

En 1965, Urist *et al* ont décrit pour la première fois les BMPs [167]. Plus de 30 BMPs différentes ont été identifiées. D'un point de vue expérimental, une bibliographie abondante témoigne de leur capacité à régénérer des lésions osseuses de différents volumes et ce, dans différents modèles, du petit au gros animal. Parmi les BMPs, il a notamment été montré que la BMP2 jouait un rôle indéniable dans le développement osseux et dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Un grand nombre d'études expérimentales ont récemment été menées pour exploiter son potentiel régénérateur en ingénierie tissulaire. A titre d'exemple, Schorn *et al* [168] ont utilisé les BMP2 pour reconstruire une lésion de taille critique de la mandibule dans un modèle canin.

Actuellement, les BMPs disponibles au niveau clinique sont la rhBMP-2 et la rhBMP-7, dans le traitement de fractures des os longs. Elles sont commercialisées (Infuse® Bone graft, Medtronic) et sont généralement associés à des éponges de collagène. Govender *et al.*, à titre d'exemple, ont montré l'efficacité de la BMP2 dans le traitement de fractures ouvertes du tibia chez près de 450 patients [34].

D'autres systèmes de délivrance sont proposés pour libérer ces facteurs de croissance de façon contrôlée, afin de promouvoir une réponse cellulaire locale. Oryan *et al.* les ont publiés dans une revue publiée en 2014, décrivant les différents systèmes de délivrance de ces facteurs [66, 169, 170].

Néanmoins, parmi les inconvénients principaux d'utilisation de ces BMPs, nous citerons leur disponibilité, leur coût élevé, leur mode d'administration mal contrôlé, leur utilisation à des concentrations supra-physiologiques, ainsi que leurs effets secondaires (formation ectopique de tissu osseux, réponse inflammatoire, risque cancérogène) [25, 171, 172]. Les stratégies actuellement en cours de développement sont de développer de nouveaux vecteurs matriciels capables de délivrer des concentrations faibles de BMP2 à l'échelle du nM et réduire les effets indésirables liés aux concentrations trop élevées [173].

- Le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) en ingénierie tissulaire osseuse

Le VEGF appartient à une famille de protéines homodimériques contenant 6 formes de VEGF différentes : VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le Placental Growth Factor (PlGF) [14,15]. La forme VEGF-A est la forme la plus exprimée, jouant un rôle dans l'activation et la migration de cellules endothéliales. Le VEGF est régulé par de nombreux facteurs. L'« hypoxia growth factor-1 » (HIF-1) est considéré comme un facteur important pour l'induction du VEGF au niveau du tissu osseux (**Figure 21**). En effet, le facteur HIF-1 est surexprimé en condition hypoxique lors de la formation de l'hématome au moment de la réparation osseuse. Il stimule en particulier la production du VEGF. Une fois sécrété, le VEGF agit comme une molécule chemoattractrice, attirant les cellules endothéliales à travers le tissu osseux, contrôlant directement la différenciation et la fonction des ostéoblastes et des ostéoclastes [174].

De nombreuses études expérimentales ont montré une régénération osseuse accélérée et une meilleure vascularisation des tissus après implantation d'un matériau contenant du VEGF [175].

Outre ces différents travaux *in vitro* et *in vivo*, un essai clinique (NCT02293031) est actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité, liées à l'implantation d'un matériau composite de collagène-HA (Nucleostim®) contenant un plasmide exprimant le VEGF. Le but de cet essai clinique est de stimuler la régénération osseuse chez des patients souffrant d'une lésion osseuse dans la zone maxillo-faciale [64, 176, 177].

La BMP2 et le VEGF peuvent être combinées dans une même matrice pour promouvoir ostéogénèse et vascularisation. Les résultats obtenus à l'aide d'une éponge de gélatine supplémentée de ces deux facteurs, ont montré une meilleure régénération osseuse lorsque le ratio VEGF : BMP2 était de 1 : 5 par rapport à la BMP2 seule. Un ratio de 5 : 1 ne permettait pas d'observer de régénération osseuse significativement plus élevée qu'en présence de la BMP seule [178].

- Le « Fibroblast Growth Factor » (FGF) en ingénierie tissulaire osseuse

D'autres facteurs de croissance sont également étudiés dans le cadre de la régénération osseuse. C'est le cas du FGF (« fibroblast growth factor »). Le FGF-2 est le membre de la famille des FGF le plus utilisé en ingénierie tissulaire osseuse. Le FGF-2 a été utilisé dans plusieurs modèles expérimentaux (chien, primate, souris et rat). Les différentes données recueillies montrent un effet dose de FGF-2 sur la régénération tissulaire. Plus celle-ci est importante, et plus la néoformation osseuse est efficace. En revanche, lorsque le FGF-2 est administré de façon indirecte et délivré à partir d'un matériau, son effet semble cependant moins significatif [171]. Quelques essais cliniques existent sur l'utilisation du FGF-2 pour la reconstruction parodontale [179, 180].

Pour résumer cette partie, les bénéfices des facteurs de croissance ostéogéniques et angiogéniques ont été largement démontrés dans des études *in vitro* et dans des modèles précliniques. Cependant, les facteurs de croissance sont également connus pour être oncogènes. De nombreuses questions concernant le rapport « bénéfique / risque » pour des applications médicales, la concentration utilisée, le mode d'administration, et l'exposition répétée de ces facteurs. Ces éléments sont à prendre en considération pour une pratique clinique. Leur utilisation chez des patients atteints d'ostéosarcome reste en particulier contre-indiquée.

Une alternative à l'utilisation de facteurs de croissance et/ou de cellules autologues serait d'améliorer les propriétés intrinsèques du biomatériau (structure, composition chimique, ...) pour répondre à un même besoin clinique. Dans cette optique, une approche semble être prometteuse : le dopage des produits d'ingénierie tissulaire avec des oligoéléments présents naturellement dans l'os [181].

#### 3.4.5. Les substitutions cationiques

Le dopage des produits d'ingénierie tissulaire peut être réalisé notamment grâce à la substitution cationique dans les phosphates de calcium et en particulier dans la structure de l'hydroxyapatite. Le but de cette approche est alors de remplacer une partie des ions calcium par d'autres ions bivalents. La substitution du calcium par d'autres ions bivalents ne doit pas, ou peu, changer les propriétés des cristaux d'hydroxyapatite. Différentes méthodes de substitution existent : précipitation sol-gel, voie hydrothermique, précipitations en milieu aqueux, fusion, extrusion... [182]. Plusieurs types de « dopage ionique » sont possibles, et nous citerons quelques exemples ci-après.

- Le magnésium ( $Mg^{2+}$ )

La substitution du calcium par le magnésium est largement décrite en ingénierie tissulaire osseuse [183]. Cet ion est l'un des plus utilisés dans le cadre des substitutions. Le magnésium est un élément important pour l'activité cellulaire et notamment dans la production d'ATP, la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines [184]. Les matériaux d'HA dopés en  $Mg^{2+}$  ont été montrés comme étant biocompatibles *in vitro* et stimulant, en particulier, la production de matrice extracellulaire [185].

D'autres travaux ont montré une augmentation de l'activité de la BMP2 et de son récepteur dans des cellules cultivées sur des matrices constituées d'hydroxyapatites dopée en

magnésium. La présence de  $Mg^{2+}$  dans l'hydroxyapatite induit également un changement de composition à la surface du matériau, ce qui pourrait être un facteur favorisant l'activation de la BMP2 et de son récepteur [186].

- Le zinc ( $Zn^{2+}$ )

Le zinc est l'élément métallique le plus abondant dans le tissu osseux. Cet élément joue un rôle crucial dans la biochimie du tissu osseux en augmentant la prolifération ostéoblastique et leur différenciation. Il stimule également la production de matrice extracellulaire et de collagène. Le dopage en  $Zn^{2+}$  peut également inhiber l'activité ostéoclastique. *In vitro*, il a été montré que l'hydroxyapatite substituée au zinc induisait une augmentation de la prolifération des ADSCs et une stimulation de leur différenciation en cellules ostéoblastiques [184, 187].

Néanmoins, des effets cytotoxiques peuvent être observés selon le taux de substitution en zinc utilisé. Les substitutions avec une forte concentration en zinc sont en effet connues pour être cytotoxiques. A l'opposé, les apatites substituées avec une concentration faible en  $Zn^{2+}$ , ont montré une bioactivité et des propriétés antibactériennes très encourageantes. De façon plus précise, une diminution de la viabilité bactérienne de *S. aureus* au contact de ce même matériau a pu être observée [188]. Il semble également inhiber la prolifération de *E.coli* et de *Candida albicans* [189].

- Le strontium ( $Sr^{2+}$ )

Le strontium, est connu pour stimuler la prolifération ostéoblastique, inhiber la différenciation ostéoclastique, mais également pour avoir un rôle dans l'angiogénèse [184]. Des études *in vitro*, comparant des céramiques de silicate de calcium substituées avec du  $Mg^{2+}$ , du  $Zn^{2+}$  ou du  $Sr^{2+}$ , ont montré que la présence de strontium stimulait la différenciation des ostéoblastes et augmentait de façon significative l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéopontine (OPN), par rapport au dopage en magnésium ou en zinc [190]. Le rôle de cet élément et son mode d'action seront décrits dans le paragraphe :

#### 4. INTERET DU STRONTIUM EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

- Les co-substitutions

Dans le but de créer une synergie d'action de ces oligoéléments, et de recréer les conditions chimiques les plus proches de celles de l'os, des études ont été menées sur des techniques de co-substitution. La co-substitution du calcium contenu dans l'hydroxyapatite, par le  $Mg^{2+}$  et le  $Sr^{2+}$ , améliore notamment l'attachement, la prolifération et la différenciation de la lignée ostéoblastique MG-63, par rapport à l'hydroxyapatite non dopée [190, 191].

## 4. INTERET DU STRONTIUM EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

Le **strontium (Sr)** est un élément présent dans le corps humain, dont 99% est contenu dans le tissu osseux. Il représente 0,01% de la masse osseuse [177]. Papillon *et al.*, ont été les premiers à décrire le strontium dans le tissu osseux en 1870 [192].

Le ranélate de Sr est constitué de deux atomes de strontium et d'une molécule d'acide ranélique. L'acide ranélique est un transporteur organique, qui a été choisi pour sa bonne pharmacocinétique et ses caractéristiques physicochimiques : il ne modifie pas l'action sur le strontium. Une des caractéristiques du strontium concerne son effet sur le remodelage osseux : il promeut simultanément la formation osseuse par les ostéoblastes [193, 194] et inhibe la résorption osseuse par les ostéoclastes [194]. Son mode d'action sera décrit dans les paragraphes 4.2 et 4.3.

Différentes méthodes d'incorporation du Sr dans la substance minérale osseuse ont ensuite été publiées dans les années 50 [192]. Les propriétés protectrices des sels de strontium ont été mises en évidence quand le lactate de strontium a été montré comme diminuant la douleur osseuse et augmentant la densité osseuse de patients ostéoporotiques [195]. L'utilisation potentielle du strontium dans le traitement de l'ostéoporose a été décrite pour la première fois en 1950. En 1985, Marie *et al.* [153], et Delannoy *et al.* en 2002 [154] ont montré que de faibles doses suffisaient à augmenter la formation osseuse et le volume osseux trabéculaire chez des rats traités avec du chlorure de strontium.

Suite à ces données expérimentales et cliniques, le  $Sr^{2+}$  a donc suscité un grand engouement dans le traitement de pathologies ostéoarticulaires, telles que l'ostéoporose, sous la forme de ranélate de strontium [97].

Le ranélate de strontium est enregistré en tant que médicament dans plus de 70 pays et a été commercialisé en Europe en 2004. Il reste toutefois une molécule non approuvée par la FDA en raison des risques cardio-vasculaires qui lui sont imputés [196] [195]. Il était commercialisé sous le nom de Protelos® par la société Servier. Cette société a annoncé l'arrêt de sa commercialisation en août 2017, compte tenu des effets indésirables associés à des concentrations d'utilisation élevées et continues.

### 4.1. Mécanismes d'action du strontium

En tant qu'ion divalent de la famille des alcalino-terreux comme le  $Ca^{2+}$ , le  $Sr^{2+}$  pourrait donc agir sur des cibles cellulaires et des voies de signalisation similaires à celles du calcium.

#### 4.1.1. Activation du « calcium sensing receptor » (CaSR)

Le CaSR appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le CaSR perçoit les variations de concentration extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le CaSR est donc capable de moduler l'homéostasie du calcium au sein du tissu osseux. Les cellules osseuses expriment le CaSR, proposant ainsi une régulation directe de l'homéostasie du squelette [197]. En plus du  $\text{Ca}^{2+}$ , le CaSR détecte d'autres ions divalents, incluant le  $\text{Sr}^{2+}$  [198]. *In vitro*, l'activation du CaSR sur les ostéoclastes inhibe leur différenciation et augmente leur apoptose.

L'utilisation d'ostéoblastes issus de cellules KO pour le CaSR a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action du strontium. Les voies de signalisation induites par le strontium ne semblent pas uniquement dépendantes de l'activité du CaSR. En effet, l'effet prolifératif du ranélate de strontium sur les ostéoblastes est maintenu en absence d'expression du CaSR.

D'autres voies de signalisation pourraient être activées par le strontium, en particulier la voie Wnt /  $\beta$ -caténine [76, 192, 195].

#### 4.1.2. Activation de la voie RANK / RANKL / OPG

La voie RANK / RANKL / OPG, décrite précédemment, essentielle pour le remodelage osseux, est également une voie de signalisation sollicitée par le strontium (**Figure 24**). En effet, dans les ostéoclastes, la présence de strontium stimule la production d'OPG, diminue l'expression de RANKL au niveau génétique et protéique. Cet effet sur la concentration d'OPG et de RANKL a pour conséquence de diminuer les interactions entre le RANKL et son récepteur, et donc de réguler la différenciation des ostéoclastes au profit d'une activité d'ostéoformation par les ostéoblastes.

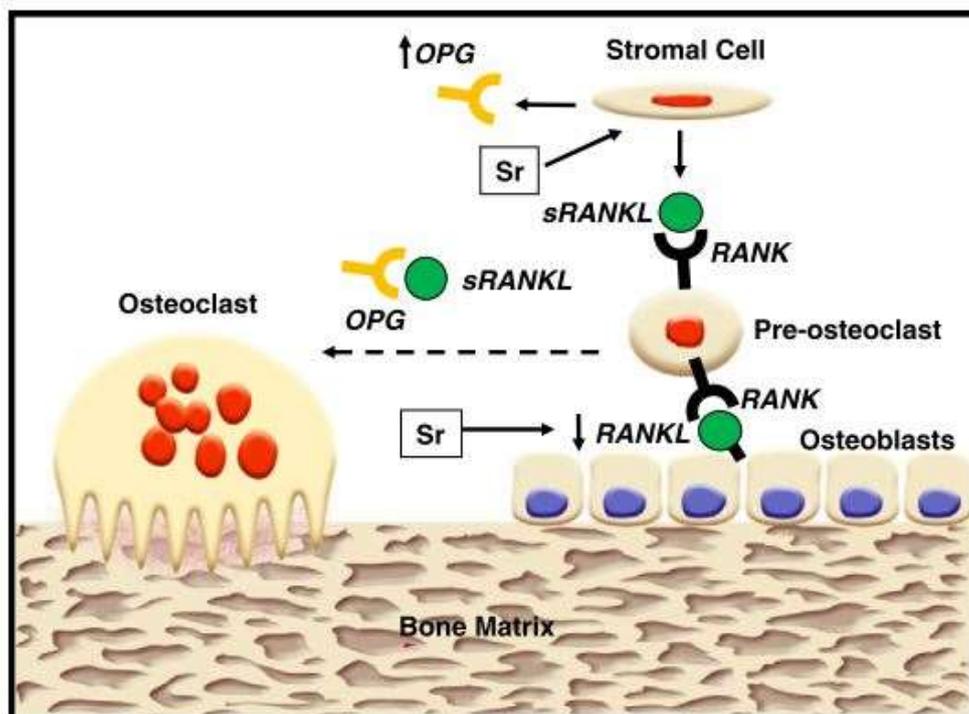


FIGURE 24 : MODE D'ACTION DU STRONTIUM : VOIE DE SIGNALISATION DU RANKL/OPG

Le facteur RANKL se lie à son récepteur RANK, exprimé à la surface des pré-ostéoclastes et activant ainsi la différenciation des ostéoclastes. Le strontium quant à lui réduit l'expression de RANKL, et augmente l'expression d'OPG, ce qui a pour conséquence une réduction de la différenciation de pré-ostéoclastes en ostéoclastes. Abréviations : OPG : Osteoprotegerin ; RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ; RANKL : RANK ligand [22].

#### 4.2. Rôle du ranélate de strontium sur l'ostéoclastogénèse

Il a été montré que le ranélate de strontium exerçait un effet inhibiteur sur l'activité ostéoclastique. Le ranélate de strontium diminue l'adhérence des ostéoclastes à la structure osseuse en perturbant leur zone de fixation et la formation d'un réseau d'actine [199]. De plus, dans une étude menée par Bonnelye E *et al.*, une diminution significative de l'activité de la TRAP (« phosphatase acide tartrate-résistante »), caractéristique de l'activité ostéoclastique, est observée, entraînant une diminution de la maturation des ostéoclastes en présence de ranélate de strontium (Figure 25) [200]. Le ranélate de strontium augmente également l'apoptose des ostéoclastes en modulant différentes voies de signalisation telles que les voies du NFκB, et PKCβII, ou encore celle du CaSR citée précédemment (Figure 26) [201].

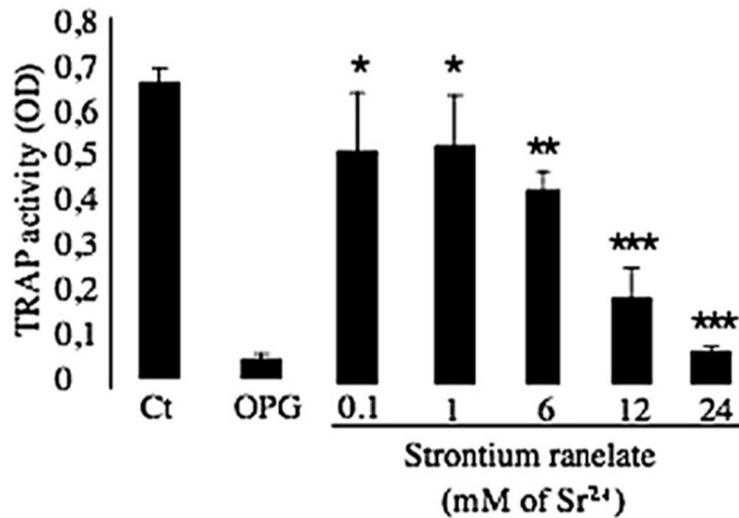


FIGURE 25 : ACTIVITE TRAP DES OSTEOCLASTES EN PRESENCE DU STRONTIUM

Les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de ranélate strontium. Le strontium induit une diminution de l'activité de la TRAP (caractéristique de l'activité des ostéoclastes). *Abréviations : Ct-cellules contrôles non traitées ; OPG-cellules traitées avec de l'ostéoprotégérine* [200].

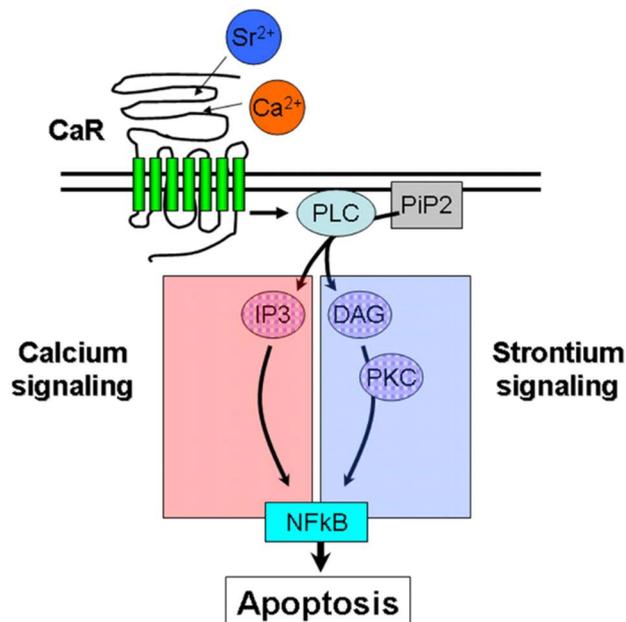


FIGURE 26 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'APOTOSE DES OSTEOCLASTES PAR LE STRONTIUM

Après stimulation par le Ca<sup>2+</sup> et le Sr<sup>2+</sup>, le CaSR active la phospholipase C (PLC), responsable de la translocation de NFkB du cytoplasme vers le noyau des ostéoclastes matures, en suivant la voie IP3. Le CaSR peut également, toujours par l'activation de la voie de la PLC, activer la voie de signalisation DAG-PKCII, qui va permettre à NFkB d'accéder au noyau, mais de façon indépendante à la voie IP3. *Abréviations : IP3 : inositol triphosphate ; NFkB : Nuclear factor kappa-b ; DAG : Diacylglycerol ; PKC : Phosphokinase C ; PIP2 : Phosphatidylinositol 4.5-bisphosphate ; CaR : Calcium receptor ; PLC : Phospholipase C* [201]

### 4.3. Rôle du ranélate de strontium sur l'ostéoblastogénèse

Le ranélate de strontium exerce un effet stimulateur sur la prolifération et la différenciation des cellules préostéoblastiques [202]. En effet, les précurseurs des ostéoblastes, ainsi que les ostéoblastes matures ayant été exposés au ranélate de strontium, présentent une forte activité de la phosphatase alcaline (PAL), marqueur de la différenciation ostéoblastique, et une synthèse accrue de collagène (élément majoritaire de la matrice extracellulaire des ostéoblastes) [200].

Le ranélate de strontium augmente également l'expression d'autres marqueurs ostéoblastiques comme la « bone sialoprotein » (BSP), et l'ostéocalcine (OCN) [203]. Parmi les voies de signalisation activées, nous citerons l'activation de CaSR, des voies MAP kinases (p38 et ERK ½) et celles des phospholipases C (**Figure 27**). L'activation de ces voies contribue à une régulation positive des marqueurs de l'ostéogénèse et de la différenciation ostéoblastique.

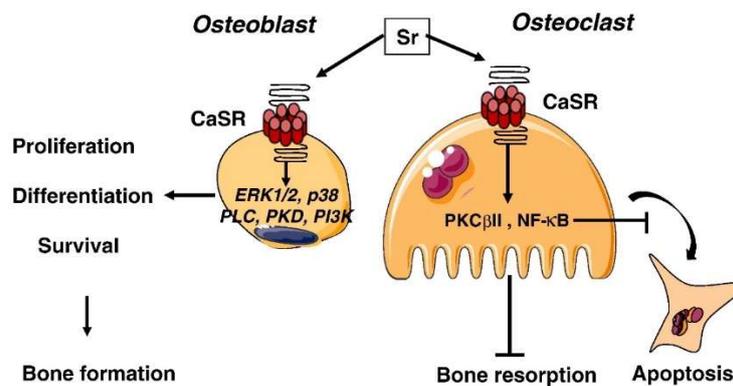


FIGURE 27 : EFFET DU STRONTIUM SUR L'OSTEOBLASTOGENESE

Le strontium promeut la prolifération des ostéoblastes, leur différenciation et leur survie en activant le CaSR, et les voies de signalisation associées. L'activation du CaSR par le Sr agit également sur les voies de signalisation régulant négativement la différenciation ostéoclastique, de leur activité et leur survie, et ayant pour conséquence une diminution de la résorption osseuse. Abréviations : PLC : Phospholipase C ; CaSR : Calcium sensing receptor ; ERK : Extracellular signal regulated kinase ; PKD : Protein kinase D ; PI3K : Phosphoinositide 3 kinase ; PKC : Phosphokinase C ; NF-κB : Nuclear factor kappa B ; Sr : strontium[22]

### 4.4. Rôle du ranélate de strontium sur l'angiogénèse

Le rôle du strontium sur l'angiogénèse a également été étudié. Liu Fei *et al.* ont montré, en 2011, que la présence de strontium dans une matrice de polyphosphates de calcium stimulait la sécrétion de VEGF par les ostéoblastes [177]. Ces observations ont été confirmées par Wei Li Fu *et al.* en 2015 [164]. Le potentiel angiogénique du strontium a également pu être mis en évidence dans le cas de co-substitution avec du cobalt [204]. Enfin, lorsque des MSCs sont cultivées en présence de titane dopé en strontium, puis qu'une co-culture de ces MSCs avec des EPCs est réalisée. Après 8 heures de culture, les EPCs sont alignées et commencent à former des structures tubulaires [205].

En conclusion, le rôle du strontium dans l'ostéogénèse et l'angiogénèse ayant été démontré, il devient donc un ion de choix pour stimuler la néoformation osseuse ainsi que la néovascularisation. Ces données biologiques et cliniques ont sans aucun doute contribué aux importants travaux de la littérature décrivant le dopage de substituts osseux phosphocalciques par le strontium.

## 5. LES MODELES PRECLINIQUES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

Afin de reproduire au mieux des situations rencontrées en clinique, un grand nombre de modèles expérimentaux sont décrits dans la littérature pour évaluer les produits d'ingénierie tissulaire osseuse. Ces études précliniques incluent des modèles du petit animal (rongeurs, lapins), au gros animal (chiens, moutons et porcs).

Dans ces modèles animaux, des modèles de reconstruction ont été développés au niveau de différents sites tels que la calvaria, le fémur et le cubitus (ou ulna). Ces modèles sont utilisés selon l'application clinique envisagée.

Par ailleurs, la taille de la lésion est également un critère à définir pour l'étude, selon la nature des produits qui sont évalués et leurs applications.

Des pertes osseuses de différents volumes et de différentes formes, dites de taille « critique » (ou non), sont alors proposées. Les différents types de lésions osseuses et leurs tailles sont regroupés dans le **Tableau 10**.

	Tibia (mm)	Radius (mm)	Fémur (mm)	Mandibule (mm)	Calvaria (diamètre ; mm)
Lapin	8	15	15	20	15 x 10
Rat	5	5	6	8	5 (diamètre)
Souris	-	-	5	4	4 (diamètre)
Mouton	50	-	25	22	35 (diamètre)
Chien	-	25	21	20	18 x 10
Porc	20	-	-	9	50

**TABLEAU 10 : LESIONS OSSEUSES DE TAILLE « CRITIQUE »**

Exemples de lésion de taille critique (mm) réalisés au niveau de différents sites anatomiques chez les animaux ; (-) : pas de valeur disponible [206]

### 5.1. Les modèles de régénération tissulaire

#### 5.1.1. L'ossification membranaire

La **régénération** ou **ossification membranaire** est un type d'ossification où le tissu osseux est directement créé à partir de l'activité d'une couche de cellules mésenchymateuses, en

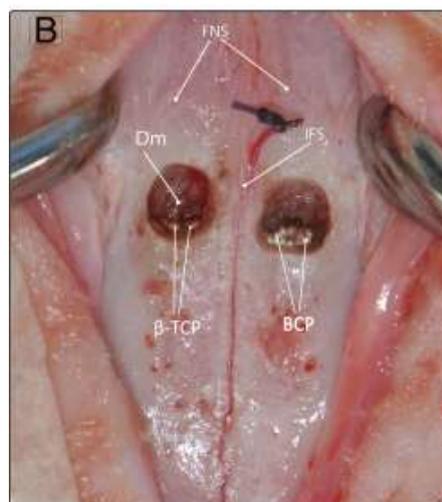
absence de formation de tissu cartilagineux. Ce type d'ossification se produit lors de la régénération de fractures osseuses d'os plats de notre squelette (**Figure 29**).

Au cours de l'ossification membranaire, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes qui se condensent en nodules compacts. Les ostéoblastes sécrètent alors une matrice de protéoglycanes permettant le dépôt de calcium et ainsi, la formation de tissu ostéoïde. Les ostéoblastes piégés dans cette matrice se transforment alors en ostéocytes.

Le mécanisme d'ossification membranaire implique un certain nombre de facteurs de croissance tels que les BMPs (BMP2, BMP4 et BMP7). Ces BMPs activent le facteur de transcription Runx 2, gène maître de la différenciation ostéoblastique. L'expression de ce facteur joue un rôle prépondérant dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes [207, 208].

Le modèle de **défaut de calvaria**, par exemple, est un modèle reprenant le principe de la régénération membranaire. Un des intérêts de ce modèle est qu'il est relativement simple à mettre en oeuvre. De plus, il est généralement effectué chez les rongeurs ou chez le lapin (**Figure 28**). Il permet d'inclure un grand nombre de sujets dans l'étude, et permet ainsi une analyse statistique des données. Le modèle de calvaria est souvent utilisé dans le cadre d'études préliminaires pour une première analyse de l'efficacité de nouveaux biomatériaux à régénérer un tissu.

Cependant, le modèle de calvaria n'étant pas toujours représentatif d'un contexte physiologique (et clinique) de la reconstruction osseuse (principalement de par l'absence de contraintes mécaniques) d'autres types de modèles de régénération osseuse sont étudiés.



**FIGURE 28 : MODELE EXPERIMENTAL DE LA CALVARIA CHEZ LE LAPIN**

Photo représentant un défaut bilatéral de calvaria chez le lapin [209]. Abréviations : Dm-Dura mater ; FB-Frontal bone ; NB-Nasal bone ; IFS-interfrontal suture ; FNS-fronto nasal suture ;  $\beta$ -TCP :  $\beta$ -Tricalcium phosphate

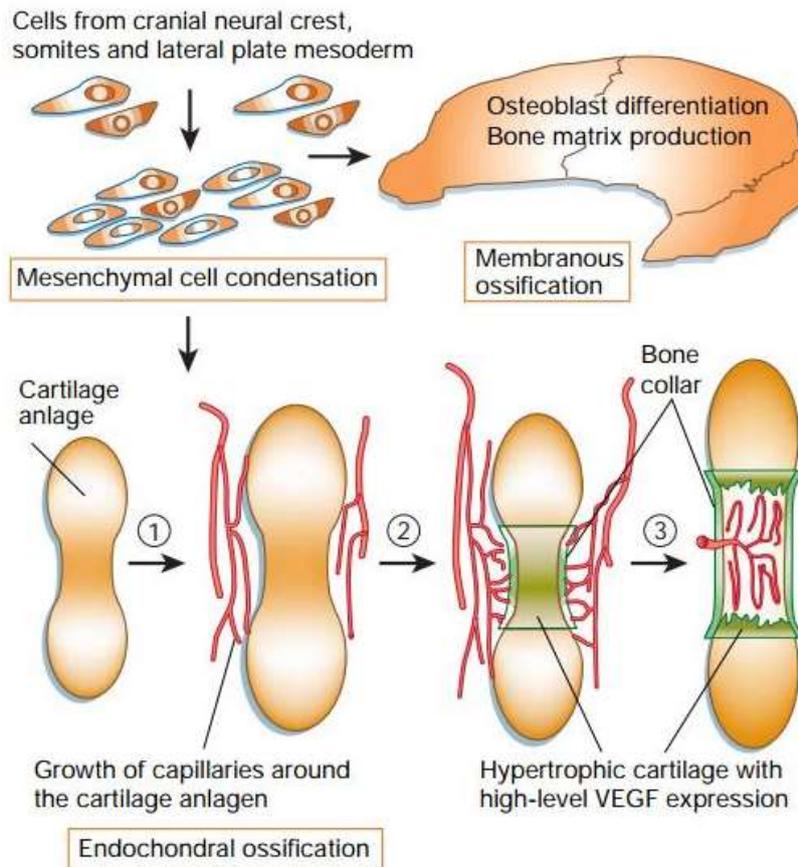


FIGURE 29 : OSSIFICATION MEMBRANAIRE ET ENDOCHONDRALE

Les cellules provenant de la crête neurale, les somites et le mésoderme forment un ensemble au niveau de la formation du futur tissu osseux. Dans le cadre de l'ossification membranaire, la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes, et la production de matrice osseuse a lieu directement (sans production de matrice cartilagineuse). Dans le cadre de l'ossification endochondrale, la différenciation des chondrocytes et la formation d'une zone cartilagineuse a lieu. La première étape (1) est l'arrivée autour de ce cal cartilagineux de nombreux vaisseaux. La deuxième étape consiste à la différenciation en ostéoblastes des cellules avoisinantes (2). Les chondrocytes présents au centre du cal, mûrissent, deviennent hypertrophiques, et expriment un taux important de VEGF. Le VEGF permet la pénétration des vaisseaux dans le cal. Dans la troisième étape (3), le cartilage hypertrophique est remplacé par la moelle et le tissu osseux.[210]

### 5.1.2. L'ossification endochondrale

Le modèle de résection diaphysaire est un exemple de régénération osseuse par **ossification endochondrale (Figure 29)**. Ce processus d'ossification peut être résumé en 3 phases. Dans un premier temps, les cellules mésenchymateuses s'orientent vers une différenciation en cellules chondrocytaires sous l'action de deux facteurs de transcription : Pax1 et Scleraxis.

Au cours de leur prolifération, ces chondrocytes sécrètent une matrice extracellulaire, puis cessent de proliférer et deviennent hypertrophiques. Ces chondrocytes hypertrophiques vont alors modifier la nature de la matrice précédemment synthétisée, en produisant du collagène de type X et de la fibronectine, pour permettre une minéralisation. Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent également du VEGF, qui sera libéré dans la matrice extracellulaire.

Le tissu cartilagineux est alors envahi par les vaisseaux sanguins suite à l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques. Le tissu est alors colonisé par les ostéoclastes et les ostéoblastes. La matrice osseuse produite remplace progressivement le cartilage présent. Les ostéoclastes permettent ensuite de former l'os spongieux au cours de l'ossification [207, 208].

## 5.2. Les modèles expérimentaux

### 5.2.1. Modèles précliniques d'ostéoinduction

L'**ostéoinduction** est la capacité d'un matériau à favoriser le recrutement de cellules indifférenciées et d'orienter leur phénotype vers le lignage ostéoblastique. L'ostéoinduction peut être démontrée après implantation de biomatériaux en site ectopique. Un **site ectopique** est un site différent du site normal où l'on trouverait l'organe ou le tissu [211]. Ainsi, dans le contexte de reconstruction osseuse, un site ectopique est un site qui ne se situe pas au niveau du tissu osseux. Les principaux sites ectopiques utilisés sont les sites sous-cutanés et le site musculaire. Les implantations en site ectopique permettent également d'évaluer la biocompatibilité, le caractère inflammatoire du matériau, sa dégradation et sa capacité à être vascularisé [206].

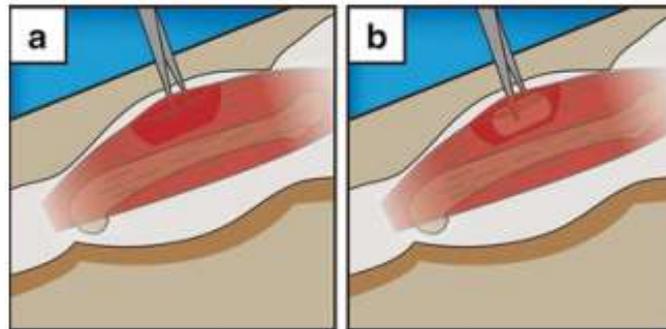
L'implantation en **site sous-cutané** consiste, en général, à réaliser une incision au niveau du dos de l'animal (**Figure 30**). Le matériau est ensuite placé sous la peau et l'incision est refermée [212]. La faible vascularisation des sites sous cutanés par rapport aux sites intramusculaires, peut être une des raisons d'une invasion tissulaire plus tardive des matériaux. La plupart des modèles animaux peuvent servir à réaliser ces implantations ectopiques. Cependant, les rongeurs restent les modèles les plus utilisés du fait de leur faible coût, mais également de la bonne élasticité de leur peau ce qui permet une implantation de matériaux de taille importante par rapport à la taille de l'animal [213].



**FIGURE 30 : IMPLANTATION EN SITE SOUS CUTANE DE BIOMATERIAUX**

Mise en place de gels de polyéthylèneglycol (PEG) dans des poches dorsales dans le dos de souris [214].

Les implantations en **site intramusculaire** sont depuis longtemps utilisées pour l'étude des mécanismes d'ostéoinduction. Le but de ce modèle d'implantation est de créer une poche au niveau du muscle et d'y introduire un matériau (**Figure 31**). Le pouvoir ostéoinducteur des BMPs a été démontré grâce à ce modèle [215]. Concernant les modèles impliquant les petits animaux (rats, souris, lapins), ce sont les muscles inférieurs des pattes qui sont le plus souvent utilisés. Les implantations intramusculaires chez les gros animaux (chien, cochon) sont quant à elles principalement situées au niveau des muscles dorsaux [213].



**FIGURE 31 : IMPLANTATION EN SITE INTRAMUSCULAIRE DE BIOMATERIAUX**

Création d'une poche intramusculaire (a), et implantation du matériau (b) a niveau d'une patte de souris [216].

Les implantations au niveau de ces sites (sous cutané et intramusculaire) sont assez simples à réaliser, peu coûteuses et très peu invasives pour l'animal. Ces zones d'implantation sont souvent utilisées lors des premiers essais *in vivo* d'un nouveau matériau. Le choix du modèle animal reste toutefois déterminant pour démontrer le potentiel ostéoinducteur d'un biomatériau. Selon le modèle animal (et le site d'implantation), les résultats peuvent être controversés [212].

### 5.2.2. Modèles expérimentaux de régénération osseuse

Un site **orthotopique** désigne le site naturel de l'organe ou du tissu. Ainsi dans le cadre de la reconstruction osseuse, le site orthotopique utilisé et étudié, est donc le tissu osseux. Ces modèles concernent à la fois le petit et le gros animal et seront décrits dans les paragraphes suivants, selon l'application considérée : l'orthopédie et la chirurgie maxillo-faciale.

- Modèles précliniques de régénération osseuse en orthopédie

En ce qui concerne le **rat**, le modèle orthotopique peut être localisé au niveau de la calvaria, que nous avons évoqué dans un paragraphe précédent, mais également au niveau des os longs. Le fémur est l'os long le plus utilisé dans les modèles expérimentaux chez le rat. En effet, la longueur et le diamètre de cet os en font un modèle intéressant. La lésion segmentaire de fémur de rat est une lésion qui peut conduire à une lésion de taille critique. Les fractures

traumatiques peuvent également être réalisées. Elles sont induites par un système de flexions en trois points.

Qu'elle soit segmentaire ou traumatique, la lésion doit être stabilisée soit à l'aide de plaques, soit de fixateurs externes.

Un autre type de lésion souvent utilisé est la lésion condyloire du fémur. Ce modèle consiste à « fraiser » la face interne du condyle avant d'y implanter le matériau sous forme injectable ou sous forme de bloc [127]. Les tailles de ces lésions sont de l'ordre de 5 mm de diamètre. De nombreux travaux réalisés au laboratoire indiquent que ces lésions sont capables à long terme de se réparer, bien que la qualité de l'os néoformé, en absence de tout traitement, ne soit pas comparable à une structure osseuse normale.

Concernant le modèle du **lapin**, des modèles de résection diaphysaire existe au niveau de l'ulna (cubitus), du radius et du tibia [217]. Ces différents défauts sont similaires à ceux décrits chez le rat. Les os des lapins étant plus épais que ceux de rats, ils sont plus faciles à manipuler, et les lésions sont donc plus faciles à réaliser [218].

En ce qui concerne les modèles précliniques en orthopédie chez le **gros animal**, les lésions et fractures du tibia, induites chez la **brebis**, sont parmi les plus utilisées. Ces lésions sont, le plus souvent, stabilisées grâce à des plaques d'ostéosynthèse ou des fixateurs externes. A titre d'exemple, *Den Boer et al*, ont implanté des granules d'hydroxyapatite au niveau d'une lésion segmentaire du tibia chez la brebis [219]. Dans ces travaux, les matrices sous forme de granules ont été utilisées pour éviter les problèmes liés à l'implantation d'un biomatériau massif. Ces granules, suivant leur taille (à l'échelle micrométrique), peuvent être injectées directement au niveau de la lésion pour s'adapter au mieux au volume et à la forme de celle-ci et réduire l'invasivité de la technique. Un des problèmes liés à l'utilisation de ces granules injectables reste leur maintien au niveau de la zone de lésion [217, 218].

Un autre modèle animal utilisé en ingénierie tissulaire osseuse est le **porc**, bien que peu de travaux soient rapportés dans la littérature. Le modèle de lésion le plus couramment utilisé est un défaut cylindrique réalisé au niveau de la métaphyse du tibia. Ce type de lésion peut également être réalisé au niveau du fémur. En ce qui concerne la résection diaphysaire, un défaut de taille critique peut être obtenu en retirant 1,5 fois le diamètre du fémur porcin [217, 218].

Les avantages et les inconvénients de ces deux modèles animaux sont présentés dans le **Tableau 11**.

	Brebis	Porc
Avantages	Relativement peu coûteux Grande gamme de poids possible	Relativement peu coûteux Grande gamme de poids possible
Inconvénients	Hébergement en extérieur Maturité tardive du squelette	Croissance rapide (poids > 100 kg) Petits os postérieurs Anatomie postérieure différente de l'Homme

TABLEAU 11 : LES MODELES PRECLINIQUES CHEZ LE GROS ANIMAL : AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Adapté de : [218]

- Modèles précliniques de régénération osseuse en chirurgie maxillo-faciale

Nous citerons dans ce paragraphe deux principaux modèles expérimentaux, le modèle du sinus lift et le modèle de résection mandibulaire.

Le **sinus lift** est une intervention réalisée en chirurgie maxillo-faciale, avant la pose d'implants. Elle vise à augmenter l'épaisseur de l'os maxillaire à l'aide d'os autologue (technique de référence) ou de biomatériau (en particulier le Bio-Oss®) afin de permettre une néoformation osseuse et une implantation dentaire. Cette technique, illustrée dans la **Figure 32**, consiste à exposer un des côtés du sinus, puis à séparer la membrane de Schneider pour pouvoir glisser la greffe autologue dans la cavité. Après la cicatrisation de cette greffe, les implants dentaires peuvent être posés. En règle générale, les chiens, moutons, et cochons servent d'animaux modèles pour ce genre de lésion. Le chien, et plus précisément le beagle, est un des modèles le plus fréquemment utilisé [220].

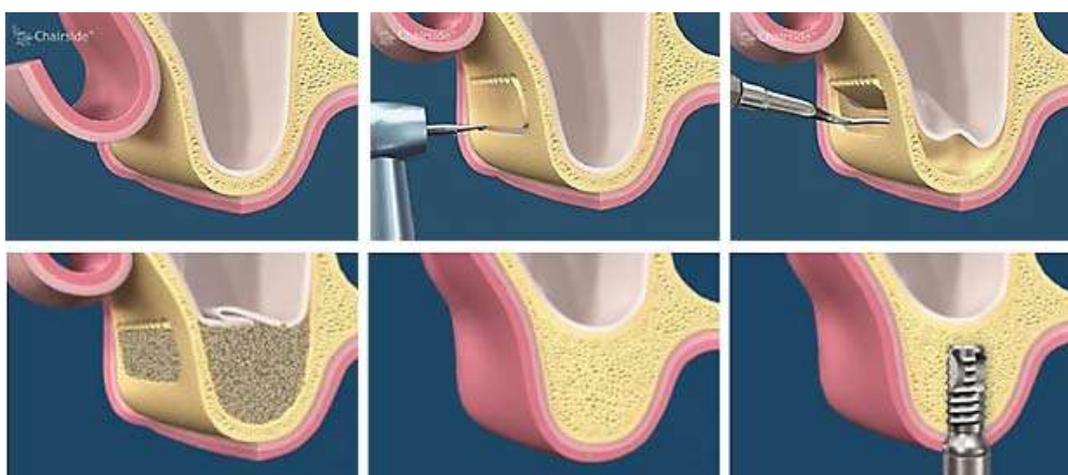


FIGURE 32 : PROCESSUS DE COMBLEMENT DU MODELE « SINUS LIFT » EN CLINIQUE

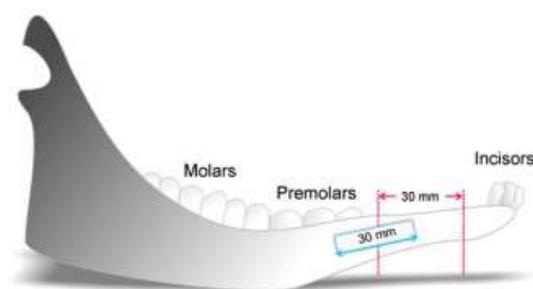
Une incision de l'os est réalisée, la membrane de Schneider est soulevée et le matériau (synthétique ou naturel), ou l'autogreffe, placés dans la cavité formée. Une fois l'os régénéré, le chirurgien peut procéder à la pose d'implants.[221]

Cette technique est intéressante dans le cadre de l'évaluation de matériaux sous forme de billes ou granules injectables. En effet, le matériau est introduit dans une cavité et le risque de dispersion dans l'organisme est donc limité. Ces cavités sont souvent recouvertes d'une membrane de collagène telle que celle commercialisée par Geistlich (Bio-Gide®) qui permet de maintenir le matériau en place. Néanmoins, l'utilisation d'une telle membrane reste controversée selon le type de matériel introduit.

Les modèles de **résection mandibulaire** ont principalement été développés chez le gros animal. En effet, les petits modèles animaux tels que le rat ou le lapin ont une mandibule beaucoup plus compliquée à atteindre et à opérer.

Ces modèles permettent de se rapprocher des ostéotomies réalisées dans le cadre de chirurgies Oto-Rhino-Laryngologiques (ORL) telles que lors de résections tumorales de la sphère orale ayant atteint l'os. Ce type d'intervention a déjà été étudié chez le primate [222], chez le chien [223], le porc [224] et la brebis (**Figure 33**) [225].

Cependant, le fait que cette lésion osseuse soit au niveau de la cavité buccale entraîne un risque infectieux plus important, qu'il faut prendre en considération lors de la mise en place du protocole chirurgical. Il est fortement conseillé de réaliser une avulsion dentaire plusieurs semaines avant d'effectuer la résection mandibulaire [217]. L'avulsion dentaire est une chirurgie réalisée principalement chez les modèles de gros animaux. Une variante de ce modèle peut être réalisée chez le rat après avoir effectué une lésion intra-osseuse au niveau des molaires, suivie de l'implantation d'un biomatériau dans cette lésion [226].



**FIGURE 33 : SCHEMA REPRESENTATIF DU DEFAUT MANDIBULAIRE CHEZ LA BREBIS**

Schéma représentant les structures impliquées dans cette lésion mandibulaire après avulsion dentaire. Les lignes rouges désignent les extrémités antérieures et postérieures du défaut, les lignes bleues la dimension d'un bloc prélevé pour réaliser une analyse micro-CT par les auteurs, incluant à la fois de l'os natif et de l'os néoformé [227]

### 5.3. Les critères de choix des modèles précliniques

L'espèce choisie pour l'étude de la régénération osseuse est souvent guidée par plusieurs critères : leur faible coût d'achat, la facilité de leur hébergement, la simplicité de l'acte

chirurgical et les applications cliniques qui seront développées par la suite. La cinétique du remodelage osseux (**Tableau 12**), la structure du tissu osseux (**Tableau 13**), les paramètres de densité osseuse, leur poids, et les questions éthiques font également parties des critères de choix [217].

Chez les petits animaux, la régénération osseuse a lieu sur une période beaucoup plus courte que pour les humains. De plus, les os des rats, souris et lapins sont plus fragiles. D'autre part, les gros animaux sont des quadrupèdes dont l'architecture des membres postérieurs peut être comparée à celles des humains. Les modèles animaux qui possèdent une architecture et une densité osseuse proche du tissu osseux humain sont les plus utilisés pour l'étude de la reconstruction osseuse et l'ingénierie tissulaire osseuse. Les principaux avantages et inconvénients sont décrits dans les paragraphes suivants et dans les **Tableaux 14 et 15** [218].

Espèce	Taux de régénération osseuse (mm / jour)
Chien	1.5 – 2
Porc	1.2 – 1.5
Homme	1 – 1.5

**TABLEAU 12 : ETUDE DE LA CAPACITE DE RECONSTRUCTION OSSEUSE DE DIFFERENTS MODELES PRECLINIQUES PAR RAPPORT A L'HOMME**

	Chien	Mouton / Chèvre	Porc	Lapin
<b>Macrostructure</b>	++	+++	++	+
<b>Microstructure</b>	++	+	++	+
<b>Composition de l'os</b>	+++	++	+++	++
<b>Remodelage osseux</b>	++	++	+++	+

**TABLEAU 13 : COMPARAISON DES STRUCTURES OSSEUSES ENTRE LE TISSU OSSEUX DE DIFFERENTES ESPECES ANIMALES ET L'OS HUMAIN**

(+) : peu similaire ; (++) : moyennement similaire ; (+++) : fortement similaire. D'après [228]

### 5.3.1. L'espèce

- Les rongeurs

Les rongeurs étant des animaux de petite taille, faciles à manipuler, font partie des animaux les plus utilisés en recherche expérimentale. Ils sont ainsi très utiles dans le cadre de tests précliniques de biomatériaux et substituts osseux. Cependant, les limites de ces modèles animaux sont nombreuses. En effet, à l'inverse des gros animaux comme les porcs ou les moutons, les rats et les souris ont de petits os, rendant les étapes chirurgicales délicates. De plus, leur cinétique de remodelage osseux n'est pas comparable à celle des os humains [229].

Modèles	Avantages	Inconvénients
Souris	Disponibilité Beaucoup de données disponibles dans la littérature Facile à mettre en place Modèle immunodéficient disponible : pas de rejet de greffe Durée de vie compatible avec des études liées à l'influence de l'âge du modèle	Vitesse de régénération osseuse importante Prélèvements de sang et de biopsies limités Transposition à la clinique limitée Etudes à long terme compliquées Taille des implants limités Considérations éthiques
Rat	Disponibilité Beaucoup de données disponibles dans la littérature Facile à mettre en place Modèle immunodéficient disponible : pas de rejet de greffe Durée de vie compatible avec des études liées à l'influence de l'âge du modèle	Vitesse de régénération osseuse importante Prélèvements de sang et de biopsies limités Transposition à la clinique limitée Etudes à long terme compliquées Taille des implants limités Considérations éthiques
Lapin	Disponibilité Maturité du squelette précoce Facile à mettre en place Beaucoup de données disponibles dans la littérature	Structure des os différente Vitesse de régénération osseuse importante Transposition à la clinique limitée Taille des implants limités Considérations éthiques

TABLEAU 14 : LES MODELES PRECLINIQUES CHEZ LE PETIT ANIMAL : AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Adapté de [171].

- Le lapin

Le lapin possède un remodelage osseux bien plus rapide que celui observé chez l'Homme [230]. Ceci rend les études difficilement transposables à l'Homme. De plus le lapin possède également des inconvénients tels que leur fragilité cardiaque [228]. Bien que leur taille facilite leur hébergement dans les animaleries conventionnelles, les lapins sont des animaux compliqués à manipuler [229]. Il reste cependant un modèle d'étude préliminaire à des modèles chez le gros animal.

- Le chien

Le **chien** possède un certain nombre d'avantages comme modèle expérimental. En effet, sa nature docile permet de le faire se déplacer durant la phase de régénération osseuse et ainsi d'observer une réparation obtenue en « phase active ». Concernant le remodelage osseux chez le chien, le renouvellement de l'os est beaucoup plus rapide que celui observé chez l'Homme, bien que des similarités au niveau de la structure de l'os trabéculaire soient observées. Un problème éthique est cependant à prendre en considération. Le chien fait partie des animaux de compagnie, et à ce titre son utilisation en expérimentation animale reste difficile [228].

- Le mouton et la chèvre

Les modèles précliniques chez le **mouton** concernent aussi bien des modèles de fractures que des modèles physiopathologiques [231] tels que l'ostéoporose et l'ostéoarthrite. Concernant le remodelage osseux chez le mouton, bien que les différences structurelles soient connues, il reste proche de celui observé chez l'Homme. En effet, la croissance osseuse, en présence d'implant, est similaire entre les deux espèces [228].

La **chèvre** est principalement utilisée pour des modèles d'étude du cartilage, du ménisque et de la réparation ligamentaire. Son remodelage osseux a été montré comme étant similaire à celui de l'Homme [228].

Un des avantages de ces deux modèles animaux est leur poids : à l'âge adulte il est similaire à celui d'un homme adulte. Ces modèles permettent ainsi d'évaluer l'efficacité de biomatériaux et de produits d'ingénierie tissulaire dans des conditions de contraintes proches de celles observées chez l'Homme, ce qui n'est pas envisageable avec les modèles chez le petit animal [229, 232].

- Le porc

Le **porc** est un modèle animal de choix, puisqu'il permet de suivre de nombreux événements physiopathologiques et de cicatrisation osseuse (au niveau maxillo-facial en particulier). Cependant, une des limites d'utilisation concerne son poids et sa croissance. En effet, il possède un poids à l'âge adulte bien supérieur à celui de l'Homme et dont il faut tenir compte lors de la mise en place d'études expérimentales sur une durée de six mois. En revanche, le remodelage osseux chez le porc est un processus quasiment identique à celui de l'os humain [228]. D'un point de vue histologique, les porcs possèdent également une structure osseuse lamellaire, proche de celle observée chez l'Homme. L'un des inconvénients liés à l'utilisation du modèle « porc », est son hébergement. En effet, tout comme les brebis et les chèvres, les porcs nécessitent plus d'espace et les conditions d'hébergement restent plus complexes à mettre en place que pour les petits animaux [229].

Modèles	Avantages	Inconvénients
Chien	Docile Densité de l'os trabéculaire similaire à l'Homme Composition biochimique similaire à l'Homme Beaucoup de données disponibles dans la littérature	Races variées Vitesse de régénération osseuse importante Coût important Grande résistance mécanique Considérations éthiques importantes
Chèvre & Mouton	Taille du corps importante permettant des implantations à de multiples endroits Densité de l'os trabéculaire similaire à l'Homme Composition biochimique similaire à l'Homme Masse corporelle similaire à celle de l'Homme Vitesse de régénération osseuse similaire	Revascularisation rapide Coût important Considérations éthiques
Porc	Anatomie osseuse, composition biochimique, densité osseuse, morphologie et régénération osseuse similaires à l'Homme	Masse corporelle importante Coût élevé Considérations éthiques

**TABLEAU 15 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'UTILISATION DE MODELES DE GROS ANIMAUX**

Adapté de [171].

Actuellement, plus de 35% des études expérimentales dans le domaine de la régénération osseuse privilégient le rat comme modèle, puis suivent les modèles chez les lapins (19%), les souris (15%), les moutons (11%), les chiens (9%), les chèvres (4%).

Les données suggèrent également que près de 70% des études précliniques sont réalisées chez le petit animal avant d'initier des travaux chez le gros animal [206].

### 5.3.2. Critères de choix annexes pour les études expérimentales

- L'âge

L'âge des animaux utilisés pour les expérimentations *in vivo* est à prendre en compte. En effet, de la même manière que l'Homme, les animaux possèdent une capacité de renouvellement et de régénération osseuse différente en fonction de leur âge. L'utilisation d'animaux matures est donc essentielle pour une bonne cohérence des résultats [233].

- Le coût

Le coût de l'hébergement et des soins nécessaires à apporter aux animaux est un autre critère important à prendre en compte lors de la mise en place d'une étude *in vivo*. En effet, plus

l'animal est grand, plus son coût est élevé : les structures d'hébergement doivent être plus grandes, les conditions d'élevage sont plus complexes et les frais de vétérinaire plus élevés.

De plus, le besoin de réaliser des expérimentations ayant un nombre d'animaux suffisant pour réaliser des analyses statistiques est fondamental.

Les comités éthiques nationaux et internationaux ont été mis en place pour valider tous les protocoles précliniques du petit au gros animal. Les essais ne peuvent être initiés sans l'accord de ce comité d'éthique. Il y a une cinquantaine d'années, la règle des **3R** a été proposée dans le but de **R**éduire le nombre d'animaux nécessaires pour les expérimentations *in vivo*, tout en ayant suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques. Cette règle met également en avant le besoin de **R**affinement des animaux, à savoir l'obligation de diminuer la douleur, le stress et de leur assurer un bien-être, et enfin, elle privilégie le **R**emplacement du modèle animal, si possible par des méthodes alternatives.

Pour répondre en partie à cette règle des **3R**, les techniques d'analyses non invasives et adaptées permettant de limiter le nombre d'animaux, tout en réalisant un suivi longitudinal, sont donc à privilégier. Les techniques d'analyses sont présentées dans le paragraphe ci-après.

#### 5.4. Les techniques d'analyse des tissus reconstruits

Ces différentes expérimentations sur les modèles animaux nécessitent de suivre et d'analyser les processus de minéralisation et de régénération osseuse qui en découlent. Ces différentes techniques peuvent être classées en techniques invasives et non invasives.

##### 5.4.1. Techniques non invasives

- Imagerie par résonance magnétique

**L'imagerie par résonance magnétique (IRM)** est une technique basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN).

Brièvement, il s'agit d'observer la RMN des protons de l'eau, contenus dans l'organisme, c'est à dire la réponse des noyaux d'hydrogène soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Les protons de l'organisme (le corps humain est constitué à 70% d'eau) s'alignent dans le même sens que le champ magnétique de l'appareil. Une antenne Radio-Fréquence (RF) émet des ondes à la fréquence de résonance des protons. Ceux-ci entrent alors en résonance. Les protons absorbent une partie de l'énergie des ondes radio et lorsque l'émission de l'antenne s'interrompt, les atomes d'hydrogène reprennent leur position d'équilibre dans le champ magnétique en restituant de l'énergie (suivant deux constantes de

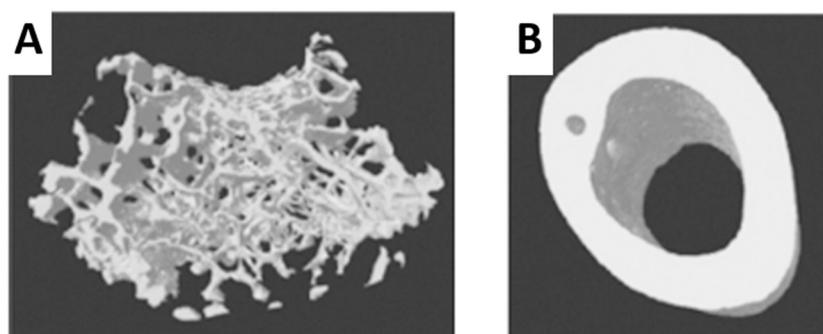
temps, les temps de relaxation T1 et T2). Les temps de relaxation « T1 » et « T2 » dépendent de la nature des tissus.

C'est à partir de ces différences, en fonction des tissus, que l'on peut obtenir des images de contraste différent. Ces images sont appelées images pondérées « T1 » ou « T2 ». En IRM, il n'existe pas d'échelle de densité. On parle alors « d'hyper-intensité » ou « d'hypo-intensité » du signal en « T1 » ou en « T2 », définie par rapport à l'aspect d'un tissu adjacent [234]. Il est ainsi possible d'observer le tissu osseux grâce à la modélisation d'une image en 2 dimensions puis 3 dimensions, de la zone étudiée [235].

Ribot *et al*, ont montré que l'IRM, conjointement au micro-CT, permettait de réaliser un suivi longitudinal de la régénération osseuse, de la dégradation du matériau implanté, mais également de la vascularisation du tissu néoformé [87].

- Microtomographie à rayons X

**La microtomographie à rayons X** (micro-computed tomography –  $\mu$ CT) permet d'analyser les différentes propriétés architecturales du tissu osseux. En effet, il s'agit d'une méthode d'analyse non destructive permettant une reconstruction d'images en trois dimensions avec une résolution de l'ordre de quelques  $\mu$ m. Comme présenté sur la **Figure 34**, le  $\mu$ CT permet également d'obtenir des données quantitatives des différentes propriétés corticales et trabéculaires de l'os (volume osseux / volume total ; BV/TV) [235-237]. Dans le cas de matrices à base de phosphate de calcium, leur radio-opacité rend difficile leur suivi longitudinal de la régénération osseuse. A l'opposé, l'analyse micro-CT permet de visualiser ce type de matériaux dès leur implantation [238].



**FIGURE 34 : REPRESENTATION 3D DE TISSU OSSEUX DE SOURIS APRES ANALYSE AU MICRO-CT**

(A) Os trabéculaire de vertèbre ; (B) Os cortical de fémur [239]

#### 5.4.2. Techniques d'analyses invasives

Ces méthodes nécessitent d'avoir un échantillon prélevé sur l'animal, ce qui implique le plus souvent, un sacrifice, et une multiplicité du nombre d'échantillons pour une analyse statistique des résultats. L'histologie et les techniques d'histomorphométrie sont les techniques de référence utilisées régulièrement pour analyser la nature de l'os néoformé et ses propriétés. Les échantillons peuvent être :

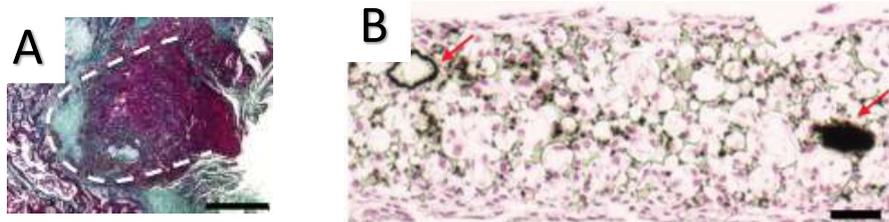
- décalcifiés, puis inclus dans de la paraffine
- non décalcifiés, puis inclus en résine (*i.e.* méthylméthacrylate)

- Analyses et colorations histologiques

Les colorations les plus répandues sont le Trichrome de Masson (pour les inclusions en paraffine), et le Goldner (pour les inclusions en résine). Ces colorations permettent de mettre en évidence la présence de structures ostéoïdes (en violet), mais également les fibres de collagène (en vert) (**Figure 35A**). L'Hématoxyline Eosine Safran (HES) est une coloration largement utilisée pour colorer les fibres de collagène.

Un autre type de coloration peut être effectué, la coloration de Von Kossa, permet de mettre en évidence la présence de calcium en utilisant du nitrate d'argent (**Figure 35B**).

Le rouge alizarine est une autre coloration permettant le suivi de la minéralisation. Elle permet d'identifier le calcium présent dans les coupes de tissus. Le calcium forme un complexe avec le rouge alizarine, bi-réfringent. Le rouge alizarine interagissant avec le calcium, cette coloration ne peut être utilisée lorsque les biomatériaux étudiés sont composés de phosphate de calcium.



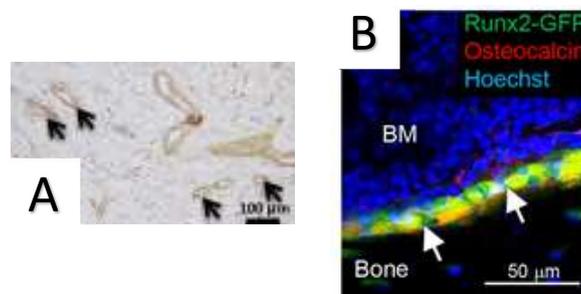
**FIGURE 35 : COLORATIONS AU TRICHOME DE MASSON ET AU VON KOSSA**

(A) Marquage au Trichrome de Masson d'une section de condyle après une lésion (Echelle : 1000  $\mu$ m). Les pointillés blancs indiquent la lésion initiale effectuée dans le condyle [240] ; (B) Marquage de Von Kossa de particules d'HA et de nodules de minéralisation (flèches) de la matrice « PolyHIPE +5 wt% hydroxyapatite », contenant de cellules MG63, après 14 jours de culture (Echelle : 100  $\mu$ m) [241]

- Analyses immunohistochimique et immunofluorescence

Ce type de marquage permet de mettre en évidence les antigènes spécifiques des cellules intervenants dans la régénération osseuse comme les cellules endothéliales (CD31 ; **Figure 36A**), les ostéoblastes (runx2, OCN ; **Figure 36B**), ou encore les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire [236, 242].

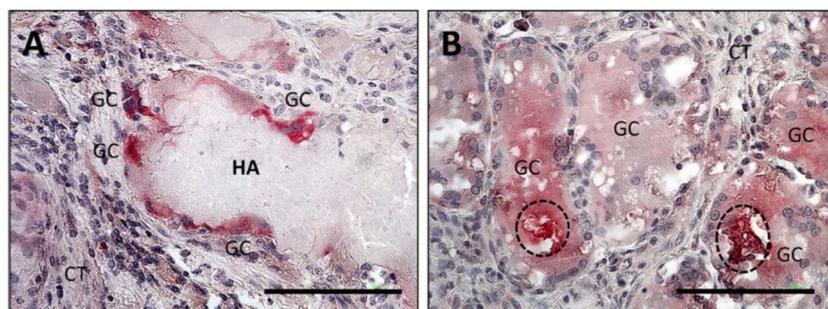
L'antigène peut être visualisé de différentes manières. Des enzymes, comme la peroxydase (Horseradish Peroxidase (HRP)), couplées à un anticorps, sont souvent utilisées pour révéler le complexe antigène-anticorps formé en présence de son substrat. Des anticorps secondaires couplés à une molécule fluorescente (rhodamine, FITC,...) peuvent être également utilisés pour révéler la présence d'antigènes sur les coupes histologiques.



**FIGURE 36 : MISE EN EVIDENCE DE CELLULES ENDOTHELIALES ET OSTEOBLASTIQUES AU NIVEAU CONDYLAIRE**

(A) : Immunohistomarquage de l'antigène CD31 (HRP) au niveau d'une lésion condyalaire [240] ; (B-C) : Immunomarquage des ostéoblastes (fleches blanches) par immunomarquage de runx2 (en vert) et de l'ostéocalcine (en rouge). La coloration de Hoechst (en bleu) met en évidence tous les noyaux cellulaires [243].

Le marquage de la TRAP (Phosphatase Acide Tartrate-Résistante) sur des sections non-décalcifiées est également utilisé pour la visualisation des cellules de type ostéoclastique. Ce marquage permet en particulier de suivre l'activité de résorption des biomatériaux.



**FIGURE 37 : MISE EN EVIDENCE DE CELLULES GEANTES MULTINUCLEEES PAR LE MARQUAGE DE LA TRAP**

(A) Marquage de la TRAP après implantation d'hydroxyapatite en site intramusculaire chez la chèvre ; (B) Marquage de la TRAP après implantation de  $\beta$ -TCP en site intramusculaire chez la chèvre. Abréviations : GC : Cellules géantes multinucléées ; HA : hydroxyapatite ;  $\beta$ -TCP :  $\beta$ -Tricalcium phosphate [242].

#### 5.4.3. *Autres techniques d'analyse*

Outre ces différentes caractérisation histomorphométriques et immunomarquages, des techniques telles que l'hybridation in situ (reconnaissance d'une petite séquence d'acide nucléique) font également parties des techniques invasives permettant d'identifier les molécules cibles impliquées dans l'angiogenèse, l'ostéogénèse ou encore de cibler des séquences spécifiques d'une espèce, dès lors que les biomatériaux sont cellularisés avec des cellules humaines et implantés dans un modèle expérimental, pour assurer leur suivi in vivo après implantation (et/ou leur devenir).

Concernant les expérimentations in vitro, un grand nombre de techniques de biologie moléculaire sont disponibles. Parmi elles la « Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) », permettant de quantifier l'expression de gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation, ou dans un processus de différenciation. Des techniques de « Western blot » peuvent être utilisées pour des analyses protéomiques, lorsque les quantités de protéines extraites d'un produit d'ingénierie tissulaire sont suffisantes pour ces types d'analyses.

La mise en évidence, qualitativement et quantitativement, de l'activité de certaines enzymes, telle que la phosphatase alcaline (PAL), impliquée dans la différenciation ostéoblastique, fait également des techniques disponibles pour les analyses des expérimentations in vitro.

# OBJECTIFS

Compte tenu des données de la littérature dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, des difficultés à développer une recherche clinique dans ce domaine en utilisant des matrices tridimensionnelles associées avec des cellules autologues ou encore avec des facteurs de croissance, notre choix s'est orienté vers une stratégie de développement d'une **matrice biocompatible et prête à l'emploi** qui réponde au cahier des charges d'un substitut osseux pour la régénération de lésions osseuses complexes.

Les travaux précédents réalisés au laboratoire, menés en collaboration avec l'équipe du Dr. D. Letourneur (Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle – LVTS – U1148) à Paris.

ont permis le développement d'une matrice composite de polysaccharides, biocompatible, biodégradable, contenant des particules d'hydroxyapatite, offrant des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction sans l'ajout de facteurs de croissance et/ou d'une composante cellulaire autologue [244].

Dans ce travail de thèse, nous avons souhaité poursuivre cette démarche, en améliorant les propriétés ostéoinductrices et angiogéniques de cette matrice pour répondre à un besoin clinique particulier : celui de la régénération osseuse en territoires irradiés, sites présentant d'importantes lésions vasculaires. Compte tenu des données cliniques et expérimentales, notre choix s'est orienté vers les techniques de dopage de cette matrice par du strontium. En effet, son double impact sur l'angiogénèse et l'ostéogénèse nous a paru intéressant pour la mise au point d'un biomatériau pour la régénération osseuse après radiothérapie.

#### **Les principaux objectifs de cette thèse sont :**

- L'optimisation de la formulation de la matrice composite de polysaccharides précédemment développée en faisant i) varier la quantité de particules d'hydroxyapatite dispersées dans la matrice de polymère et ii) en substituant le calcium dans ces cristaux d'HA par du strontium, à différents taux de substitution ;
- L'évaluation des propriétés physicochimiques et biologiques de cette matrice ;
- L'évaluation de l'efficacité de ces nouvelles formulations dans des modèles précliniques, du petit au gros animal.

**De manière plus précise, les résultats de ce travail sont présentés sous forme de deux articles complétés par des données supplémentaires.**

**La première partie de ce travail a été d'optimiser la matrice de polysaccharides précédemment présentée et d'évaluer sa biocompatibilité (Article 1 en révision dans *Plos One*).**

- Nous avons, dans un premier temps modifié les cristaux d'hydroxyapatite par différents taux de substitution de strontium (8 et 50 %) et analysé leurs propriétés physico-chimiques.

- Puis, des approches *in vitro* nous ont permis de déterminer l'effet de concentrations croissantes de particules d'HA, dopées ou non en strontium à différents taux de substitution, dispersées dans la matrice de polysaccharides, sur la différenciation des cellules souches humaines mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique.
- Des études *in vivo* chez la souris, après implantation en site sous cutané, ont permis de définir la quantité optimale de particules d'hydroxyapatite et de strontium, capables de stimuler la minéralisation ectopique, la formation de tissu ostéoïde et la néoformation de vaisseaux.
- Ces études *in vivo* ont été complétées par une analyse de la régénération osseuse dans le modèle de comblement du condyle fémoral chez le rat déjà mis au point au laboratoire.

**La deuxième partie de ce travail** concerne l'évaluation de ces nouvelles générations de matrices pour la régénération de lésions osseuses après radiothérapie.

La résection segmentaire du tibia chez le rat en utilisant la technique de Masquelet [54] et des membranes induites a été mise au point au cours de ce travail de thèse.

- Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de la radiothérapie sur la formation et les propriétés biologiques de la membrane induite en présence de deux types de polymères utilisés lors du premier temps opératoire : le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), ciment chirurgical de référence pour cette technique de reconstruction, et le silicone. Ce dernier pourrait permettre une meilleure manipulation de la membrane induite néoformée et faciliter l'implantation de la matrice de polysaccharides élaborée dans la première partie de notre travail après retrait du polymère (**Article 2 en révision dans *Tissue Engineering Part A***).
- Dans un second temps, nous avons mis au point le modèle de résection segmentaire du tibia chez le rat, accompagné d'une procédure de radiothérapie. Les premiers essais expérimentaux sont en cours d'analyses.

**La troisième partie de ce travail** concerne l'évaluation préclinique de ces formulations dans un modèle expérimental chez le « mini porc », après résection mandibulaire et radiothérapie.

Nous avons, au cours de cette thèse, mis au point ce modèle préclinique, initié les résections mandibulaires. Les essais expérimentaux chez ce gros animal sont actuellement en cours de réalisation. Ils utilisent i) soit l'autogreffe comme technique de référence pour la reconstruction tissulaire osseuse, soit ii) les nouvelles matrices de polysaccharides optimisées pour leur teneur en particules d'hydroxyapatite et en strontium.

Ces deux dernières parties devraient faire l'objet de deux articles (Reconstruction en territoire irradié chez le rat ; Reconstruction en territoire irradié chez le mini-porc).

Les deux articles, en cours de révisions (**Article 1**), et accepté (**Article 2**), présentés ci-après sont précédés chacun d'une brève introduction pour présenter le travail réalisé, suivie d'une discussion.

**La dernière partie de ce manuscrit** sera consacrée à une discussion générale et aux perspectives de ce travail.

Les différents objectifs et étapes de mon travail de thèse sont résumés dans la **Figure 38**.

*L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Docteur Didier Letourneur directeur du Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle à Paris (Unité INSERM 1148).*

*Mes travaux de thèse ont été réalisés grâce au soutien de la Fondation de la Recherche Médicale (FRM).*

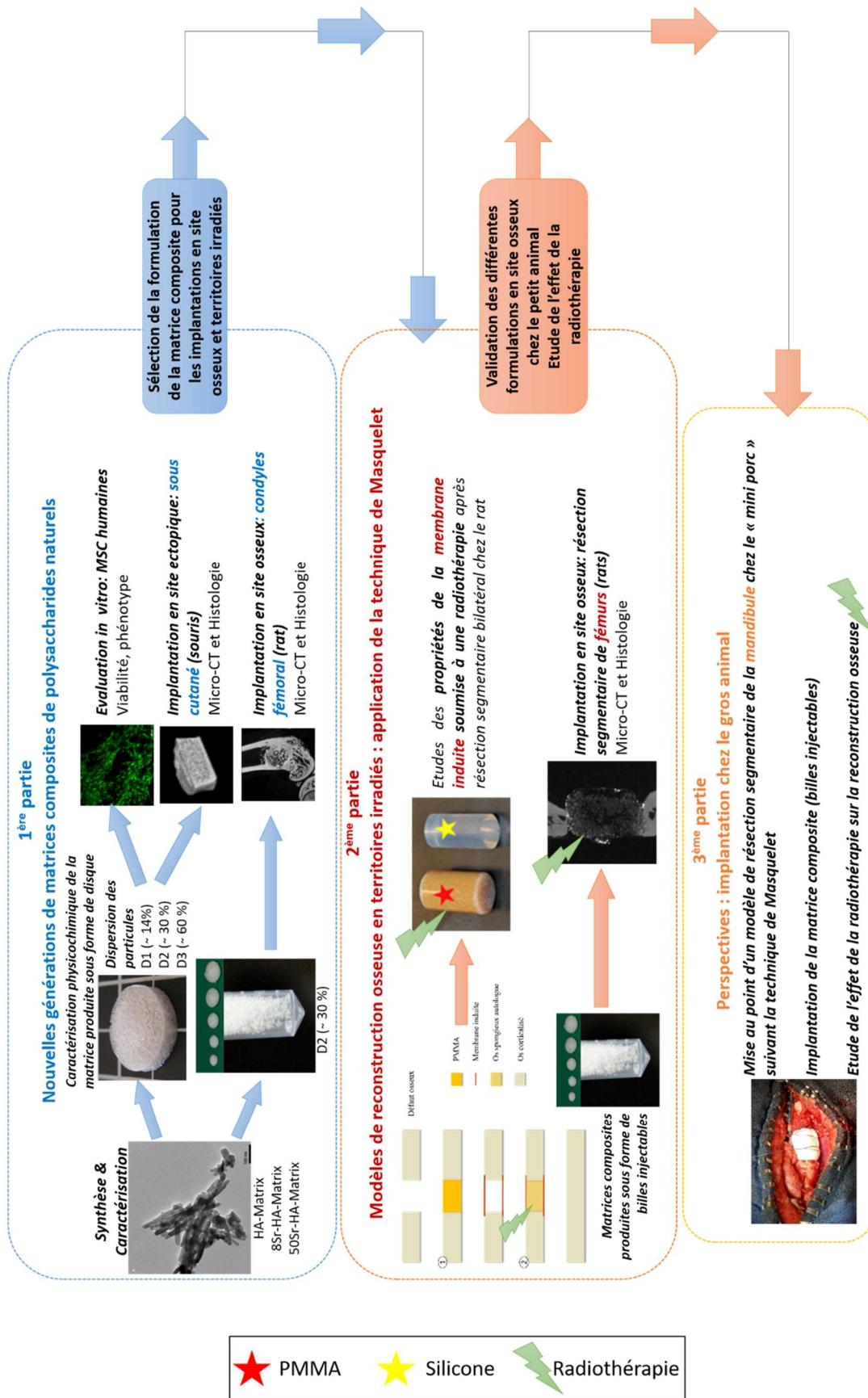


FIGURE 38 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTS OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

# RESULTATS

# Première partie :

**Développement d'une matrice de polysaccharides composée de  
particules d'hydroxyapatite dopées en strontium**

**Analyse des propriétés physicochimiques et biologiques**

## A. Introduction

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une matrice composite « prête à l'emploi », répondant au cahier des charges d'un substitut osseux, offrant des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction, sans avoir recours à une composante cellulaire et/ou des facteurs de croissance associés.

Les travaux rapportés dans la littérature témoignent de l'intérêt des matrices composites constitués i) d'une phase de polymères, pour lesquels des modifications chimiques et physiques permettent de modifier leur fonction et leurs propriétés, et ii) d'une phase minérale, le plus souvent des particules d'hydroxyapatite, de différentes tailles et formes, produites selon différents procédés de fabrication (précipitation...) à basse ou haute température.

Parmi les nombreux exemples décrits dans la revue bibliographique, le collagène [74], le chitosane [77, 78] ou encore la polycaprolactone (PCL) [92, 93, 245] sont des polymères très largement utilisés pour le développement de telles matrices composites. Néanmoins, celles-ci offrent des propriétés ostéoinductrices et angiogènes seulement après supplémentation avec des cellules mésenchymateuses, des facteurs ostéoinducteurs et /ou angiogènes.

Des travaux précédents au sein du laboratoire, menés en collaboration avec le laboratoire LVTS-U1148 (Paris), nous ont permis de montrer la biocompatibilité, la biodégradabilité et le pouvoir ostéoinducteur d'une matrice composite macroporeuse constituée de polysaccharides (pullulane et dextrane), contenant des particules d'hydroxyapatite [244]. Il a été montré que ces matrices étaient capables de retenir des facteurs tels que la BMP 2 ou encore le VEGF circulant, suite à leur implantation en site ectopique (sous cutané) [244].

Au cours de ce premier travail, un seul ratio de dispersion de ces particules d'hydroxyapatite avait été utilisé (14 % m/m de particules d'hydroxyapatite), sans pour autant connaître l'effet de concentrations supérieures de ces particules. Or les travaux de la littérature démontrent des propriétés biologiques différentes selon le ratio entre la phase minérale et le polymère [246-248].

Par ailleurs, comme décrit dans la revue bibliographique, la vascularisation des tissus néoformés reste un des critères fondamentaux pour favoriser la régénération osseuse. Dans ce contexte clinique, et pour répondre à ce cahier des charges sans avoir recours à l'association avec des facteurs angiogéniques et/ou une double composante cellulaire vasculaire [162, 164, 249], nous avons opté pour la substitution cationique au sein de l'hydroxyapatite par du strontium sachant que cet élément est déjà utilisé en clinique sous forme de ranelate dans le traitement de l'ostéoporose [97, 195], mais également connu pour sa double action sur la néoformation osseuse et la stimulation de l'angiogenèse [200].

Par ailleurs, de nombreux travaux témoignent de l'intérêt de cette substitution cationique [250, 251], sans pour autant connaître le taux de substitution optimal en strontium capable

de favoriser une régénération osseuse, sans être cytotoxique et sans activer une résorption osseuse trop importante.

**L'objectif** de cette première étude, présentée dans la **Figure 39** a donc été de développer de nouvelles générations de matrices de polysaccharides (pullulane, dextrane) contenant des particules d'hydroxyapatite en i) **optimisant le ratio entre le contenu minéral et le contenu en polysaccharides de cette matrice puis en ii) supplémentant cette matrice par du strontium**, par substitution du calcium par du strontium dans les cristaux d'hydroxyapatite.

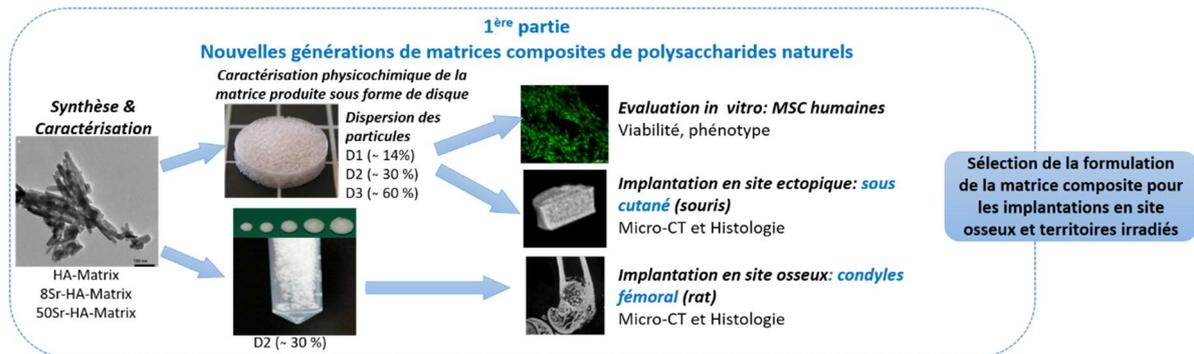


FIGURE 39 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'OBJECTIF DE LA PREMIERE PARTIE

L'article 1 regroupe les différentes étapes de ce travail :

- **Synthèse et caractérisation des particules d'hydroxyapatite dopées ou non en strontium.** Les méthodes de caractérisations physicochimiques utilisées sont les suivantes : diffraction aux rayons X (XRD), Infrared spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- **Etude de l'effet de la dispersion, à différents ratios (14, 30 et 60 % nommés dans l'article D1, D2 et D3), des particules d'hydroxyapatite dans la matrice de polysaccharides :**
  - o Caractérisation physicochimique des matrices de polysaccharides contenant les particules de HA à l'aide des techniques suivantes : microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM), et ICP-OES.
  - o Détermination de la concentration optimale d'hydroxyapatite à l'aide de modèles expérimentaux chez la souris. Les matrices composites constituées des trois ratios de dispersion (D1, D2, D3) ont été implantées en site ectopique (sous cutané) pendant 2 et 4 semaines. Les explants ont été analysés par microtomographie à rayons X (micro-CT) afin de quantifier la densité minérale osseuse et le contenu en minéral produit par chacune des formulations. Ces paramètres nous ont permis dans un premier temps d'optimiser le contenu minéral dans la matrice de polysaccharides.

- **Etude de l'effet de la substitution en strontium dans les particules d'hydroxyapatite sur les propriétés biologiques des matrices composites.** Deux taux de substitution ont été utilisés (8 et 50 % nommés dans l'article 8Sr-HA et 50Sr-HA) et les particules de HA issues de ces deux productions ont été dispersées aux trois dispersions citées précédemment (D1, D2 et D3).

Pour chacun des taux de substitution utilisés (8 et 50 %) ont été réalisées des :

- **Etudes *in vitro*** : Evaluation *in vitro* de la biocompatibilité des matrices composites dopées ou non en strontium, vis-à-vis de cellules mésenchymateuses humaines (MSCs) obtenues à partir de prélèvements de moelle osseuse chez des patients issus du service d'Orthopédie du Pr Fabre (CHU Pellegrin, Bordeaux)
  - Test de viabilité cellulaire
  - Mesure de l'activité métabolique
  - Mesure de l'expression de deux marqueurs de différenciation ostéoblastique (*Runx2/Cbfa1*, *ostéopontine*) par « quantitative Polymerase Chain Reaction » (qPCR)
- **Etudes *in vivo*** : Evaluation *in vivo* des matrices composites dopées ou non en strontium sur la néoformation osseuse et la formation de nouvelles structures vasculaires dans le tissu néoformé. Les explants après 2 et 4 semaines d'implantation en site sous-cutané ont été analysés par
  - Analyses au micro-CT
  - Analyses histologiques : Trichrome de Masson, et immunomarquage du CD31 (marqueur des cellules endothéliales)

L'article 1 rassemble essentiellement les données obtenues suite à l'implantation des matrices dopées aux deux taux de substitution (8 et 50 %) dispersées à 30 % (D2) dans la matrice de polysaccharides. Néanmoins, les résultats obtenus pour chacune de ces dispersions (D1, D2 et D3) seront présentés, dans la discussion de cet article, afin de justifier les choix d'une nouvelle formulation de matrices pour des implantations en site osseux.

D'autre part, les données supplémentaires concernant l'implantation de ces nouvelles générations de matrices dans le modèle du condyle fémoral viennent compléter ces études expérimentales chez le petit animal.

# ARTICLE 1

## STRONTIUM-DOPED HYDROXYAPATITE POLYSACCHARIDE MATERIALS EFFECT ON ECTOPIC BONE FORMATION

C. Ehret, R. Aid-Launais, T. Sagardoy, R Siadous, R. Bareille, S. Rey, S. Pechev, L. Etienne, J. Kalisky, E. de Mones, D. Letourneur<sup>2</sup>and J. Amedee Vilamitjana

*PLoS One. 2017 Sep 14;12(9):e0184663. doi: 10.1371/journal.pone.0184663*

## B. Résultats

### **Abstract**

Previous studies performed using polysaccharide-based matrices supplemented with hydroxyapatite (HA) particles showed their ability to form in subcutaneous and intramuscular sites a mineralized and osteoid tissue. Our objectives are to optimize the HA content in the matrix and to test the combination of HA with strontium (Sr-HA) to increase the matrix bioactivity. First, non-doped Sr-HA powders were combined to the matrix at three different ratios and were implanted subcutaneously for 2 and 4 weeks. Interestingly, matrices showed radiolucent properties before implantation. Quantitative analysis of micro-CT data evidenced a significant increase of mineralized tissue formed ectopically with time of implantation and allowed us to select the best ratio of HA to polysaccharides of 30% (w/w). Then, two Sr-substitution of 8% and 50% were incorporated in the HA powders (8Sr-HA and 50Sr-HA). Both Sr-HA were chemically characterized and dispersed in matrices. *In vitro* studies performed with human mesenchymal stem cells (MSCs) demonstrated the absence of cytotoxicity of the Sr-doped matrices whatever the amount of incorporated Sr. They also supported osteoblastic differentiation and activated the expression of one late osteoblastic marker involved in the mineralization process *i.e* osteopontin. *In vivo*, subcutaneous implantation of these Sr-doped matrices induced osteoid tissue and blood vessels formation.

Keywords: Bone mineralization - Bone formation - Strontium – Polysaccharides –Ectopic mineralization

### **1. Introduction**

For patients encountering a surgical bone reconstruction, new developments in orthopaedic and cranio-maxillofacial surgery are expected, especially for non-union fractures, large bone defects, bone physiopathologies and bone reconstruction following tumor resection [1]. In such clinical context, the reconstruction of large volume defects remains challenging because of a lack of vascularization of the newly formed tissue. Clinical alternatives to autografts and allografts [2] include i) the use of biomaterials [3] such as bioceramics, metallic implants (*e.g.* titanium alloys), natural or synthetic polymers, ii) the production of tissue-engineered constructs that combine scaffolds with mesenchymal stems cells [4, 5] and endothelial progenitor cells [6], growth factors, especially osteoinductive factors, or angiogenic growth factors [6]. However, tissue-engineering strategies are facing the difficulty to obtain reproducible and sufficient autologous cells from non-healthy patients with an osteogenic capacity. Tissue-engineered constructs are also labor intensive to produce with low throughput, and these advanced cell therapies are associated with stringent regulatory hurdles. Additionally, when considering an oncological context for bone reconstruction, autologous undifferentiated cells with capacity for self-renewal have a potential for tumor

formation. While the use of Bone Morphogenic Proteins (BMPs) has been approved for specific bone regeneration applications, their use is contraindicated in an oncological context, due to concerns that this anabolic growth factor may contribute to tumor cell proliferation [7]. Consequently, the development of cell-free and growth factor-free approaches for the replacement of diseased or damaged bone tissue is expected for such specific clinical needs. Based on the nature and structure of bone tissue as a composite material, composed of nano-, micro- and macro-scale elements, natural polymers have an advantageous role in the production of biocomposite scaffolds, made of an organic polymeric materials and an inorganic product [8]. Among these polymers, collagen, chitosan, dextran, alginate are the typical biomaterials used to produce natural-based biocomposites [5, 8]. Some of them are injectable and have intrinsic properties for preclinical applications [9]. These nano-composites scaffolds have shown promise as a synthetic bone graft substitute for stimulating osteoconductive properties of the materials, with improved architecture and mechanical properties [10]. Since natural bone is composed of nano-sized hydroxyapatite crystals with needle-like morphology, numerous papers described the synthesis of hydroxyapatite with a bone-like nanometric structure for tissue engineering applications [11, 12]. Particles of hydroxyapatite (HA) are synthesized using different methods and temperature (precipitation, wet mechanochemical method, calcination process) [13, 14] and numerous synthesized routes lead to different productions of HA, exhibiting different shapes, sizes (from 50 nm to few micrometers as nanoparticle aggregates) different biological characteristics and bioactive properties [11]. The mode in which aggregation takes place plays an important role in their biological properties. Additionally, the amount of HA within the polymer and their mode of dispersion can modify the bioactive properties of the composite scaffold [15].

Besides the nanophase of HA, as previously described in the literature [6], the major calcium phosphate component of bone tissue is not an homogenous material, and bone incorporates also other elements (*i.e.* Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, or Sr<sup>2+</sup>) in the form of trace elements [16]. These trace elements have been found to play vital function in growth and bone repair [17]. They can control the degradation, increase the mechanical strength of the materials and positively regulate their bioactive properties such as osteoconduction [17]. One of the cations that can substitute for calcium in the structure of HA, the Strontium (Sr), has drawn increasing interest [18] because of its beneficial effect on bone formation and its prevention of bone resorption [16, 19]. Its clinical application for osteoporosis treatment [20, 21] has been reported as well as an enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted materials [22, 23]. *In vitro* and *in vivo*, the effect of Sr seems to be connected to the ratio of Sr-substituted within the HA [24-26]. Numerous *in vitro* studies have described that Sr-doping in HA facilitates proliferation and differentiation of osteoblasts [27-30] by activating calcium-sensing receptor, which stimulates both osteogenesis and angiogenesis [31, 32]. A low dose of Sr has previously shown to increase bone mineralization while a high concentration could have a negative effect [26, 33, 34].

Our previous work using macroporous polysaccharide-based scaffolds composed of pullulan-dextran combined with 14% of nanocrystalline hydroxyapatite particles, showed their ability

to form, ectopically, a mineralized and an osteoid tissue in two ectopic sites (subcutaneously in mice and intramuscularly in sheep) [35]. Therefore, hypothesis of this study was to test the combination of HA and strontium at a specific ratio, that should improve the bioactivity of this natural polysaccharide-based matrix, especially angiogenesis.

In this study, particles of hydroxyapatite with different ratios of Sr-substitution (8 % and 50 %) were synthesized and characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) for the determination of the Sr and calcium (Ca) content. The non-substituted and substituted hydroxyapatites were then combined to the polysaccharides at different ratios. Matrices doped or not with strontium were further studied by environmental scanning electron microscopy (ESEM), by ICP-OES. *In vitro* cellular behaviour of human mesenchymal stem cells, and ectopic mineralization and bone formation after their subcutaneous implantation in mice were then investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Synthesis of hydroxyapatite particles

HA particles were synthesized by wet chemical precipitation [14] with some modifications. Briefly, HA particles were synthesized using 50 mL of 1.08 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solution and 50 mL of 0.65 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  solution, heated at 90°C. The pH of solution was adjusted to 10 with  $\text{NH}_4\text{OH}$ , added dropwise under stirring. The precipitate was maintained for 5 h at 90°C under stirring, and then washed 4 times with  $\text{CO}_2$ -free distilled water. Strontium substituted hydroxyapatite (Sr-HA) was obtained following the same procedure by adding  $\text{Sr}^{2+}$  ions into the  $\text{Ca}^{2+}$  solution, before adjusting the pH to 10 with  $\text{NH}_4\text{OH}$ . For this purpose, the appropriate amounts of  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  were dissolved in order to obtain 8 % or 50 % (molar ratio) of  $\text{Ca}^{2+}$  substituted by  $\text{Sr}^{2+}$ , 8Sr-HA and 50Sr-HA, respectively. The concentrations of the different HA solutions were determined after freeze-drying of one sample for each group.

### 2.2 Physicochemical and morphological characterization of hydroxyapatite particles

Powder X-ray diffraction (XRD) patterns were collected on a PANalytical X'pert PRO MPD diffractometer in Bragg-Brentano  $\theta$ - $\theta$  geometry equipped with a secondary monochromator and X'Celerator multi-strip detector. The  $\text{Cu-K}\alpha$  radiation was generated at 45 kV and 40 mA ( $\lambda = 0.15418$  nm). Each measurement was made within an angular range of  $2\theta = 8$ - $80^\circ$ . The samples were put on Zero Background sample holder made of obliquely cut silicon crystal.

Infrared spectroscopy (FTIR) was performed by using a BRUKER Equinox 55 (Bruker GmbH, Germany) with a spectral resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Samples were prepared by mixing 2 mg of ground sample with 100 mg of anhydrous KBr. Sample spectra were recorded immediately after the background acquisition. Automated spectra acquisition was controlled by a small macro-written in the OPUS Macro Language Software of the spectrometer.

The particle sizes and their morphology were examined by Transmission Electron Microscopy (TEM) (HITACHI H7650). Dried samples were dispersed on lacy carbon Cu grids by contact with

the grids and subsequent gentle shaking. The particle sizes of the hydroxyapatite aqueous solutions were also analysed by dynamic light scattering (DLS) with the Malvern Zetasizer equipment. For all HA samples, the particles were first suspended in a borate buffer 20 mM pH 8.5 and then subjected to size measurements.

Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) was applied to determine the content of calcium and strontium in the mineral phase of non-substituted HA (HA) and Sr-substituted hydroxyapatite (Sr-HA). Powders were preliminary dissolved in 5 mL of HCl 2–3 days before ICP analysis (ICP-OES 720-ES, Varian). The resulting solutions were analysed for Ca and Sr concentrations with ICP-OES instrument calibrated with standard solutions of known concentrations of these elements. Based on the measured concentrations, the absolute amount of each individual element within HA powders was calculated and expressed in  $\mu\text{g}$  of element / mg of powder.

### *2.3 Synthesis of the macroporous HA-matrices and Sr-HA-matrices and characterization*

Polysaccharide-based matrices were synthesized using a blend of pullulan/dextran 75:25 (pullulan, MW 200,000, Hayashibara Inc.; dextran, MW 500,000, Sigma) prepared by dissolving 9 g of pullulan and 3 g of dextran into 40 mL of distilled water containing 14 g of NaCl [36, 37]. Macroporous scaffolds combined with hydroxyapatite particles (Matrix-HA) were produced as previously described [35]. Here, distilled water was replaced by the hydroxyapatite suspensions at a concentration of  $6.7 \pm 1.7$  g/mL, doped or not with strontium (HA, 8Sr-HA and 50Sr-HA) at three different ratios of dispersion (D1, D2 and D3). Our previous work was performed with non-doped HA dispersed at D1 leading to 14% (w/w) of HA amount [35]. Chemical cross-linking was carried out using trisodium trimetaphosphate. After incubation at 50 °C for 15 min, resulting scaffolds were cut into the desired shape (6 mm diameter, 1.5 mm thickness), soaked in PBS 0.1M pH 7, then washed extensively with a 0.025% NaCl solution. After freeze-drying, scaffolds were stored at room temperature until use. Matrices containing HA particles are named Matrix-HA (for non-doped HA), Matrix-8Sr-HA (8 % of Sr-substitution) and Matrix-50Sr-HA (50 % of Sr-substitution). The exact amount of mineral phase within the matrices produced with the three ratios of HA / polysaccharides, *i.e.* D1, D2 and D3, was calculated and reported in Table 1. To obtain these quantitative data, polysaccharide-based scaffolds (Matrix-HA and Matrix-Sr-HA) were degraded *in vitro* with a combination of pullulanase (from *Bacillus subtilis*, 44.4 U/mL; Sigma-Aldrich) and dextranase (from *Chaetomium erraticum*, 5.3 U/mL; Sigma-Aldrich) that do not degrade hydroxyapatite. The enzymatic solution was added to the scaffolds for 1 hour at 37°C. The hydroxyapatite that remained at the bottom of the tube was then rinsed in osmosed water and finally dried at 50°C in vacuum drying oven overnight. Finally, the weight was determined.

HA powder samples used for matrix production	Hydroxyapatite content in the matrix (%)		
	Dispersion 1 (D1) [35]	Dispersion 2 (D2)	Dispersion 3 (D3)
HA	14.2 +/- 2.76	30.5 +/- 3.21	65.6 +/- 1.42
8Sr-HA	13.1 +/- 1.47	32.8 +/- 0.96	62.5 +/- 2.36
50Sr-HA	14.8 +/- 2.53	28.9 +/- 2.28	61.4 +/- 1.15

Table 1: Hydroxyapatite (substituted or not with Sr) content in the different matrices produced at the three conditions of dispersion (D1, D2 and D3).

Hydrated scaffolds were observed using environmental scanning electron microscopy (ESEM) with a FEI QUANTA 200 at an accelerating voltage of 15 keV and at a pressure of 3.5 Torr.

Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) was applied to determine the content of strontium incorporated in the composite scaffolds with ICP-OES analysis instruments calibrated with standard solutions of known concentrations of the element. Matrices were preliminary dissolved in 0.5 mL HNO<sub>3</sub> and 0.5 mL HCl for 2–3 days before ICP analysis (ICP-OES 720-ES, Varian). Based on the measured concentrations, the amount of Sr per matrix was calculated and expressed in ng / Matrix.

#### 2.4 Cell behavior of human mesenchymal stem cells

Human mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated as previously described [38]. Briefly, human bone marrow was aspirated from the femoral diaphysis or iliac bone after obtaining consent from patients (40-70 year-old) undergoing hip prosthesis surgery after trauma. The human bone marrow was then sequentially filtered with syringes fitted with 16-, 18-, and 21-gauge needles. Culture medium was Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and cells were maintained in this basal medium for *in vitro* experiments with the different scaffolds.

Disks (6 mm diameter x 1.5mm thickness) of matrices were seeded with a density of  $2.5 \times 10^5$  MSCs per scaffold (Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA, Matrix-50Sr-HA) in DMEM containing 10% (v/v) FCS without osteogenic additives. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere for 3 and 7 days. The culture medium was replenished every 2 days. The viability of cells cultured within the scaffolds was evaluated at day 3 and day 7 of culture using a L3224 LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity kit according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). The 3D cultured cells were stained with calcein AM and ethidium homodimer-1. Membrane-permeant calcein AM is cleaved by esterase in live cells to yield cytoplasmic green fluorescence and membrane-impermeant ethidium homodimer-1 labels membrane-compromised cells with red fluorescence. Images were recorded with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### 2.5 RNA isolation and relative gene expression by quantitative real time PCR analysis

Cells were seeded with a density of  $2.5 \times 10^5$  MSCs per scaffold (Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA, Matrix-50Sr-HA), produced at the dispersion D2 of hydroxyapatite. Total RNA was extracted

from cells after 1, 3 and 7 days of culture, using the Nucleospin® RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Briefly, scaffolds were rinsed with PBS 0.1 M pH 7, dried and frozen at -80°C for 5 hours before RNA extraction according to the manufacturer instructions. 500 ng of RNA were used as template for single-strand cDNA synthesis with the Maxima system (Thermo Fisher Scientific, USA) in a 20 µl final volume. Quantitative PCR (QPCR) amplification was performed using the TAKYON (2´ iQ 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM each dNTP, 25 U/mL iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I and 10 nM fluorescein, stabilized in sterile distilled water). Primers of the ubiquitary ribosomal protein P0 (forward 5'- CCT CGT GGA AAG TGA CAT CGT -3', reverse 5'- ATC TGC TTG GAG CCC ACA TT - 3'), Runx2 (forward 5'- TCA CCT TGA CCA TAA CCG TCT-3', reverse 5'- CGG GAC ACC TAC TCT CAT ACT-3'), osteopontin (OPN) (forward 5'- GCC GAG GTG ATA GTG TGG TT - 3', reverse 5'- AAC GGG GAT GGC CTT GTA TG - 3') were used at a final concentration of 200 nM. Data were analyzed using iCycler IQ software and compared by the  $\Delta\Delta CT$  method. Q-PCR was performed in duplicate for PCR validation. Data were normalized to P0 expression for each condition. Runx2 and OPN gene expression are expressed in relative expression compared to day 1 for each condition and also compare to Matrix-HA for each time of culture.

#### *2.6 Implantation of the HA-matrices and Sr-HA- matrices subcutaneously in mice*

Scaffolds (6 mm diameter, 1.5 mm thickness) of i) Matrix-HA containing different ratios of HA (D1, D2 and D3) or ii) Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA, Matrix-50Sr-HA produced at dispersion D2, were inserted into subcutaneous pockets in the dorsum of 12-week-old Balb/c mice weighing 25-30 g. Six samples per group and condition were implanted. Six samples of each group were analyzed by micro-CT, histology and immunostaining of CD31 after 2 and 4 weeks of implantation.

#### *2.7 Micro-computed tomography (Micro-CT)*

Samples harvested after 2 and 4 weeks, were fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde, and were treated by micro-CT before histological analysis. The X-ray microtomographic devices used in this study is a Quantum FX Caliper (Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA). The X-ray source was set at 90 V and 160 µA. Sample up to a Field of View of 10 mm diameter and were imaged with a 3D isotropic voxel size of 20 µm. Full 3D high-resolution raw data are obtained by rotating both the X-ray source and the flat panel detector 360° around the sample, with a rotation step of 0.1° (scanning time: 3 min). The corresponding 3,600 image projections were then automatically reconstructed (RigakuSW software, Caliper) into a Dicom stack of 512 files using standard back-projection techniques. The three-dimensional (3D) images of samples were built by stacking 512 cross sections obtained by X-ray microtomography. The resulting 3D files were composed of grey-level images where lowest grey/dark pixels represented empty spaces and highest grey/bright pixels stood for the densest materials. Three-dimensional analyses were performed using eXploreMicroView® software (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). After reconstruction of the region of interest, mineralized

volume (MV) and total volume (TV) volume were measured for each group. Six samples were evaluated for each condition at each time point. Results were expressed as average  $\pm$  standard deviation.

### 2.8 *Histological evaluation*

At 2 and 4 weeks post-implantation, samples were retrieved and fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, then decalcified with Microdec (MM France) during 1 hour under stirring, dehydrated and paraffin-embedded. Transversal sections (7-9  $\mu$ m thickness) were prepared and treated with Masson Trichrome for mineralized bone and osteoid staining. The sections were analyzed with an Eclipse 80i light microscope (Nikon, Japan). Pictures were captured with a Nanozoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics France) using objective UPS APO 20X NA 0.75 combined to an additional lens 1.75X, leading to a final magnification of 35X. Virtual slides were acquired with a TDI-3CCD camera. Images were analysed using the Nikon software. The whole surface as well as the newly bone surface were quantitated in mm<sup>2</sup> using the Polygon and Auto Detect functions. Stained slides from two samples per condition were processed for histological analysis, and three sections were fully imaged and analysed per sample and per condition. Results are shown as means with standard deviation per condition, with time of implantation (weeks 2 and 4).

### 2.9 *Immunolabelling of CD31*

At 2 and 4 weeks post-implantation, samples were retrieved and fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, then decalcified with Microdec (MM France) during 1 hour under stirring. Then the samples were dehydrated and embedded in paraffin. Sections (10  $\mu$ m in thickness) were deparaffinized using toluene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100-50 %) and finally washed in distilled water. Antigen recovery was performed with proteinase K, diluted at 1/20 within TE buffer (50 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 37C for 25 min. Then, endogenous peroxidase was quenched in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in PBS, for 5 min. After washing with PBS 0.1 M pH7.4, slides were blocked using 2% (w/v) BSA serum in PBS 0.1M pH7.4 for 30 min. For CD31 immunolabeling, incubation was performed overnight with a rabbit polyclonal anti-mice CD31 antibody (dilution 1:100; #100-2284; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) at 4° C. After two washes with PBS 0.1M pH7.4, the slides were incubated with according to the manufacturer's instruction (Anti-rabbit ABC kit; Vector Labs, Burlingame, CA, USA), and then revealed using Impact DAB solution (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Staining was stopped in distilled water, samples were then counterstained in Mayer's hematoxylin and washed in running tap water for 10 min. Finally, samples were dehydrated and mounted using Pertex. The number of vessels within the tissue was quantified using NDP view software. The whole surface and the number of vessels were quantified in mm<sup>2</sup>. Stained slides from two samples per condition were processed for immunostaining analysis, and three sections were fully imaged and analysed per sample and per condition. Results are shown as average with standard deviation per condition, with time of implantation (weeks 2 and 4).

### 2.10 Statistical analysis

All data were expressed as average  $\pm$  standard deviation (SD). They were analyzed using the t-test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*). The symbol \*\* indicates a significant difference with  $p < 0.01$ ; \*\*\* a significant difference with  $p < 0.001$ ; ns: non-significant difference.

## 3. Results

### 3.1 Physicochemical characterization of HA particles

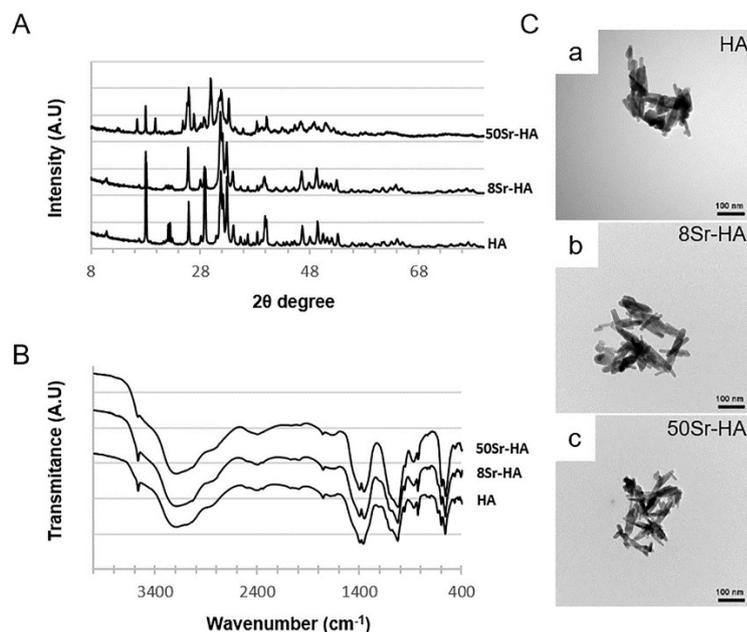
The X-ray diffraction (XRD) patterns of the powders, precipitated under different experimental conditions, *i.e.* non-substituted HA (HA), Sr-substitution at 8 % (8Sr-HA) and at 50 % (50Sr-HA) are shown in Figure 1A. The major diffraction peaks identified for HA are in agreement with the standard JCPDS reference #896438 as a carbonated hydroxyapatite. Major sharp and intense peaks are observed at  $2\theta$  values of  $25.9^\circ$ ,  $31.9^\circ$ ,  $32.5^\circ$  and  $32.9^\circ$ . XRD diagrams of the 8Sr-HA powders revealed a similar pattern than those of HA reported in the literature [14, 17], suggesting that 8 % of Sr-substitution (8Sr-HA) did not alter, neither the phase composition, nor the crystallinity of the hydroxyapatite. As the Sr-substitution increased to 50 % (50Sr-HA), the peak positions were shifted to slightly lower  $2\theta$  values and showed significant broadening.

Representative FTIR spectra in the range of  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  for the synthesized HA and Sr-HA are shown in Figure 1B. Peaks assignments of the three HA powders (HA, 8Sr-HA, 50Sr-HA) and two HA references were reported in Table 2. FTIR analysis displayed specific vibrations for bands present in hydroxyapatite crystals. The major functional groups including hydroxyl, phosphate and carbonate were indicated in Table 2. For HA spectra, the ion stretching vibration around  $3500-3600 \text{ cm}^{-1}$  confirms the presence of a hydroxyl group. Absorption bands characteristic of P-O stretching vibrations are observed at  $1029, 962 \text{ cm}^{-1}$ , while O-P-O bending vibrations can be seen at  $563, \text{ and } 602 \text{ cm}^{-1}$ . Furthermore, peaks associated with carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) were observed at  $1364, 1397 \text{ cm}^{-1}$  and  $870 \text{ cm}^{-1}$ . FTIR spectra of 8Sr-HA powders show a similar structure and peak intensity than the HA samples. The corresponding  $\text{PO}_4^{3-}$  peaks for 50Sr-HA shifted to slightly lower wavenumbers ( $559, 598 \text{ cm}^{-1}$ ) compared to HA powders ( $563, 602 \text{ cm}^{-1}$ ) or to 8Sr-HA powders ( $562, 601 \text{ cm}^{-1}$ ).

Samples	Peak assignment					
	Adsorbed H <sub>2</sub> O	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> groups (v3)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v3)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v1)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> group	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (v4)
Carbonated HA described [17]	2750-3750	1420, 1455	1030, 1090	961	873	604, 600
HA described in [14]	3568	1420	1033	960	868	570, 601
HA	3570	1364, 1397	1029	962	870	563, 602
8Sr-HA	3574	1355, 1401	1027	961	873	562, 601
50Sr-HA	3575	1357, 1401	1023	956	872	559, 598

Table 2: Peak assignments for the different HA powders. Summary of vibrational frequencies observed by FTIR for standard carbonated HA as described by Cox *et al* [17], for non-substituted HA produced by wet precipitation according to Catros *et al* [14], or measured for non-substituted HA, 8Sr-HA and 50Sr-HA synthesized in this work.

The structural morphology of the HA particles for all groups was investigated by TEM (Figure 1C). Morphological analyses display aggregates of hydroxyapatite composed of elementary particles of 50-100 nm rod-like crystals. As observed in Figure 1C, Sr-substitution (8Sr-HA and 50Sr-HA) did not alter the shape and the sizes of these particles as well as the formation of micrometric aggregates of these particles.



**Figure 1: Structural characterization of the synthesized samples of hydroxyapatite**

(A) XRD patterns of non-substituted HA samples (HA); HA powders with 8 % of Sr-substitution (8Sr-HA); HA powders with 50 % of Sr-substitution (50Sr-HA). (B) FTIR spectra of non-substituted HA samples (HA); HA powders with 8 % of Sr-substitution (8Sr-HA); HA powders with 50 % of Sr-substitution (50Sr-HA). (C) Representative images of HA powders (a: HA, b: 8Sr-HA, c: 50Sr-HA) by Transmission Electron Microscopy (TEM). Scale bars = 100nm.

Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the size of the HA samples for all conditions (Table 3). The agglomerated structures of the produced powders impeded the precise measurements of the size and the distribution of the nanoparticles and only confirmed the presence of HA micrometric agglomerates with an average size of  $3.2 \pm 0.62 \mu\text{m}$  to  $4.3 \pm 0.85 \mu\text{m}$ , without significant differences between the three groups of HA suspensions (HA; 8SrHA and 50Sr-HA) (Table 3).

HA powder samples	Average diameter of HA aggregates ( $\mu\text{m}$ )
HA	$3.26 \pm 0.62$
8Sr-HA	$4.15 \pm 0.83$
50Sr-HA	$4.35 \pm 0.85$

Table 3: Average agglomerate sizes of HA particles as determined by Dynamic Light Scattering (DLS). Values shown (in  $\mu\text{m}$ ) represent the average  $\pm$  SD of  $n = 3$  samples for each condition.

The amount of Ca and Sr in HA, 8Sr-HA and 50Sr-HA powders was measured by ICP-OES. With increasing Sr-substitution in the hydroxyapatite (8% and 50% of substitution), Table 4 showed an increasing amount of Sr in the HA samples from  $2 \pm 1 \mu\text{g} / \text{mg}$  of powder (8Sr-HA) to  $9.7 \pm 3.8 \mu\text{g} / \text{mg}$  of powder (50Sr-HA), and a decreasing content of calcium from  $13 \pm 8.5 \mu\text{g} / \text{mg}$  of powder (HA),  $10 \pm 4.7 \mu\text{g} / \text{mg}$  of powder (8Sr-HA) in  $5 \pm 2.7 \mu\text{g} / \text{mg}$  of powder (50Sr-HA).

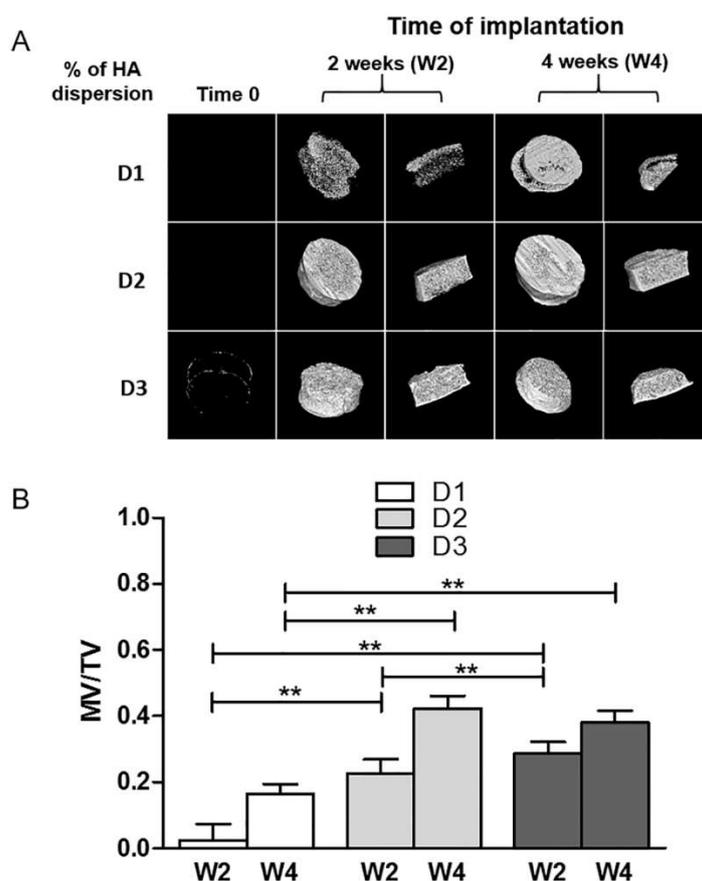
HA powder samples	Element	Concentration ( $\mu\text{g}$ of element / mg of HA powder)
HA	Ca	$13 \pm 8.5$
	Sr	Non detected
8Sr-HA	Ca	$10.7 \pm 4.7$
	Sr	$2 \pm 1$
50Sr-HA	Ca	$5 \pm 2.7$
	Sr	$9.7 \pm 4.8$

Table 4: Ca and Sr contents for the HA samples measured by ICP-OES. Powders were preliminary dissolved in 0.5 mL  $\text{HNO}_3$  and 0.5 mL  $\text{HCl}$  for 2–3 days before ICP analysis. The resulting solutions were analysed with respect to Ca and Sr concentration with ICP-OES analysis instruments (ICP-OES 720-ES, Varian) calibrated with standard solutions of known concentrations of the elements. Based on the measured concentrations, the concentration of each individual element per suspension was calculated ( $n=3$ ). Data are expressed in  $\mu\text{g}$  of element / mg of powder (average  $\pm$  SD).

### *3.2 Effect of the amount of HA dispersed in the 3D matrices on ectopic bone mineralization*

Polysaccharide-based matrices (6 mm diameter, 1.5 mm thickness) were first prepared using non-substituted HA particles dispersed in the aqueous polymer solutions at different ratios, D1, D2 and D3, to optimize the amount of the mineral phase in the composite matrix. As reported in Table 1, the dispersion D1, D2 and D3 provide around 14 %, 30 % and 61 % (w/w) of the mineral phase within the matrix, respectively. These three formulations of Matrix-HA were implanted subcutaneously in mice, and explants were analysed after 2 and 4 weeks of implantation by micro-CT. Composite matrices were also imaged before implantation (Time 0). The results in Figure 2A showed that both D1 and D2 of matrix-HA formulations exhibited radiolucent property before implantation (Time 0). Only few spots of mineralized tissue were observed in Matrix-HA supplemented with around 61 % of HA (D3). Thereafter, the tissue mineralization increases in all groups with time of implantation. Mineralized structures were observed mainly in the periphery of Matrix-HA produced with D1 ratio after 2 weeks of implantation, compared to those produced with D2 and D3 formulations, where mineralized structures were evidenced in the whole explants at week 2.

Quantitative analysis of these images confirmed these qualitative observations (Figure 2B). The mineralization values (ratio of mineralized volume over total volume - MV/TV) of Matrix-HA produced with 14 % (D1) and 30 % of HA (D2) increase over time. After 2 and 4 weeks of implantation, values for Matrix-HA samples produced with 30 % of HA (D2 formulation) were significantly higher than Matrix-HA produced with 14 % of HA (D1 formulation) ( $p < 0.01$ ). When evaluating MV/TV for the Matrix HA produced with around 61 % of HA (D3 formulation), there were no statistically significant differences between the two time points of implantation (2 and 4 weeks). There are no significant differences of MV/TV values between the Matrix-HA produced at D2 and a Matrix-HA produced at D3, after 4 weeks of implantation. We then selected the ratio of HA to polymer of 30 % (D2 dispersion) for the further synthesis of Matrix-HA doped with strontium.



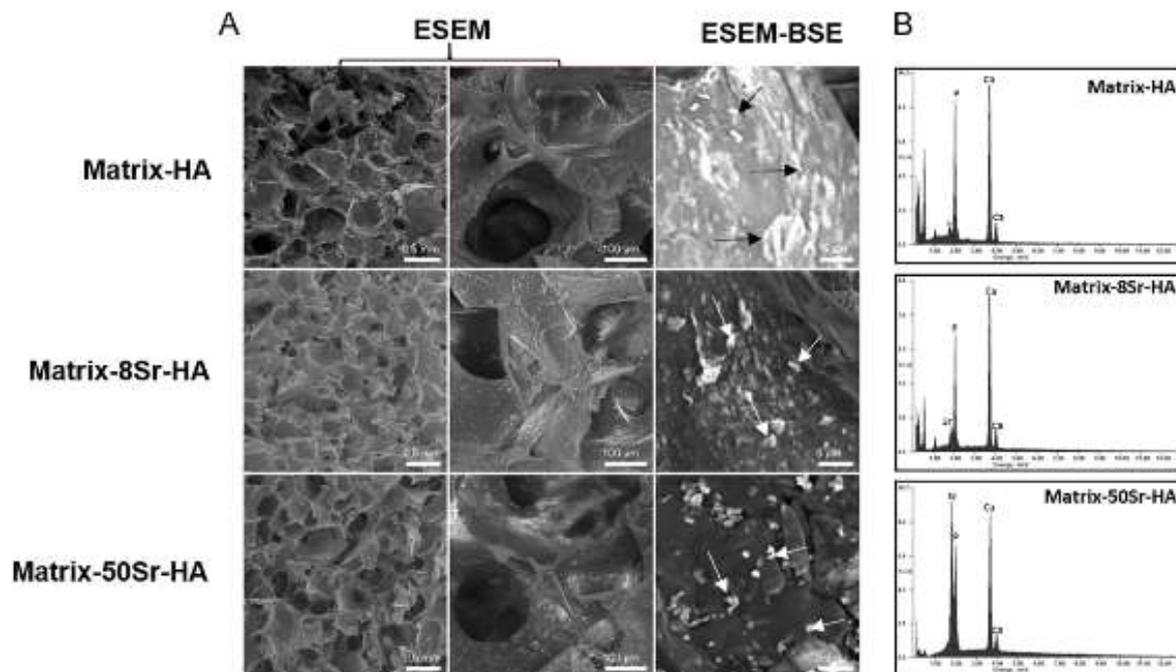
**Figure 2: Micro-CT analysis of Matrix HA containing different ratios of HA particles, implanted subcutaneously in mice.**

(A) Representative Micro-CT images of Matrix-HA supplemented with three different amounts of HA (dispersion 1 (D1), dispersion 2 (D2), and dispersion 3 (D3)), before implantation (Time 0), after 2 weeks (W2) and 4 weeks (W4) of subcutaneous implantation. (B) Quantification of the mineralized volume / total volume (MV/TV) after 2 weeks (W2) and 4 weeks (W4) of subcutaneous implantation. Six samples were evaluated for each condition at each time point (2 and 4 weeks). Results were expressed as average  $\pm$  SD. The symbol \*\* denotes  $p < 0.01$ .

### 3.3 Synthesis and physicochemical characterizations of the Matrix-HA supplemented with strontium

Three types of Matrix-HA were produced with three formulations of substituted HA powders at dispersion D2, *i.e.* non-substituted HA (named Matrix-HA), 8 % of Sr-substitution (named Matrix-8Sr-HA) and 50 % of Sr-substitution (named Matrix-50Sr-HA). ICP-OES used to determine the strontium and calcium content in matrices confirmed that the Sr content increased with Sr-substitution ( $34.9 \pm 2.9$  ng of Sr per Matrix-8Sr-HA; and  $198.8 \pm 4.4$  ng of Sr per Matrix-50Sr-HA). ESEM images of hydrated matrices (Figure 3A) showed similar macroporous structures whatever the composition, with a pore size from 10 to 400  $\mu\text{m}$ . ESEM-BSE (Figure 3A) revealed the presence of HA agglomerates dispersed within the 3D structure. EDX analyses performed at different locations of the composite scaffolds confirmed the presence of these particles and a homogenous distribution of HA particles within the polysaccharides, whatever the Sr-substitution. The EDX spectra of the Matrix-HA and Matrix-

Sr-HA samples (Figure 3B) evidenced the presence of calcium and phosphorus. Strontium was detected in Matrix-8Sr-HA and peak was higher in Matrix-50Sr-HA. The average Ca/P and Ca+Sr/P ratios were calculated from three EDX measurements performed at different samples locations. The Ca/P ratio of the Matrix-HA samples was  $1.80 \pm 0.1$ . The ratio of Ca+Sr/P was  $2.18 \pm 0.20$  and  $2.90 \pm 0.70$  for Matrix-HA-8Sr-HA and Matrix-HA-50Sr-HA, respectively.

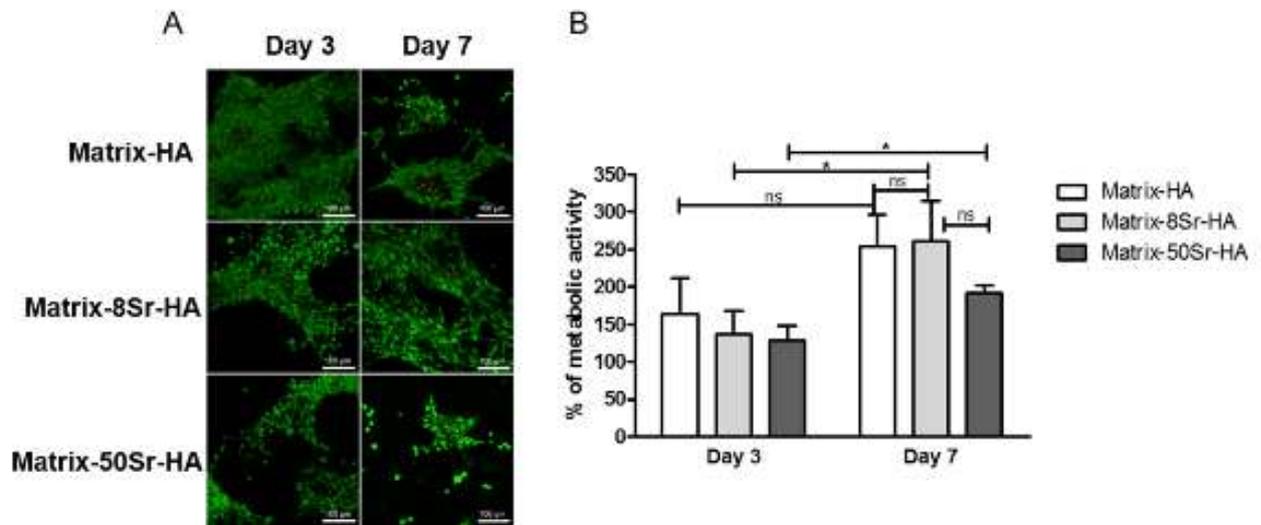


**Figure 3: Characterization of the Matrix-HA.**

(A) Environmental scanning electron microscopy (ESEM) and back scattering electron microscopy (ESEM-BSE) images showing the presence of the macroporous structure of the 3D matrices and the presence of numerous HA particles (indicated by white or black arrows). Sale bars = 0.5 mm and 100  $\mu$ m for ESEM; and 5  $\mu$ m for ESEM-BSE (B) Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) spectra of Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA, and Matrix-50Sr-HA.

### 3.4 Cytotoxicity evaluation of the Matrix-HA supplemented with strontium

After 3 and 7 days of culture, LIVE/DEAD<sup>®</sup> assay (Figure 4A) revealed that all matrices supplemented with HA particles doped or not with strontium had no obvious cytotoxicity to MSCs over time of culture, whatever the rate of Sr-substitution of HA. Alamar blue assay (Figure 4B) confirmed that cells cultured on these 3D scaffolds maintain their metabolic activity with time of culture. On the third day of culture, there were no statistical significant differences between metabolic activity of MSCs cultured on the various matrices. With increasing the culture duration (Day7), MSCs cultured on all scaffolds, with or without strontium, exhibited significant higher metabolic activity compared to day 3. At day 7, the metabolic activity of MSCs cultured in Matrix-HA and Matrix-Sr-HA was comparable. However, there is a significant difference of metabolic activity of MSCs cultured on Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA.



**Figure 4: Effect of the various Matrix-HA doped or not with strontium on MSCs viability.**

(A) LIVE/DEAD® assays after 3 and 7 days of culture of MSCs on the three different matrices (Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA). Scale bars = 50 μm. (B) Alamar Blue assay after 3 and 7 days of culture of MSCs on the three different matrices (Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA). Data were expressed in % of metabolic activity normalized to day 1 (100%) for each condition (average ± SD). The symbol \* denotes  $p < 0.05$  and ns, “non-significant”.

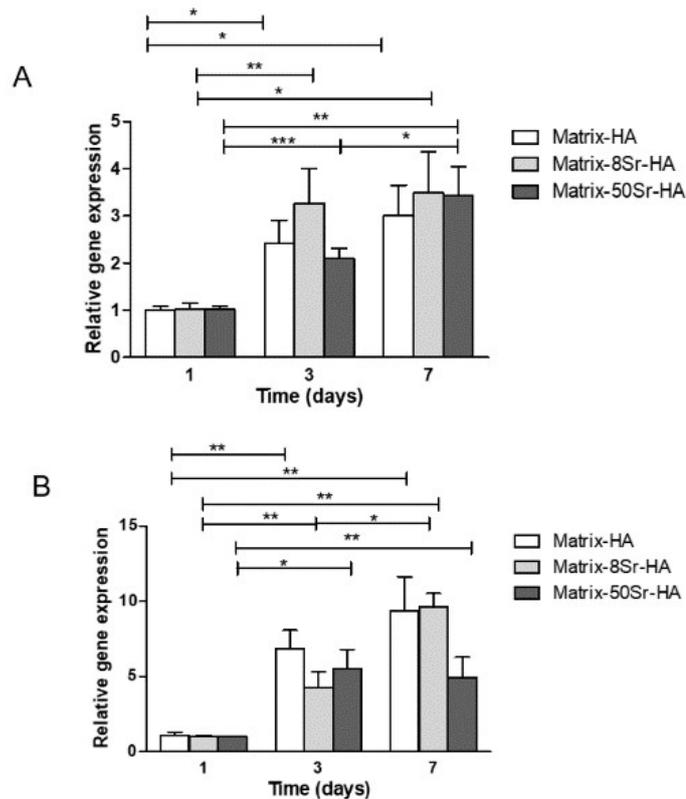
### 3.5 MSCs differentiation on the Matrix-HA supplemented with strontium.

The expression levels of osteogenesis related genes including Runx2 as early gene (Figure 5A and Table 5), and osteopontin (OPN) as a late osteoblastic gene (Figure 5B and Table 5) were examined by qPCR after culturing in presence of the different matrices without osteogenic additives.

Relative expression of OPN was expressed firstly with time of implantation (Figure 5) for each type of scaffolds and data were normalized to Day 1 for each matrix. OPN and Runx2 gene expression were set “1.0” at Day 1 for the three scaffolds. Figure 5A and 5B revealed that the presence of Sr within the matrices did not affect the expression of Runx2 and OPN over time of the 3D cell culture, whatever the level of Sr-substitution. The relative expression of Runx2 in MSC cultured on the three scaffolds, increases significantly from D1 to D7 (Figure 5A). For cells cultured into Matrix-HA and Matrix-8Sr-HA samples, the expression of OPN increases significantly from Day 1 to Day 7 (Figure 5B). For the Matrix-50Sr-HA group, the expression of OPN in MSCs reached a plateau at Day 3 (Figure 5B). At Day 7, the relative expression of OPN, normalized to Day 1, did not change compared to Day 3 (Figure 5B).

In Table 5, the relative expression of OPN was normalized for each time point (Day 3 and Day 7) to Matrix-HA deprived of strontium. We have evaluated here the effect of strontium (Sr) contained in the composite matrix on the expression of Runx2 and OPN at each time-point of culture of hMSCs.

This Table indicates that the presence of strontium within the matrix, i.e Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA does not modify Runx2 expression, whatever the time of culture (3 or 7 days) , but significantly stimulates the expression of OPN only after 3 days of culture, compared to the composite matrix deprived of Sr (Matrix-HA) at the same time (Day 3). However, this is a transient effect. Strontium has a short-term effect on OPN gene expression, and this effect was not maintained after 7 days of culture.



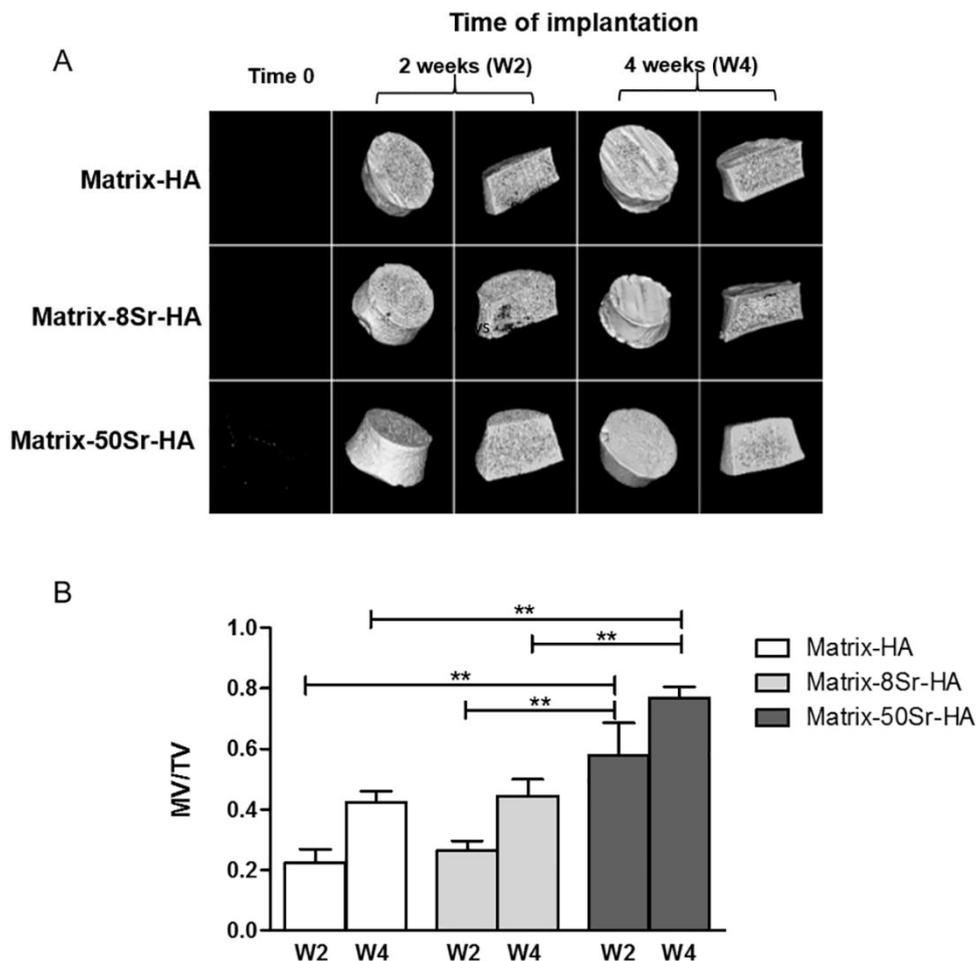
**Figure 5: mRNA expression of early and late osteoblastic gene in MSCs cultured on the three different matrices**

Runx 2 (A) and OPN (B) expression were quantified by qPCR after 1, 3 and 7 days of hMSCs cultured on Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA. Three separate experiments were performed and each assay was done in duplicate. Data were expressed in relative expression normalized to P0 expression, compared to day 1. Runx2 (A) and OPN (B) gene expression were set as “1.0” at Day 1 for the three scaffolds. Results were expressed as average  $\pm$  SD. The symbol \* denotes  $p < 0.05$ ; \*\* denotes  $p < 0.01$  and \*\*\* indicates a significant difference with  $p < 0.001$ .

		<b>Runx2</b>	<b>OPN</b>
		QR average $\pm$ SD	QR average $\pm$ SD
<b>Day 3</b>	<b>Matrix-HA</b>	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
	<b>Matrix-8Sr-HA</b>	1.0 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 2.2 *
	<b>Matrix-50Sr-HA</b>	1.3 $\pm$ 0.2 *	4.1 $\pm$ 1.4 **
<b>Day 7</b>	<b>Matrix-HA</b>	1.0 $\pm$ 0	1.0 $\pm$ 0
	<b>Matrix-8Sr-HA</b>	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.5
	<b>Matrix-50Sr-HA</b>	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3

Table 5: mRNA expression of Runx2 and osteopontin (OPN) gene in MSCs cultured on the three different matrices. Runx 2 and OPN expression were quantified by qPCR after 3 and 7 days of MSCs cultured on Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA. Three separate experiments were performed and each assay was done in duplicate. Data were expressed in relative expression normalized to P0 expression, compared to Matrix-HA for each time. Gene expression were set as “1.0” for each day (Day 3 and Day 7) for Matrix-HA. Results were expressed as average  $\pm$  SD. The symbol \* denotes  $p < 0.05$  and \*\* denotes  $p < 0.01$ .

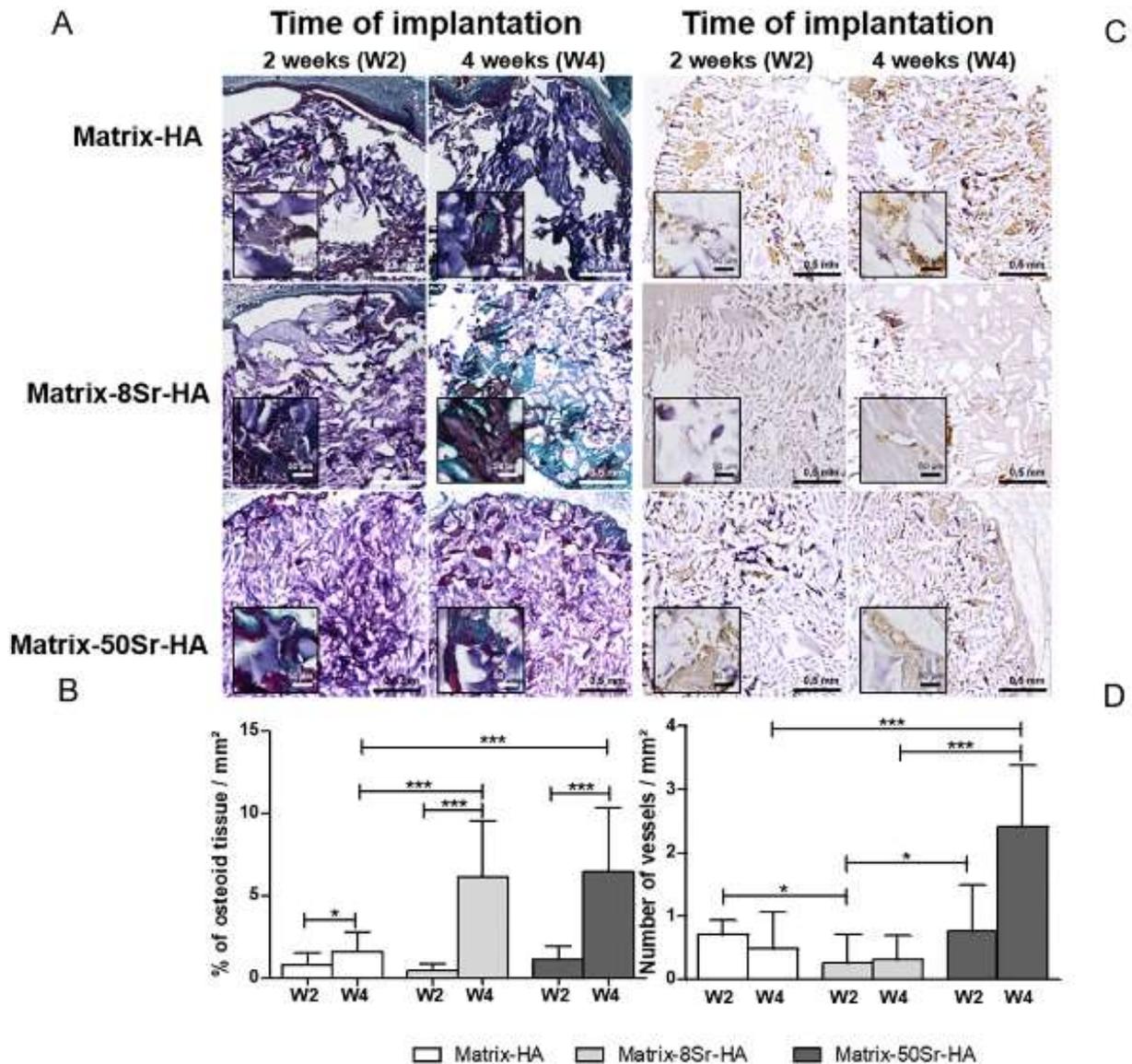
**3.6 In vivo evaluation of the Matrix-HA supplemented with strontium implanted in ectopic site**  
Tissue formed after 2 and 4 weeks of subcutaneous implantation in mice of Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA, was analysed by micro-CT (Figure 6), histology (Figure 7A, 7B) and by immunostaining of CD31 for the blood vessel staining (Figure 7C; 7D). As shown in Figure 6A, micro-CT images showed that all the tested matrices exhibited radiolucent properties before implantation (Time 0) and that mineralized tissues were observed from two weeks of implantation for the three groups of matrices. Quantitative analysis of micro-CT (Figure 6B) revealed an increase of MV/TV over time of implantation with all matrices. However, the amount of mineralized tissues in the Matrix-50Sr-HA samples was significantly higher than those of the Matrix-HA and Matrix-8Sr-HA samples, for both time points (2 and 4 weeks).



**Figure 6: *In vivo* evaluation of the Matrix-HA supplemented with strontium implanted subcutaneously in mice**

(A) Representative micro-CT images of Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA, before the implantation (Time 0), and after 2 (W2), and 4 weeks (W4) of subcutaneous implantation. (B) Quantification of the mineralized volume / total volume (MV/TV) after 2 weeks (W2) and 4 weeks (W4) of subcutaneous implantation. Six samples were evaluated for each condition at each time points 2 weeks and 4 weeks (W2, W4). Results were expressed as average  $\pm$  SD. The symbol \*\* denotes  $p < 0.01$ .

The Trichrome Masson's staining of the newly formed tissue (Figure 7A) and the quantification of the osteoid tissues (Figure 7B) confirmed that the supplementation of strontium in the matrices, whatever the dose, has stimulated the osteoid tissue formation after 4 weeks of implantation. The formation of vessels was also analyzed by CD31 immunostaining (Figure 7C). only few vessels were observed in the Matrix-HA and Matrix-8Sr-HA groups in comparison to Matrix-50Sr-HA explants, mainly after 4 weeks of implantations (Figure 7D), suggesting a positive effect of strontium on angiogenesis.



**Figure 7: Histological and immunochemistry analysis of the newly formed tissue within the Matrix-HA supplemented with strontium, implanted subcutaneously in mice**

(A) Masson's Trichrome staining of the newly tissue formed within the three matrices after 2 and 4 weeks of subcutaneous implantation. (B) Quantitative analysis: images were analysed using the Nikon software. The whole surface as well as the newly bone surface were quantified in mm<sup>2</sup>. Stained slides from 2 samples per condition were processed for histological analysis, 3 sections were fully imaged and analysed per sample and per condition. Results were expressed as average  $\pm$  SD per group of matrix, with time of implantation (2 and 4 weeks: W2, W4). The symbols \*, \*\*, and \*\*\* denote  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ , respectively. (C) CD31 immunostaining of the newly formed tissue within the three matrices, Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA. (D) Quantification of the number of vessels within the tissue was performed by using NDP view software. The whole surface as well as the number of vessels were quantitated in mm<sup>2</sup>. Stained slides from 2 samples per condition were processed for immunostaining analysis, and 3 sections were fully imaged and analysed per sample and per group of matrix. Results were expressed as average  $\pm$  SD per group of matrix, with time of implantation (2 and 4 weeks: W2, W4). The symbols \*, \*\*, and \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ , respectively.

#### 4. Discussion

Our previous studies demonstrate the ability of polysaccharide-based matrices supplemented with 14 % of HA particles (here, corresponding to D1 as ratio of HA particles) to promote mineralization and osteoid tissue formation, in two different ectopic sites (subcutaneous and intramuscular), and in two different experimental models, in mice and goat [35]. Here in this work, we have generated new formulations of polysaccharide-based matrix. Thus, we have optimized the ratio of HA particles within the matrix and compare the efficacy of three ratios of dispersion of HA particles. An increase of HA particles to 30 % in the matrices (D2 formulation) improved their bioactive properties. The *in vivo* data also showed that partial substitution of Sr for Ca in hydroxyapatite enhanced tissue mineralization, osteoid and new blood vessel formation. We discriminate here an optimal composition of the Sr-doped Matrix-HA for promoting bone formation and vascularization in a non-osseous site.

In this study, two different Sr-substituted hydroxyapatite powders (8Sr-HA and 50Sr-HA) were produced and compared for their structure and composition with non-doped HA. XRD and FTIR analysis of HA powder confirmed the presence of a carbonated hydroxyapatite. As described in the literature, the composition of the HA powder changes with strontium incorporation and the physical properties may be affected as a result [17, 34]. In this study, a change in composition was confirmed by ICP-OES with an increase of strontium content and decrease of calcium. The XRD results did not show a corresponding change in the crystallinity of 8Sr-HA. However, slight deviations in XRD peaks with 50Sr-HA, with significant broadening may indicate a change of crystal structure as described by others [39]. On the other hand, the corresponding FTIR spectra highlighted that, as the Sr content of these powders increased, there was significant peak broadening for the  $\text{PO}_4^{3-}$  peaks, as well as a shift to slightly lower wavenumbers which is indicative of Sr incorporation in the HA lattice [28]. Both the Sr-substituted materials are also becoming more dehydroxylated with increasing Sr content with, the OH- band in the 50Sr-HA FTIR spectra around  $3575\text{ cm}^{-1}$ , becoming much less prominent compared to HA FTIR spectra. Sr-substitution for Ca in the HA lattice also results in an increase in both  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  due to the increased lattice strain caused by the Sr larger ions [40].

The structural morphology of the three HA powders analysed by TEM and DLS gave the direct information about the shape and size of the synthesized samples. Both methods showed the formation of non-uniform large aggregates of nanometer rod-like crystals without any significant differences in shape or sizes of these agglomerates with Sr-substitution. The levels of Sr-substitution in our study did not influence the particle morphology, as previously described [34]. The presence of nano-sized particles (less than 100 nm) was undetectable by DLS, whatever the conditions of treatment of these HA suspensions even after the sonication. Aggregates of HA particles were maintained, once dispersed in the polysaccharide matrices as showed by ESEM and ESEM-BSE analysis. Aggregates were homogeneously dispersed in the whole matrices as demonstrated by EDX analysis. It can be hypothesized that the dispersed particles can act as nucleation sites for the mineralization at the particle interface, which, in turn, leads to enhancement of the bioactive properties of the composite scaffolds

Herein, polysaccharide-based composite scaffolds were produced with increasing amount of HA. In this work, three concentrations of micro-sized hydroxyapatite aggregates were used to produce these biocomposites. Our previous work was performed using Matrix-HA supplemented with 14 % of HA. Here, we improved significantly the ability of the scaffold to promote tissue mineralization by doubling the amount of HA (30 %) in the formulation. Interestingly, no significant effect on tissue mineralization evidenced by micro-CT was observed by an additional increase of HA at 61 %. Higher content of HA particles could result in more HA aggregation and a less uniform distribution of these agglomerates with a loss of bioactivity. These data are in accordance with the literature. Boissard *et al* also showed that at higher filler contents the HA particles aggregate may hinder the mobility of the polymer matrix [41]. The same authors demonstrate that the micro-CT scans of scaffolds showed that scaffold pore size and porosity decreased with an increase in HA content. Consequently, several physical parameters are affected by an increase of HA that could affect with the implantation time the overall matrix properties such as in-and-out diffusion coefficients, degradation rates, cellular infiltration and differentiation.

In addition, the Matrix-HA with the higher HA content (61 %) started to be radiopaque as showed in Figure 2A. Indeed, from a clinical point of view, the radiological follow-up of the samples implanted can be used to observe from the beginning of the surgery the extent of mineralization inside a grafted site with time, as a good indicator of the success of the bone graft.

The second step of our study was to incorporate strontium into the biocomposites. Bone typically contains 70 % inorganic calcium phosphate and different trace elements, such as strontium, a non-essential element, which is about 0.035 % of its calcium content in the skeleton system. The importance of this element in natural bone health and ingrowth is well documented and the effect of a wide range of concentrations of Sr on both *in vitro* and *in vivo* bone formation and mineralization was largely investigated. It could also exert a positive effect on endothelial cells and angiogenesis process. Since Sr acts as a dual agent on bone formation and resorption, the optimal content of Sr remains the subject of investigation. As described in the literature, the levels of Sr-substitution in HA or in other ceramics vary from 1 % to 100 % [34]. A complex dose-dependent effect of this element was found according to the mode of HA synthesis and/or to the nature of the polymer in which it was incorporated (PLA, PLGA, collagen, or chitosan). Herein, different formulations of Matrix-HA containing 30% of Sr-HA substituted at two different ratios (8 and 50 %) were designed (Matrix-HA, Matrix-8Sr-HA and Matrix-50-Sr-HA). As expected, the Sr content within the Matrix-Sr-HA, measured by ICP-OES, was increased with increasing Sr-substitution in HA from  $34.9 \pm 2.9$  ng to  $198.8 \pm 4.4$  ng per matrix (6 mm diameter, 3 mm thickness). EDX spectra of the three matrices revealed an increase of Ca+Sr/P ratio with increasing Sr-substitution suggesting that, more Sr incorporation in HA might lead to crystal change.

In addition, as described in the literature, high concentration of strontium also could be toxic for cells [42]. However, our *in vitro* studies did not reveal any cytotoxicity of the three

matrices, including for Matrix-50-Sr-HA. We were also able to demonstrate that all matrices sustained cell proliferation of MSCs up to 7 days in culture.

Extensive literature has confirmed that Sr-containing materials can stimulate the differentiation of MSCs or other osteoblastic cell lines [29, 43]. Here, we also showed that Sr-HA doped-matrices allowed the differentiation of MSCs to the osteoblastic lineage toward the expression of specific genes (Runx2 and OPN). However, the comparison of relative expression of these genes between the Matrix-HA and the Matrix-Sr-HA group at each time point (Day 3 and Day 7) (Table 5), revealed only a significant effect of strontium at day 3, not maintained at day 7 of culture, especially for OPN expression, remarkably increased at day 3. The quantification of the corresponding protein by ELISA should allow to us confirm the role of Sr on osteoblast differentiation.

The osteoconductive properties of different Sr-doped biocomposites have been investigated in numerous bone defects [44-47]. It has been reported that the implantation of Sr-containing HA materials promotes bone repair in both normal [33] and ovariectomized animals [23, 48], which evidence the role of strontium to enhance bone fracture healing. However, none of these works showed that Sr-containing composites give rise to inductive bone formation in ectopic sites. Recently, Luo *et al.*[49] demonstrated that after heterotopic implantation with the combination of rhBMP-2, bone formation on strontium-containing apatite/poly lactide strontium containing composites was enhanced. The results of this study further address the possible synergic effects of rhBMP-2 and strontium influence in bone formation. Here, our objective was to study the effect of matrices containing Sr (Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA), deprived of osteoinductive factors, on ectopic bone tissue mineralization after 2 and 4 weeks. The nature of the tissue was analyzed by micro-CT, by histology for the osteoid tissue staining and immunohistochemistry for the quantification of the newly formed blood vessels. Micro-CT showed that matrices supplemented with 50Sr-HA particles were capable of influencing the *in vivo* mineralization process as early as 15 days after subcutaneous implantation in mice. A higher stimulation of tissue mineralization was obtained after 4 weeks with these matrices, where the number of blood vessels in the newly formed tissue also appeared to be higher. Quantification of osteoid formation confirmed that both Sr-doped matrices (Matrix-8Sr-HA and Matrix-50Sr-HA) significantly increased osteoid formation after 4 weeks, compared to non-doped matrix. The overall tissue bone formation was modest, which might be attributed to the short time for bone formation (4 weeks). Furthermore, the Matrix-8Sr-HA did not stimulate blood invasion at the same time point (4 weeks), while it increased osteoid formation. This could be explained by a difference of diffusion of nutrients in materials containing higher amount of Sr that favors blood invasion and angiogenesis. Indeed, it has been reported that materials containing Sr exhibited higher nutrient distribution and permeability than the materials deprived of Sr [46].

Tissue mineralization and osteoid formation may also be controlled by other biological events than vascularization. The release of inorganic ions may also help the formation of a biological carbonated apatite layer that may also control stem cell differentiation. We thus suggested that these strontium-releasing composites provide a local ion-rich (*i.e.*, Sr<sup>2+</sup> as well as Ca<sup>2+</sup> and

PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) environment that favors osteogenic differentiation and *in vivo* bone formation. The strontium release with degradation of these composite materials is now under progress to elucidate the mechanism involved.

## 5. Conclusion

The results of this study show that optimal substitution levels of Sr and apatite content in this 3D polysaccharide matrix provide a suitable microenvironment for allowing osteogenic differentiation of human MSCs *in vitro*. The supplementation of Sr in these matrices leads to enhanced tissue mineralization and bone formation in a mice ectopic model. The development of these biodegradable osteoinductive matrices seems promising for use in bone regeneration. Further preclinical studies are now needed to demonstrate the safety and efficacy of these composite materials in large bone defects.

## Conflict of interest

DL is a co-founder of SILTISS company that hold patents for development of polysaccharide matrices in tissue regeneration.

## Acknowledgements

*In vivo* imaging was performed at Life Imaging Facility of Paris Descartes University (Plateformelmergerie du Vivant - PIV) on micro-CT Platform site (EA2496, Montrouge, France) with the technical support of L. Slimani and J. Sadoine. Thanks to the Laboratory Animal Care Facility at the University of Bordeaux for housing and care of the mice. The help of Laetitia Medan, and their co-workers is highly acknowledged. Thanks to Alain Garcia and Alexandre Fargues from the ICMCB (Bordeaux), for their help on FTIR assays.

## References

1. Greenwald, A.S., et al., *Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A Suppl 2 Pt 2**: p. 98-103.
2. Delloye, C., et al., *Bone allografts: What they can offer and what they cannot*. J Bone Joint Surg Br, 2007. **89(5)**: p. 574-9.
3. Polo-Corrales, L., M. Latorre-Esteves, and J.E. Ramirez-Vick, *Scaffold design for bone regeneration*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14(1)**: p. 15-56.
4. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1(4)**: p. 245-60.
5. Fernandez-Yague, M.A., et al., *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomaterial strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **84**: p. 1-29.
6. Carano, R.A. and E.H. Filvaroff, *Angiogenesis and bone repair*. Drug Discov Today, 2003. **8(21)**: p. 980-9.
7. Beachler, D.C., et al., *Bone Morphogenetic Protein Use and Cancer Risk Among Patients Undergoing Lumbar Arthrodesis: A Case-Cohort Study Using the SEER-Medicare Database*. J Bone Joint Surg Am, 2016. **98(13)**: p. 1064-72.
8. Yunus Basha, R., T.S. Sampath Kumar, and M. Doble, *Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **57**: p. 452-63.
9. Kondiah, P.J., et al., *A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering*. Molecules, 2016. **21(11)**.
10. Kim, K. and J.P. Fisher, *Nanoparticle technology in bone tissue engineering*. J Drug Target, 2007. **15(4)**: p. 241-52.

11. Venkatesan, J. and S.K. Kim, *Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering-- a review*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(10): p. 3124-40.
12. Munarin, F., et al., *Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites*. Int J Biol Macromol, 2015. **72**: p. 199-209.
13. Vandecandelaere, N., C. Rey, and C. Drouet, *Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(11): p. 2593-606.
14. Catros, S., et al., *Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature*. IRBM, 2010. **31**(4): p. 226-233.
15. Tayton, E., et al., *A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(8): p. 2613-24.
16. Roy, M., et al., *Effects of Zinc and Strontium Substitution in Tricalcium Phosphate on Osteoclast Differentiation and Resorption*. Biomater Sci, 2013. **1**(1).
17. Cox, S.C., et al., *Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **35**: p. 106-14.
18. Pors Nielsen, S., *The biological role of strontium*. Bone, 2004. **35**(3): p. 583-8.
19. Gentleman, E., et al., *The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro*. Biomaterials, 2010. **31**(14): p. 3949-56.
20. Marie, P.J., *Strontium ranelate in osteoporosis and beyond: identifying molecular targets in bone cell biology*. Mol Interv, 2010. **10**(5): p. 305-12.
21. Saidak, Z. and P.J. Marie, *Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis*. Pharmacol Ther, 2012. **136**(2): p. 216-26.
22. Landi, E., et al., *Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement*. Acta Biomater, 2007. **3**(6): p. 961-9.
23. Li, Y., et al., *Cancellous bone response to strontium-doped hydroxyapatite in osteoporotic rats*. J Appl Biomater Funct Mater, 2015. **13**(1): p. 28-34.
24. Zhang, W., et al., *Effects of strontium in modified biomaterials*. Acta Biomater, 2011. **7**(2): p. 800-8.
25. Lindahl, C., et al., *Incorporation of active ions into calcium phosphate coatings, their release behavior and mechanism*. Biomed Mater, 2012. **7**(4): p. 045018.
26. Lindahl, C., et al., *The influence of Sr content in calcium phosphate coatings*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **53**: p. 322-30.
27. Aina, V., et al., *Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(3): p. 1132-42.
28. Gopi, D., et al., *Development of strontium and magnesium substituted porous hydroxyapatite/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coating on surgical grade stainless steel and its bioactivity on osteoblast cells*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **114**: p. 234-40.
29. Nardone, V., et al., *In Vitro Effects of Strontium on Proliferation and Osteoinduction of Human Preadipocytes*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 871863.
30. Cheng, H., et al., *Strontium (Sr) and silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities*. Acta Biomater, 2016. **31**: p. 388-400.
31. Chen, Y.W., et al., *In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(7): p. 2655-62.
32. Gu, Z., et al., *Application of strontium-doped calcium polyphosphate scaffold on angiogenesis for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(5): p. 1251-60.
33. Elgali, I., et al., *Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events*. Acta Biomater, 2016. **29**: p. 409-23.
34. Frasnelli, M., et al., *Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **71**: p. 653-662.
35. Fricain, J.C., et al., *A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2013. **34**(12): p. 2947-59.
36. Robert, D., et al., *Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1586-95.
37. Autissier, A., et al., *Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process*. Acta Biomater, 2010. **6**(9): p. 3640-8.
38. Guerrero, J., et al., *Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8200-13.

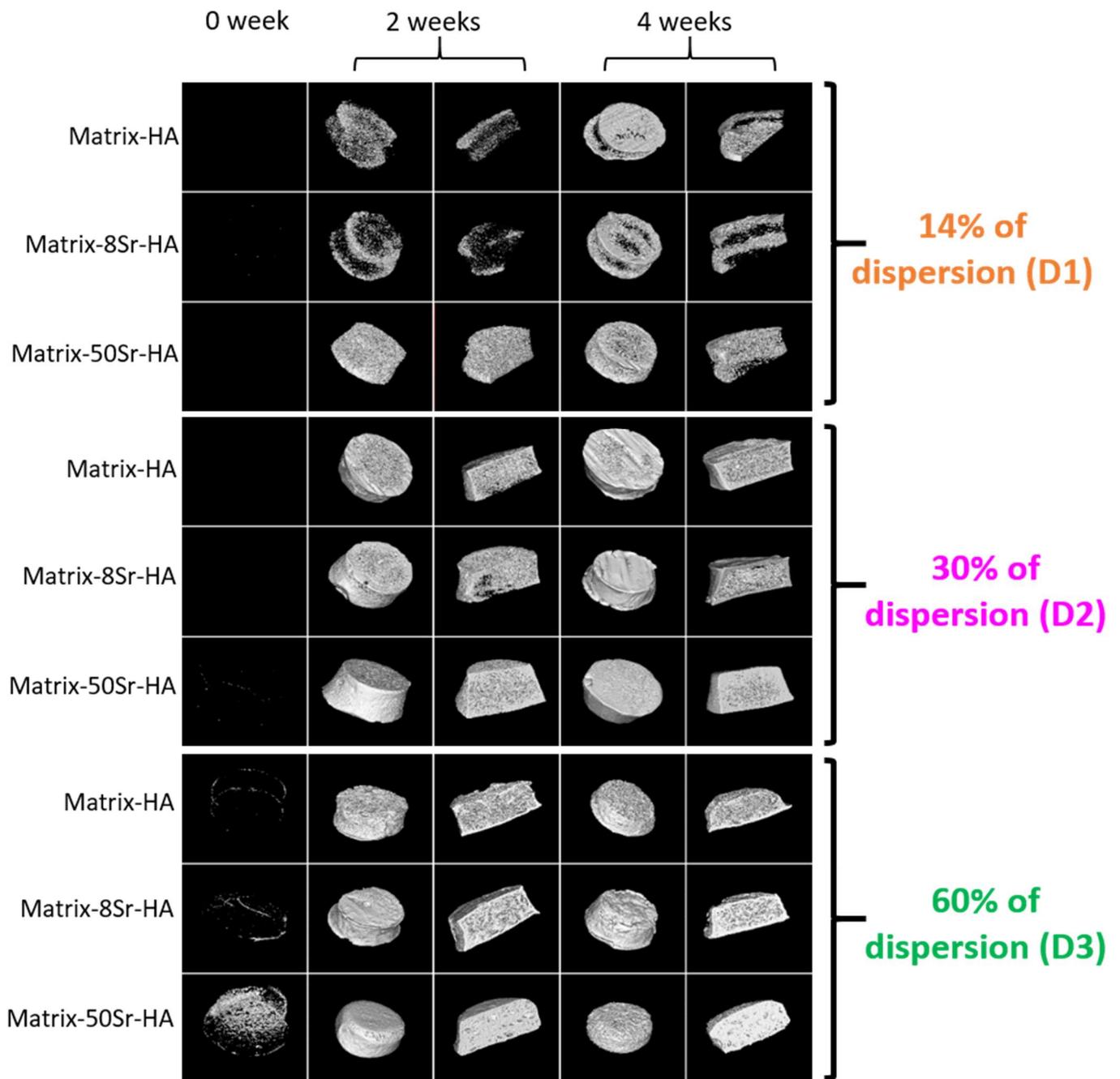
39. Boyd, A.R., et al., *The deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings*. J Mater Sci Mater Med, 2015. **26**(2): p. 65.
40. Boyd, A.R., et al., *Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique*. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications, 2015. **46**: p. 290-300.
41. Boissard, C.I., et al., *Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering*. Acta Biomater, 2009. **5**(9): p. 3316-27.
42. Tadier, S., et al., *Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems: Compositions, release properties, and effects on human osteoprogenitor cells*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012. **100**(2): p. 378-90.
43. Boanini, E., et al., *Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(9): p. 2079-88.
44. Thormann, U., et al., *Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats*. Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8589-98.
45. Rosa, J.A., et al., *Strontium Ranelate Effect on the Repair of Bone Defects and Molecular Components of the Cortical Bone of Rats*. Brazilian dental journal, 2016. **27**(5): p. 502-507.
46. Valiense, H., et al., *In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2016. **104**(2): p. 274-82.
47. Chandran, S., et al., *Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model*. J Biomater Appl, 2016. **31**(4): p. 499-509.
48. Lin, K., et al., *Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics*. Biomaterials, 2013. **34**(38): p. 10028-42.
49. Luo, X., et al., *Strontium-containing apatite/polylactide composites enhance bone formation in osteopenic rabbits*. Acta Biomater, 2015. **26**: p. 331-7.

### C. Conclusion de l'Article 1

Les principaux résultats issus de cet article sont les suivants :

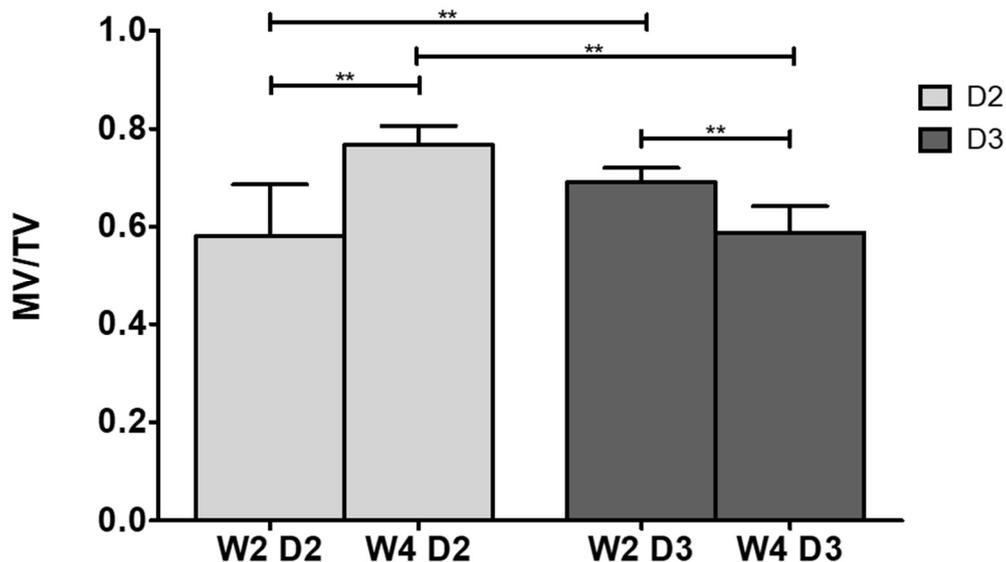
- Les particules d'hydroxyapatite contenant ou non du strontium ont été synthétisées et caractérisées. La substitution d'une partie du calcium contenu dans l'hydroxyapatite par du strontium n'affecte pas les caractéristiques physico-chimiques des particules obtenues, et ceci, quels que soient les taux de substitution du strontium (8 et 50 %).
- La dispersion des particules d'hydroxyapatite, à différents pourcentages (14, 30 et 60 % correspondant aux dispersions D1, D2 et D3 citées dans l'article), au sein de la matrice de polysaccharides, a permis de déterminer le pourcentage optimal des particules de HA permettant de stimuler la minéralisation ectopique. La formulation D2 (30 % de HA) semble être la concentration optimale. En effet, les résultats de micro-CT confirment que ce pourcentage de dispersion permet d'obtenir *in vivo* une meilleure minéralisation du tissu néoformé, comparativement à la dispersion D1 (14%) initialement utilisée dans les travaux précédents. Quant à la dispersion D3, la minéralisation tissulaire observée n'est pas significativement plus importante que celle observée avec D2. De plus, la présence de 60% de particules de HA dans la matrice révèle dès l'implantation (T0) une radio-opacité visible au  $\mu$ CT. Cette opacité est inadaptée à l'utilisation clinique que nous souhaitons faire de ces matrices pour permettre un suivi longitudinal de la minéralisation et de la formation osseuse dès les premiers stades d'implantation.
- Les études *in vitro* ont permis de démontrer l'absence de cytotoxicité de ces différentes matrices, dopées en strontium, quels que soient les pourcentages de substitution (8 et 50 %), lorsqu'elles sontensemencées avec des cellules souches mésenchymateuses humaines.  
Nous avons également pu montrer que ces mêmes matrices permettent la différenciation des MSCs vers le lignage ostéoblastique. Nous avons toutefois observé une stimulation transitoire de l'expression relative de l'ostéopontine après 3 jours de culture au sein des matrices dopées en strontium (avec 8 % et 50 % de taux de substitution), en comparaison aux cellules cultivées au sein des matrices dépourvues de strontium. Néanmoins, ces études *in vitro* ne permettent pas de conclure sur un taux optimal de substitution du strontium pour activer l'ostéogénèse.
- A l'opposé, les études réalisées *in vivo* chez la souris après implantation en site sous cutané de ces matrices pendant 2 et 4 semaines ont permis de mettre en évidence, et de confirmer le double rôle du strontium sur la néoformation osseuse et la vascularisation.

Dans cet article, seules les implantations des matrices dopées en strontium à la dispersion D2 ont été présentées. Cependant les implantations pour chacune des formulations (D1, D2, D3) et chacun des taux de substitution 8% (8Sr-HA) et 50% (50Sr-HA) ont été réalisées et analysées par micro-CT. La figure ci-dessous rassemble les données obtenues.



**FIGURE 1 : IMAGES REPRESENTATIVES DES EXPLANTS PAR MICRO-CT APRES IMPLANTATIONS EN SITE SOUS CUTANEE DES MATRICES CONTENANT DIFFERENTS TAUX DE HA (D1,D2 ET D3) ET DIFFERENTS POURCENTAGES DE SUBSTITUTION EN STRONTIUM 8% (8SR-HA) ET 50% (50SR-HA) COMPARE AUX MATRICES SANS STRONTIUM (MATRIX-HA)**

L'analyse qualitative (**Figure 40**) de ces données confirme que la dispersion D3 (60% de particules de HA), présente une radio-opacité, dès le temps 0, qui est augmentée par la présence de strontium dans la matrice.



**FIGURE 2 : ANALYSE QUANTITATIVE DU TISSU MINERALISE FORME APRES IMPLANTATIONS EN SITE SOUS CUTANEE DES MATRICES CONTENANT DIFFERENTS TAUX DE HA (D2 ET D3) ET UN POURCENTAGE DE SUBSTITUTION EN STRONTIUM DE 50% (MATRIX-50SR-HA)**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Le symbole \*\* représente un  $p < 0.01$ . T-test

L'analyse quantitative (**Figure 41**) du tissu minéralisé formé, après implantation de ces matrices composites (D2 et D3), après 2 et 4 semaines (W2 et W4), montre que l'augmentation de la quantité de particules dans ces matrices de D2 à D3 ne permet pas d'observer une augmentation significative de la quantité minérale / volume total (MV/TV).

Ces données supplémentaires révèlent qu'un contenu plus élevé en phase minérale ne stimule pas pour autant la minéralisation osseuse. Ces résultats sont en accord avec la littérature. Des concentrations élevées de particules d'hydroxyapatite peuvent conduire à la formation d'agrégats de grande taille, à une hétérogénéité de dispersion des particules, une diminution de la taille des pores et à une perte de bioactivité de ces matrices composites [246-248]

S'agissant du rôle du strontium sur la néoformation osseuse, il semble difficile, au travers de ces résultats obtenus par micro-CT, de conclure sur le choix d'un taux de substitution. A l'opposé, s'agissant du rôle du strontium sur la néovascularisation, les résultats d'immunohistochimie démontrent que le nombre de vaisseaux néoformés dans les matrices composites supplémentées par les particules d'HA, dopées à 50 % de strontium (50Sr-HA), est significativement plus élevé que ceux présents dans les matrices sans strontium, ou dans celles supplémentées par les particules de HA dopées à 8 % (8Sr-HA).

**En conclusion, ce premier article** nous a donc permis d'optimiser **le contenu** (dispersion des particules de HA à 30 %) **et la nature de la phase minérale** (substitution du strontium) associée aux polysaccharides pour stimuler la minéralisation osseuse, la formation de tissu ostéoïde et de néovaisseaux.

Ces nouvelles générations de matrices composites seront évaluées dans des modèles précliniques de reconstruction osseuse. Un premier modèle **de comblement d'une lésion osseuse réalisée au niveau du condyle fémoral de rat** est présenté ci-après, avant de mesurer l'efficacité de ces matrices dans des modèles plus complexes de régénération tissulaire à savoir la reconstruction en terrain irradié, qui font l'objet de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> partie de ce travail de thèse.

#### D. Données complémentaires

##### **Modèle de lésion osseuse dans le condyle fémoral chez le rat :**

##### **Comblement avec une matrice composite de polysaccharides contenant des particules d'HA dopées ou non en strontium**

Suite à ce premier article, ce travail de thèse s'est poursuivi par l'évaluation des matrices composites, dopées ou non en strontium, dans un modèle de lésion condyloire du fémur de rat.

Ce modèle expérimental, comme décrit précédemment, ne conduit pas à une lésion de taille critique mais permet une étude comparative de matrices modifiées, comme cela a pu être montré précédemment [87, 127].

Au cours des travaux précédents (**Article 1**), nous avons utilisé ces matrices de polysaccharides sous forme de disques. Pour ces implantations en site osseux, comme décrit précédemment [87, 127], des billes (de ces matrices composites) de 250 à 500µm de diamètre ont été produites par l'Unité U1148. Le choix d'utiliser une formulation injectable sous forme de microbilles relève de travaux publiés par nos laboratoires et confirmés par la littérature. En effet, les matériaux implantés sous forme de billes permettent une meilleure colonisation par les cellules et facilite l'invasion du tissu néoformé autour et entre les billes [290]. De plus, ce conditionnement permet l'injectabilité de ces dernières.

Les particules d'HA ont été synthétisées en suivant le même protocole que celui décrit dans l'**article 1**. Les billes de matrices composites citées ci-après, ont été synthétisées en suivant le protocole utilisé par Schlaubitz *et al* [127].

- Matrix-HA (D2)
- Matrix-8Sr-HA (D2)
- Matrix-50Sr-HA (D2)

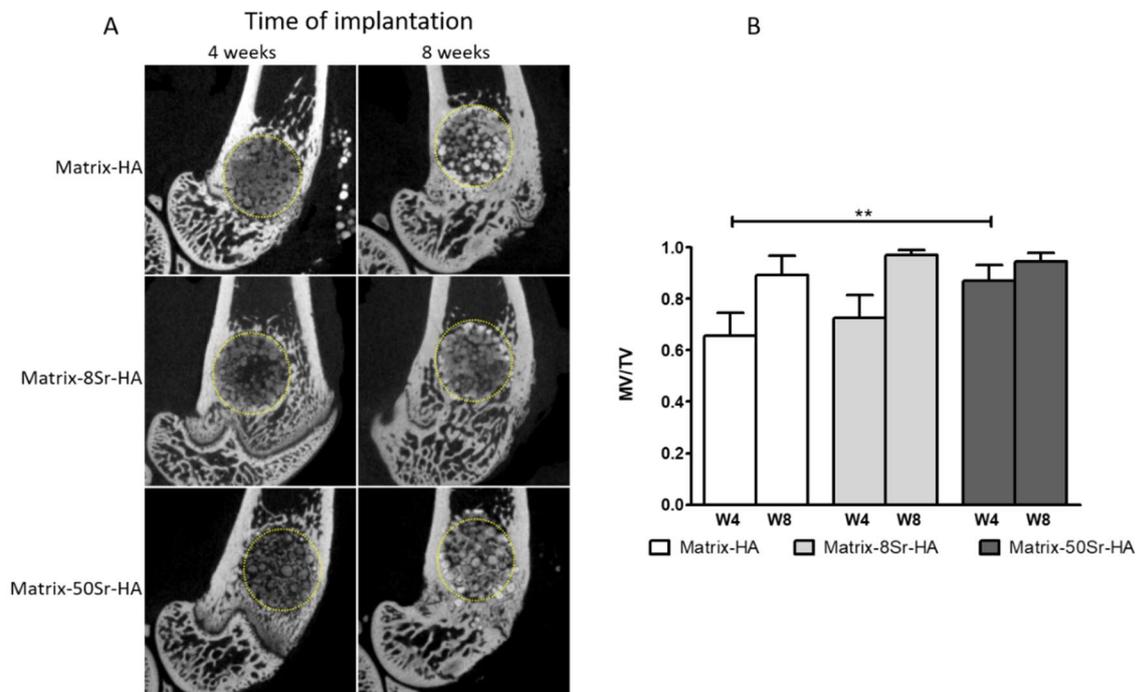
#### Matériels et méthodes

Le « Matériels et Méthodes » écrit en anglais est présenté dans l'**Annexe 3** en vu de la préparation de l'article correspondant.

#### Résultats

Après 4 et 8 semaines d'implantation de ces matrices dans le condyle fémoral du rat, les condyles ont été prélevés et analysés par micro-CT. Les résultats présentés dans la **Figure 42A** montrent que les billes de biomatériau sont toujours présentes à l'intérieur des condyles après 8 semaines d'implantation. L'analyse quantitative de la minéralisation osseuse (ratio du tissu minéralisé par rapport au volume total du tissu – MV/TV) obtenue à l'aide du logiciel

Microview (**Figure 42B**) montre une augmentation significative du MV/TV après 4 semaines d'implantation des matrices contenant 50% de strontium, en comparaison des matrices sans strontium. Cependant, aucune différence significative n'est observée après 8 semaines d'implantation, quel que soit le ratio de substitution en strontium.

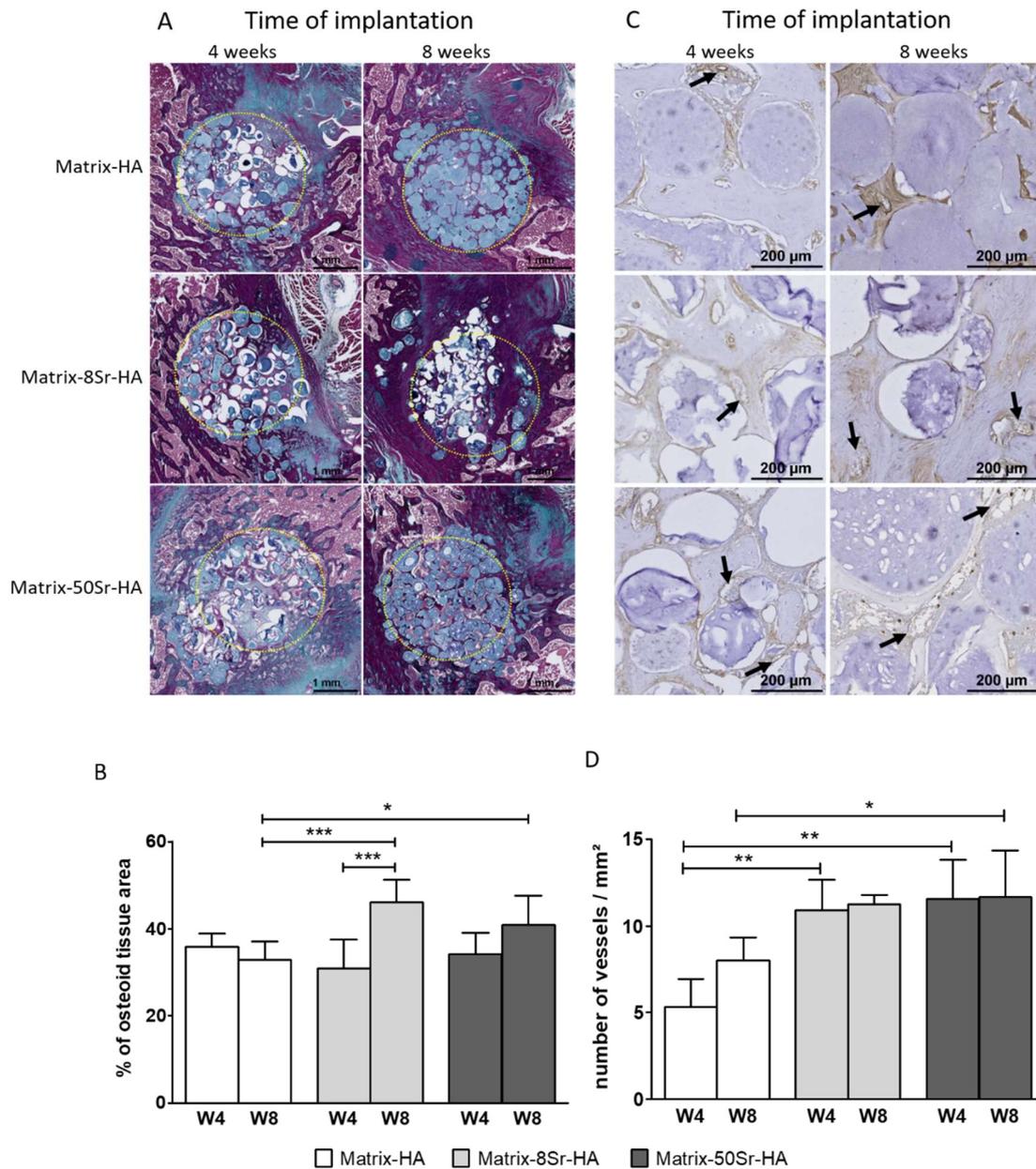


**FIGURE 3 : ANALYSES PAR MICRO-CT DES MATRICES DE HA CONTENANT DES PARTICULES DE HA DOPEES OU NON EN STRONTIUM**

(A) Photos représentatives des condyles après 4 et 8 semaines d'implantation des matrices dans les lésions condyliques. Les lésions sont mises en évidence par les cercles jaunes en pointillés. (B) Analyse quantitative du volume de tissu minéralisé par rapport au volume total (MV/TV) après 4 (W4) et 8 semaines (W8) d'implantation. Huit échantillons ont été analysés pour chaque condition et pour chaque temps d'implantation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard. Le symbole \*\* représente un  $p < 0,01$ . Le test statistique utilisé était le One Way ANOVA.

La coloration au Trichrome de Masson du tissu osseux (**Figure 43A**) et la quantification du tissu ostéoïde néoformé par analyse d'images (imageJ) (**Figure 43B**) confirment que la présence de strontium dans les matrices, quel que soit le taux de substitution, stimule la formation du tissu ostéoïde seulement après 8 semaines d'implantation.

La formation de vaisseaux a également été analysée grâce au marquage du facteur van Willebrand (vWF) (**Figure 43C**). Après 4 semaines d'implantation, un nombre significativement plus élevé de vaisseaux a été observé en présence des matrices 8Sr-HA et 50Sr-HA, en comparaison avec la matrice ne contenant pas de strontium (**Figure 43D**). Le taux de substitution de 50 % de strontium après 8 semaines d'implantation augmente de façon significative le nombre de vaisseaux /  $\text{mm}^2$ , par rapport aux matrices non dopées.



**FIGURE 4 : ANALYSES HISTOLOGIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DU TISSU NEOFORME AU SEIN DES DIFFERENTES MATRICES IMPLANTEES DANS LES DEFATS CONDYLAIRES CHEZ LE RAT**

(A) Marquage au Trichrome de Masson du tissu néoformé à l'intérieur des trois types de matrices dopées ou non en strontium après 4 (W4) et 8 semaines (W8). Les lésions sont mises en évidence par les cercles jaunes en pointillés. (B) Analyse quantitative de la surface du tissu ostéoïde néoformé en mm<sup>2</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard. Les symboles\* ; et \*\*\* représentent p < 0.05 and p < 0.001, respectivement. (C) Immunomarquage du vWF dans le tissu nouvellement formé. (D) La quantification du nombre de vaisseaux par mm<sup>2</sup> a été réalisée à l'aide du logiciel NDP view. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard. Les symboles \* ; et \*\* représentent p < 0.05 ; et p < 0.01, respectivement. Le test statistique utilisé est le test One Way ANOVA.

## E. Conclusion de la première partie de ce travail

Nos études ont permis de démontrer que les matrices de polysaccharides contenant 30 % de particules de HA (D2), dopées en strontium, sont capables de stimuler la minéralisation osseuse, et la vascularisation en site ectopique (**Article 1**). L'implantation de ces mêmes matrices en site orthotopique confirme les premières observations. De plus, la présence de strontium dans les matrices stimule la formation du tissu ostéoïde et la néovascularisation.

Cependant, la lésion osseuse au niveau du condyle n'est pas une lésion de taille critique. En absence de matériel implanté (données non présentées ici), une reconstruction partielle du tissu a lieu et confirme que ce défaut a la capacité de se régénérer par lui-même. D'après ces observations, la minéralisation et la néoformation osseuse que nous constatons en présence des matrices de polysaccharides ne peut donc pas être entièrement due aux propriétés de ces matrices. Ce modèle de lésion condyalaire permet cependant de comparer les matrices entre elles et avec les résultats déjà publiés par nos équipes [127]. Un modèle plus pertinent de résection segmentaire, qui conduit à une lésion de taille critique permettra d'approuver plus avant les performances de ces matrices dopées en strontium.

Dans la dernière partie de ce premier travail, l'utilisation des matrices sous forme de billes injectables semble être pertinente. En effet, d'autres études ont mis en évidence l'efficacité des billes en ingénierie tissulaire osseuse par rapport à des structures denses macroporeuses [290, 291].

La coloration au Trichrome de Masson nous permet de visualiser la colonisation du tissu ostéoïde, au sein de la lésion, en contact direct avec les billes et entre celles-ci.

De plus, la présence de structures vasculaires au centre de l'explant témoigne de l'invasion cellulaire facilitée par la présence de micro-billes.

Un autre point important de notre étude concerne le relargage de strontium de la matrice au cours de son implantation en site osseux. En effet, nous souhaitons savoir si l'effet du strontium que nous observons est dû à un relargage massif ou continu au cours du temps d'implantation, comme décrit par Schumacher *et al.* [292]. Les études de relargage de strontium *in vitro* sont en cours.



# Deuxième partie :

**Modèles de reconstruction tissulaire en territoire irradiés**

**Application de la technique de Masquelet**

## A. Introduction

Dans le cas de lésions osseuses massives et afin de pallier aux limites des autogreffes, Masquelet, dans les années 2000, a mis au point une technique permettant notamment de réduire la résorption osseuse de ces autogreffes. Cette technique est devenue une référence dans le domaine de l'orthopédie et de la chirurgie maxillo-faciale [52].

La reconstruction osseuse par la technique de Masquelet se fait en deux étapes. La première étape comprend la mise en place d'un ciment chirurgical (polyméthyl methacrylate, PMMA) au niveau de la lésion osseuse. La seconde étape consiste à retirer le PMMA, après que celui-ci ait permis la formation d'une membrane dite "induite" autour de ce polymère. La cavité créée est ensuite comblée avec de l'os autologue, le plus souvent issu de la crête iliaque. Cette autogreffe est pour certaines applications cliniques associée à des facteurs ostéoinducteurs comme la BMP2.

Au cours de la première étape de cette procédure, l'utilisation d'un ciment a pour but d'éviter un affaissement des tissus mous. Comme décrit précédemment, la membrane induite assure la protection de l'autogreffe et constitue un microenvironnement richement vascularisé. L'analyse histologique de la membrane induite par un ciment de PMMA dans des modèles de petits et gros animaux, formés en site osseux ou ectopique, a fait l'objet de nombreuses publications. Ces différents travaux démontrent une membrane constituée de fibres de collagène richement vascularisée [56, 293]. La présence de VEGF a été mise en évidence dans des travaux menés par Pelissier *et al.* chez le lapin. La présence de BMP2 dans cette membrane pourrait également lui conférer des propriétés d'ostéoinduction bien que ce résultat soit controversé [56].

Cette technique de reconstruction osseuse constitue une des stratégies chirurgicales de choix après résection tumorale tant pour des applications orthopédiques que pour la reconstruction maxillo-faciale après cancer de la voie orale [294]. Dans ce contexte tumoral, une radiothérapie externe est souvent réalisée au niveau de la zone d'implantation de la greffe, afin de détruire les cellules cancéreuses. La littérature révèle un fort taux d'échec des greffes de lambeaux libres lorsque les patients subissent une série de irradiations (mauvaise cicatrisation des tissus, nécrose, diminution, et perte de la vascularisation) [295].

Bien que la BMP2 soit fréquemment utilisée en orthopédie et en chirurgie maxillo-faciale pour améliorer la cinétique de reconstruction osseuse, y compris dans le cadre de cette technique de Masquelet, son utilisation n'est pas possible pour des traitements de reconstruction osseuse après ablation tumorale. En effet, l'utilisation de facteurs de croissance est susceptible d'entraîner une réminiscence d'activité proliférative d'éventuelles cellules tumorales. C'est dans ce but que nous avons mis au point dans la première partie, une nouvelle génération de matrices de polysaccharides contenant des particules d'hydroxyapatite dopées en strontium, présentant des propriétés ostéoinductrices et angiogéniques sans ajout de facteurs de croissance.

La finalité de ce travail sera de pouvoir, dans le cadre de la technique de Masquelet, remplacer cette greffe d'os autologue par la matrice composite de polysaccharides, ostéoinductrice et ostéoconductrice, qui sera alors produite sous forme de billes injectables [87, 127, 296] et injectée directement au sein de la cavité formée par le conformateur en polymère.

Cependant, avant d'évaluer l'efficacité de cette nouvelle génération de matrice, quelques questions subsistent. En effet, peu de données de la littérature décrivent l'effet de la radiothérapie sur la formation de la membrane induite. De plus, la nature du conformateur utilisé peut également avoir un effet sur la mise en place et la nature de cette membrane.

Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire BioTis ont permis d'évaluer l'influence d'un traitement de radiothérapie sur la formation d'une membrane induite après introduction en **site sous cutané** de deux types de conformateurs : le ciment en PMMA et d'un autre type de conformateur, le silicone [61]. Ce matériau est déjà utilisé en clinique, possède des propriétés de biocompatibilité, mais a également montré une bonne tolérance à la radiothérapie [297]. De plus, le silicone est un matériau facile à manipuler, souple, élastique, et pourrait améliorer les techniques de retrait des conformateurs pour le 2<sup>ème</sup> temps chirurgical.

Par ailleurs, ces travaux réalisés en **site ectopique** ont montré que les radiations avaient un effet sur les propriétés macroscopiques des membranes induites obtenues en présence de PMMA, mais pas sur les membranes obtenues en présence de silicone. Ces travaux ont également confirmé la maniabilité du silicone lors de l'étape de retrait du conformateur, ce qui permettait d'obtenir une membrane en meilleur état qu'après retrait du PMMA. En effet, un cal osseux peut se former aux extrémités des structures osseuses, au niveau du PMMA, rendant son extraction plus complexe et augmentant les risques d'endommager la membrane au moment de la seconde étape chirurgicale.

La cavité, consécutive au retrait du conformateur, comblée en routine avec de l'os autologue prélevé au niveau de la crête iliaque du patient, sera dans cette étude comblée avec les différentes formulations de billes injectables préalablement produites dans la 1<sup>ère</sup> partie de ce travail. Cette formulation injectable, s'adaptant parfaitement à la forme et à la taille du défaut qu'elle doit combler, permet également de ne pas inciser la membrane induite de manière trop importante pour préserver sa fonction biologique et protectrice

**Comme décrit dans la Figure 44, le but de cette deuxième partie a été d'étudier un modèle de reconstruction osseuse en territoires irradiés en utilisant la technique de Masquelet. Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet d'une radiothérapie sur l'activité biologique de la membrane induite obtenue en présence de deux types de conformateurs, le silicone et le PMMA (ciment chirurgical de référence), placés tous deux après résection segmentaire du fémur chez le rat.**

**Puis les premiers essais d'implantation des matrices sous forme de billes ont été réalisées en suivant ce même modèle.**

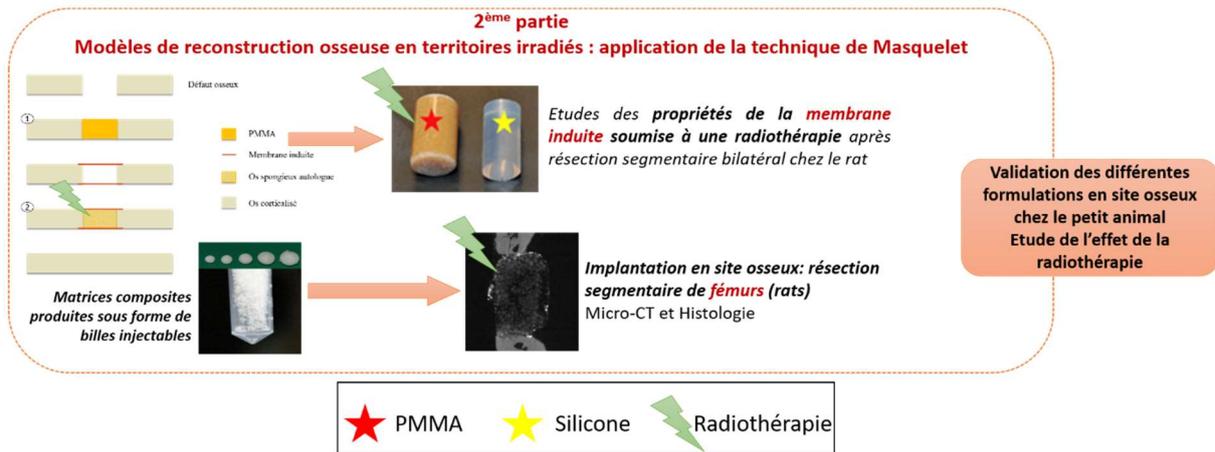


FIGURE 5 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA DEUXIEME PARTIE

L'Article 2 regroupe les étapes suivantes :

- **Mise en place de la technique de Masquelet** au niveau d'une lésion segmentaire bilatérale du fémur de rat (6 mm), et implantation des deux conformateurs différents : PMMA et silicone (6 mm de long et 5 mm de diamètre)
- Mise en place d'un **traitement de radiothérapie localisé** au niveau du site d'implantation : les rats ont subi le protocole de radiothérapie 3 semaines après la première étape de la technique de Masquelet. Il a consisté en une irradiation au niveau du site opératoire, de 2 gray, pendant 25 jours (à raison de 5 jours par semaine). Cette étape de traitement par radiothérapie a été réalisée à ONCOVET, une plateforme vétérinaire de radiothérapie, à Villeneuve d'Ascq.
- **Etude de l'effet de la radiothérapie** sur les propriétés biologiques des membranes induites formées par ces deux conformateurs (PMMA et silicone)
  - **Etude histologique des membranes induites** ayant subi ou non une irradiation par la coloration HES et immunomarquage du CD31 ;
  - **Etude des facteurs de croissance sécrétés par les membranes induites** grâce à la technique ELISA. Les facteurs de croissance étudiés sont le VEGF et la BMP2 ;
  - **Etude de l'effet des facteurs sécrétés par la membrane induite sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (MSCs)**. Ces dernières ont été mises en contact avec les extraits protéiques des membranes induites ainsi formées, puis l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) a été étudiée comme marqueur de la différenciation ostéoblastique.

# ARTICLE 2

**INFLUENCE OF EXTERNAL BEAM RADIOTHERAPY ON THE PROPERTIES OF PMMA- VERSUS SILICONE-INDUCED MEMBRANES IN A BILATERAL SEGMENTAL BONE DEFECT IN RATS**

Ehret C., Sagardoy T., Bareille R., Benoit J., Amédée J., De Mones E.

*Tissue Eng Part A. 2017 Aug 29. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0095.*

## B. Résultats

### **Abstract:**

Standard care for malignant tumors arising next to a bone structure is surgical removal with safety margins, followed by external beam radiotherapy (EBRT). Complete tumor removal can result in large bone defects. A two-step bone reconstruction technique using the induced membrane (IM) technique has proven its efficacy to bridge gap non-union. During the first step, a spacer is placed in the bone gap. The spacer then is removed and the IM around it is filled with autologous cancellous bone graft. However, the feasibility of this technique with the addition of adjuvant EBRT between the two reconstruction steps has not yet been studied. Polymethyl methacrylate (PMMA) used to be the standard spacer material for the first step. Silicone spacers could replace them owing to their good behavior when submitted to EBRT and their easier removal from the surgical site during the second step. The aim of this study was to evaluate the influence of EBRT on the histological and biochemical properties of IM induced using PMMA or silicone as spacer.

The analyses were performed on PMMA- or silicone-IM with and without EBRT in a 6-mm bilateral femoral defect in 32 rats. Thickness and vessel content were measured in both groups. BMP2 and VEGF content in lysates of the crushed membranes were measured by enzyme immunoassay. Finally, ALP activity was analyzed in human bone marrow stromal cell cultures in contact with the same lysates.

EBRT did not change the histological structure of the cellular internal layer or the fibrous outer layer. The nature of the spacer only influenced IM thickness, PMMA-IM with external radiotherapy being significantly thicker. EBRT decreased the vascular density of IM but was less effective on VEGF/BMP2 production. In vitro, IM could have an osteoinductive potential on human bone marrow stem cells.

EBRT did not modify the histological properties of IMs but decreased their vascular density. VEGF and BMP2 production within IMs was not affected by EBRT. Silicone spacers are able to induce membranes with similar histological characteristics to PMMA-IM

### **1. Introduction**

Large bone segmental defects cannot heal completely with a one-step autologous cancellous bone graft because it resorbs too quickly compared to bone regeneration (1)(2). The compartmentalization concept, i.e. the use of an anatomical barrier between the graft and the surrounding non-osseous tissues, was developed to limit such resorption and preserve the osteoinductive properties of the graft (3)(4). The induced membrane (IM) technique is a two-step surgical procedure reported in 2000 by Masquelet for long bone segmental reconstruction in the event of failure of more conventional surgical procedures (5). First, the

segmental bone defect is filled with a bone cement spacer made of polymethyl methacrylate (PMMA) (6)-(7). After about four weeks, a pseudo synovial membrane, i.e. the IM, develops spontaneously around the PMMA spacer. Next, the IM is incised longitudinally, the spacer is removed and the proximal and distal bone ends are drilled. The empty cavity surrounded by the IM is then filled with autologous cancellous bone graft. Complete bone reconstruction is achieved in up to 90% cases for long-bone defects ranging from 4 to 25 cm (7).

The histological properties of IMs obtained with PMMA spacers have been largely reported both in clinical studies and in small and large animal models in subcutaneous and bone sites (5–15). IMs are composed of a thin inner cellular layer in contact with the PMMA and a larger external layer consisting essentially of collagen associated with some dispersed fibroblasts (15,16) and a rich vascular network (3,4,9,11,14–17). Pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and pro-osteogenic factors like bone morphogenetic protein 2 (BMP2) growth factors inside the membranes are also increased in comparison to the surrounding tissues (10,16). VEGF is a signal protein produced to stimulate angiogenesis during embryonic development, but also after an injury in a tissue. BMP2 is a protein belonging to the transforming growth factor beta superfamily. The BMP2 signaling cascade induces osteoblast differentiation and thus promotes osteogenesis. These factors may facilitate bone regeneration inside the IM although this has not been clearly demonstrated by the few clinical studies conducted until now. (9,12,15).

The IM procedure could be used in patients in need of head and neck squamous cell carcinoma treatment. Indeed, the mucosal tumor can extend to the mandibular bone and require wide segmental bone resection. The gold standard for bone reconstruction in this setting is the use of a vascularized composite free bone graft of fibula. In such settings, radiotherapy is often given as an adjunct less than 2 months after surgery for up to seven weeks. External beam radiation applied on free flaps results in a high rate of immediate or delayed wound healing complications (27% of cases) and may lead to bone graft osteonecrosis (in 9% of cases)(18). With the IM technique, the spacer should be implanted at the time of tumor resection and the second step (implantation of the autologous cancellous bone graft) should be performed after external beam radiotherapy (EBRT) has been completed. Indeed, adjuvant EBRT could certainly have a negative influence on bone regeneration and remodeling if delivered after the bone graft.

PMMA spacers are stiff and can be difficult to remove during the second step, especially when covered with newly formed bone in the limits of the osteotomy. In that case, PMMA removal can require wide opening of the IM, resulting in a loss of vascularized areas. An alternative spacer material such as medical grade silicone could be of interest, because it is smooth and has been reported to be able to induce a pseudo synovial membrane when placed in the human body, is easy to remove from surrounding structures and is compatible with EBRT (19–23).

Few papers to date have described the effects of EBRT on the biological properties of IMs (24). A previous study compared the effect of EBRT on these properties in an ectopic subcutaneous

site using a stiff PMMA spacer and a semi-flexible medical-grade silicone spacer. Irradiation did not change the macroscopic properties of silicone IMs while PMMA IMs were sensitive to EBRT (24).

The negative influence of EBRT on healthy tissues has been largely reported but its influence on the histological and the biological properties of IM remains unknown (24). EBRT up-regulates different modes of cellular activation leading to the production of pro-inflammatory cytokines (25) and negatively affects vascularization (26)(27). Cytokine production persists beyond the acute phase and activates the collagen production responsible for delayed tissue fibrosis (28).

The aim of this study was to evaluate the effect of EBRT on the histological and biological properties of IMs developed with PMMA or silicone spacers in segmental critical size defects in the long bone in rats.

## **2. Materials and methods**

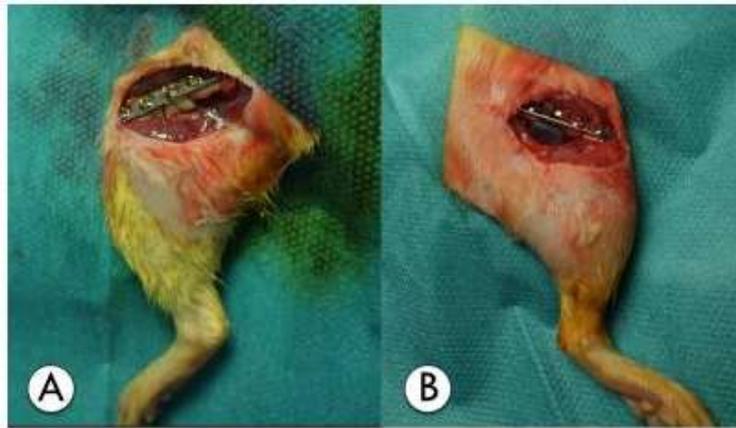
### *Preparation of spacers*

Spacers were 6 mm in length and 5 mm in diameter. PMMA spacers were made of medical grade PMMA bone cement (CMW 3, DePuy International, Blackpool, England) hardened in glass Kimble tubes (Dutscher). The glass was broken to collect the solidified PMMA that was cut to the desired length and sterilized by 25 kGy of gamma radiation. Medical-grade silicone spacers were manufactured on demand (Sebbin, Boissy L'Ailerie, France.) and were sterilized at 134 °Celsius.

### *Surgical protocol: osteotomy and spacer implantation within bone defect*

Surgical procedures and animal postoperative care were conducted in accordance with the French Ministry of Research and Agriculture procedures for the care and use of laboratory animals. The experiments were performed under the supervision of an authorized laboratory member (authorization B3310023) in an accredited animal facility (authorization A33-063-917). The rats had full unlimited access to food and water and were able to move without restriction. Thirty-two female Wistar-RjHan rats (12 weeks age, 250g average weight) were obtained from a patented vendor (Janvier, Le Genest, France). Surgical procedures were performed under general anesthesia using isoflurane inhalation (Medical Segal Electronique, Lormont, France). The postero-lateral side of the femoral bone was approached through a 3-cm skin incision. The bone was then drilled under saline irrigation to produce a 6-mm critical bone defect, filled with a PMMA spacer on the left side and a silicone spacer on the right side in each animal. A 5-hole titanium mini-plate (VP1313.09, Synthes, Solothurn, Switzerland) secured in place with two proximal and two distal cortical screws (1.5 mm in diameter, 7 mm in length, VS102.007, Synthes, Solothurn, Switzerland) was used to stabilize the proximal and distal femoral bone (Figure 1). The muscles and the superficial fascia were closed using

absorbable 3/0 sutures (vicryl 4.0, Ethicon, division of Johnson & Johnson, Brussels, Belgium). The skin was closed with Michel staples and then covered with aluminum spray (Aluspray, Vetoquinol, Lure, France).



**Figure 1 : Intra-operative aspect of femoral bone defect.** The two ends of bone defect are held in place by titanium plate. A: left side, bone defect with PMMA spacer. B: right side, bone defect with silicone spacer.

#### *Post-operative care*

Animals were given a subcutaneous injection of a cephalosporin antibiotic (cefazoline 0.06 mg/kg) and an opioid painkiller (buprenorphine 0.05 mg/kg) during the procedure and the day after. Pain was assessed using a behavioral scale; another painkiller injection was performed if necessary. The animals were weighed weekly. The staff of the animal facility evaluated the rats daily for behavior, pain, good food intake and normal movements. Radiological follow-up evaluations were performed (Faxitron MX20, Tucson, USA) every two weeks from the first postoperative week to check the spacer position and the absence of bone complications. The criteria to suspect an infection and perform more investigations were as follows: abnormal movements of the animal in the cage, analgesic-resistant pain, poor food intake, displacement of the plate and/or the screw and decrease in bone density suggestive of osteitis.

Three weeks after surgery, the rats were divided into two equal groups. The first group (16 rats) received EBRT for 5 weeks and the other group did not (16 rats), leading to four different IM conditions: silicone spacer without EBRT; PMMA spacer without EBRT; silicone spacer with EBRT; and PMMA spacer with EBRT.

#### *External beam radiotherapy protocol*

Irradiation started 3 weeks after spacer insertion in the two irradiated groups. EBRT was delivered at PRECI, an experimental veterinary radiotherapy platform (Villeneuve d'Ascq,

France). An orthovoltage X-ray source (PANTAK, THERAPAX DXT 300, Gulmay Medical, Camberley, UK) was used to deliver a 100kV low-energy photon beam. Rats were treated individually under isoflurane anesthesia in dorsal recumbency. A 5-cm circular applicator (SSD 30cm; 3-cm efficient field width) was directed as a single field on the bone defect over the medial aspect of each left and right hind limb. For each field, a 3-mm sheet of lead blocked the ipsilateral aspect of the pelvis. Twenty-five daily fractions (5-day week) of 2 Gray were administered to the implant (skin dose of 2.2 Gy) for a total dose of 50 Gray (total skin dose of 55Gy). During the EBRT procedure and the period between EBRT and euthanasia, rats were evaluated every day and weighed weekly. Irradiation-related complications were screened such as local skin inflammation, wound complication and hair modification.

#### *Euthanasia*

Rats were sacrificed 11 weeks after surgery with a CO<sub>2</sub> overdose. The operated site was accessed again and the IM removed in sterile conditions. Half of the membranes for each study condition (n=8) were recovered and immediately stored at minus 80°Celsius. These membranes were used for protein extraction and cell culture. The other half (n=8) were placed in a 4% (w/v) paraformaldehyde solution for 48 hours, then kept in 0.1 M PBS pH 7.4 at 4°Celsius for histological analysis. Muscle biopsies in the surrounding tissue (treatment area) were obtained as controls.

#### *Evaluation of IM architecture and thickness*

Samples recovered for histology were processed for paraffin-embedding and 4-micrometer sections were cut. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) for microscopic analysis (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan.). IM thickness was evaluated microscopically on HES-stained sections using NIS Element (Nikon, Tokyo, Japan.). For each sample and for each group, the measurements from the membranes were based on 5 histological cross-sections showing the entire membrane at three different anatomic areas: at the junction of the IM and the titanium plate, on the opposite side of the membrane, and at the portion of the IM located at equal distance from these two locations.

#### *Evaluation of IM vascularization*

Immunohistochemical analysis was performed on histological sections using anti-CD31 antibody (Abbiotech, San Diego, USA) to reveal endothelial cells. Slides were counterstained in Mayer's hematoxylin and washed in running tap water for 10 min. For each IM, two sections were screened at two different regions of interest. These areas of interest represented a 250 x 500 micrometer square to determine the number of blood vessels per square-micrometer.

#### *Protein extraction from IM*

Protein lysates from the membrane samples stored at minus 80°Celsius were obtained using a Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) homogenization

system. Samples were placed in individual tubes with ceramic balls (hard tissue homogenizing CK28-R, Precellys lysing kit, Montigny-le-Bretonneux, France), in 0.1 M PBS pH 7.4 containing protease inhibitors: 1 mM Pefabloc SC (Fluka, Sigma-Aldrich, St Louis/MO, USA); 5 µg/ml leupeptin (Sigma-Aldrich, St Louis/MO, USA); 5 µg/ml aprotinin (Sigma-Aldrich, St Louis/MO, USA.). One ml of supernatant was recovered for each sample after 3 sequences of 30 seconds of stirring, then 5 minutes on ice. Samples were centrifuged for 5 min (10000 rotation per minute) at 4°Celsius for the remaining cellular debris. Total protein quantification was then performed using a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford/IL, USA)

#### *BMP2 and VEGF quantification*

BMP-2 and VEGF quantification were performed using the ELISA method (rat BMP2 ELISA kit and rat VEGF ELISA kit, Abnova, Taipei, Taiwan.). Results are shown as quantity of protein of interest (pg/ml) / total quantity of protein in the sample (pg/ml).

#### *Cell cultures*

Human Bone Marrow Stromal cells (HBMSCs) were obtained as previously described with consent from patients who underwent femoral head replacement (29). Stromal cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% (v/v) of fetal calf serum (Life Technologies, Saint Aubin, France).

HBMSCs were seeded at a density of 20,000 cells/cm<sup>2</sup> in 24-well plates in triplicate. They were cultured in alpha Minimum Essential Medium (Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 0.5% (w/v) BSA, 0.3% (v/ 252 v) fetal calf serum and 100 µg of protein extract from IM. The medium was changed every day and cell differentiation was assessed after three days of culture by measuring alkaline phosphatase (ALP) activity. ALP activity was evaluated with a colorimetric assay using the conversion of a colorless p-nitrophenyl phosphate to a colored p-nitrophenol (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit 85L-2, Sigma Aldrich, St Louis/MO, USA). Absorbance was read at 405 nm and a standard curve was built to evaluate ALP activity within the wells. Results are expressed in nmoles of cleaved Pi/µg of protein. IMs were pooled to reach n=3 for all conditions. The culture of HBMSCs in alpha MEM alone served as a control, as well as protein extracted from muscle samples submitted to the same study conditions. The culture of HBMSCs in induction medium served mainly as an internal control for the experiment.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 6.0 software (Graph Pad software, La Jolla/CA, USA). Descriptive results are detailed as mean and standard deviation. To analyze the statistical significance using a non-parametric test designed to compare small-unpaired samples, measurements were analyzed with a one-way Anova test, followed by a non-parametric Kruskal Wallis test to analyze the variance by rank and the Dunn test to analyze

multiple comparisons. A student's t test was used to compare physiological data between irradiated and non-irradiated rats. Differences were considered statistically significant at a p value < 0.05.

### **3. Results**

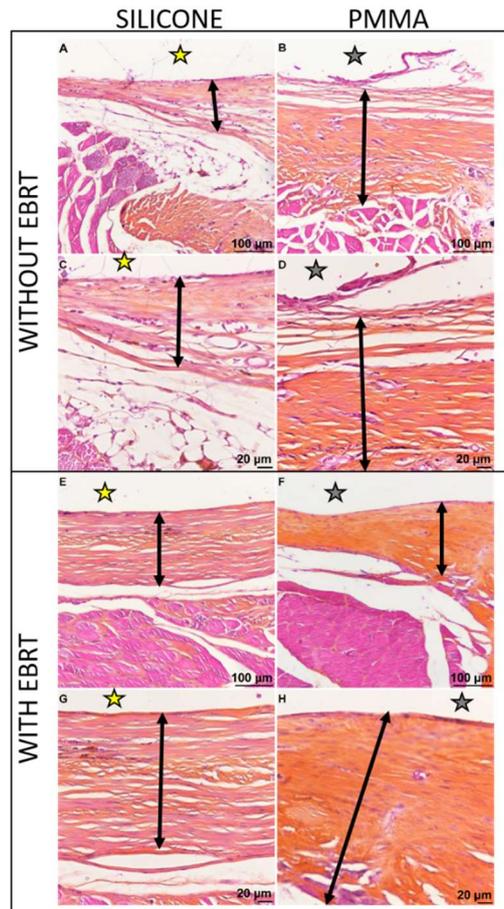
#### *Surgery and EBRT protocol tolerance*

The procedure was well tolerated by the rats and no infectious complications occurred during the postoperative course. The EBRT course was well tolerated: all rats gained weight. The average weight gain between surgery and euthanasia was 34.5 g [SD: 9.5 g]. However, their weight gain was significantly lower than that of non-irradiated rats ( $34.5\text{g} \pm 9.5$  vs  $64.1\text{g} \pm 14$ ;  $p < 0.05$ ). There were no severe acute side-effects at the irradiation sites but only a moderate and transient decrease in hair growth.

#### *Evaluation of IM architecture and thickness*

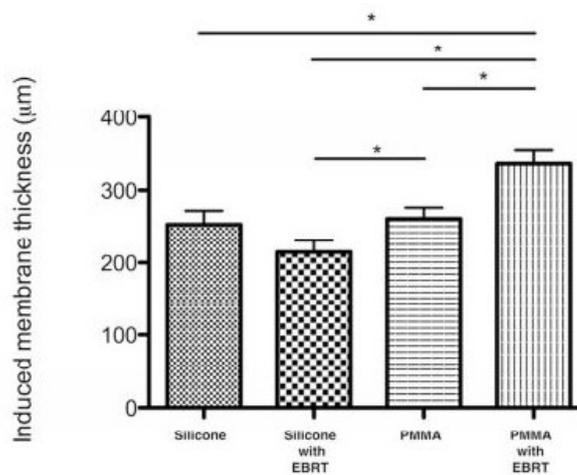
PMMA and silicone IM, irradiated or not, presented the same two-layer architecture (Figure 2). The inner superficial layer in contact with the spacer was organized in a few layers of cells. The outer deep layer was almost exclusively composed of collagen fibers stained yellow by saffron. The blood vessels were mainly situated in the outer layer of the IM.

Histomorphometric measurements of membrane thickness were performed for all study conditions (Figure 3). The thickness of silicone IM remained stable after irradiation. No influence of the spacer was seen for non-irradiated membranes produced in the osseous site. A direct significant effect of radiotherapy on membrane thickness was seen when comparing non-irradiated and irradiated PMMA-IM; the latter were significantly thicker ( $337.7 \pm 163.4$  nm) than the non-irradiated ones ( $261.2 \pm 138.5$  nm) ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2 : Hematoxylin eosin saffron staining.**

Typical histological aspect of membranes induced with silicone (yellow star) or PMMA spacer (grey star) with or without 5 weeks of external beam radiotherapy. Black arrow represents membrane thickness for each condition. Membrane has two layers: inner superficial layer in contact with spacer organized in a few layers of cells; outer deep layer almost exclusively composed of collagen fibers stained yellow by saffron. A B E F sections are shown at 10x magnification. C D G H sections are shown at 20x magnification.

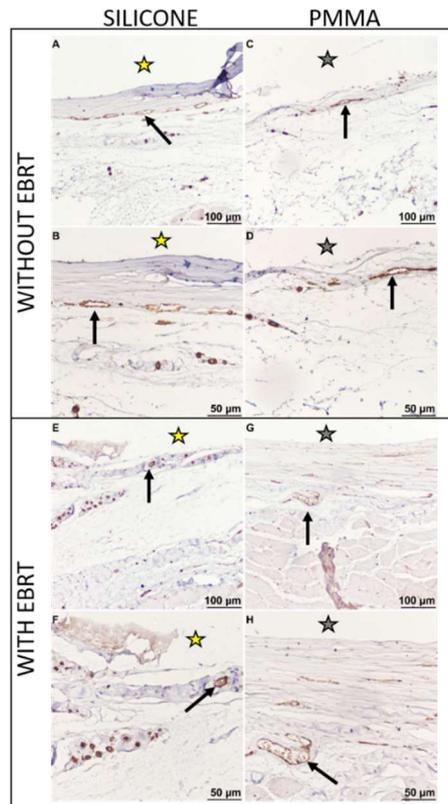


**Figure 3 : Thickness of induced membrane in different study conditions.**

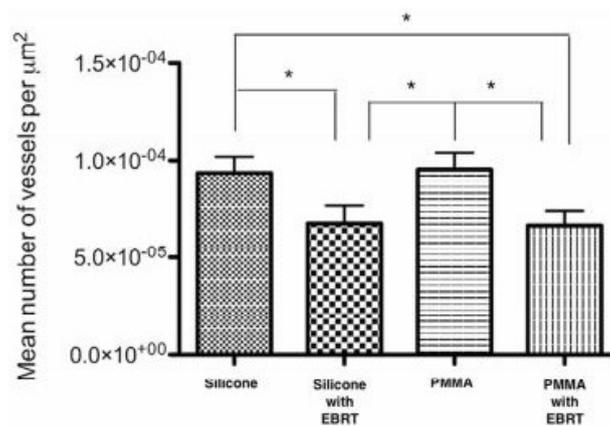
Significant differences represented with star. Difference considered significant at a p value < 0.05. (EBRT: External beam radiotherapy)

### Evaluation of IM vascularization

Blood vessels were found in each condition in the external layer of the IM (Figure 4). For both spacer types, the number of vessels per  $\mu\text{m}^2$  within the IM decreased significantly after EBRT (Figure 5). The number of vessels per  $\mu\text{m}^2$  remained unchanged in non-irradiated membrane groups.



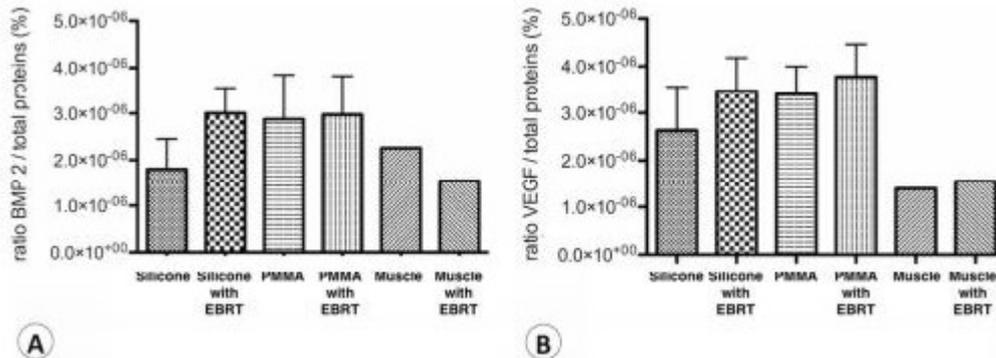
**Figure 4 : Representative images of histological sections marked with anti-CD31 antibodies;** counterstaining with Mayer's hematoxylin. Spacer site represented with yellow star (silicone spacer) or grey star (PMMA spacer). A C E G sections are shown at 10x magnification. B D F H sections are shown at 20x magnification. The blood vessels appear in brown color, an example of vessel is marked with an arrow in each section. (EBRT: External beam radiotherapy).



**Figure 5 : Mean number of vessels identified per  $\mu\text{m}^2$  in the different study conditions.** Significant differences represented with star. Difference considered significant at a p value < 0.05. (EBRT: External beam radiotherapy)

### BMP2 and VEGF quantification

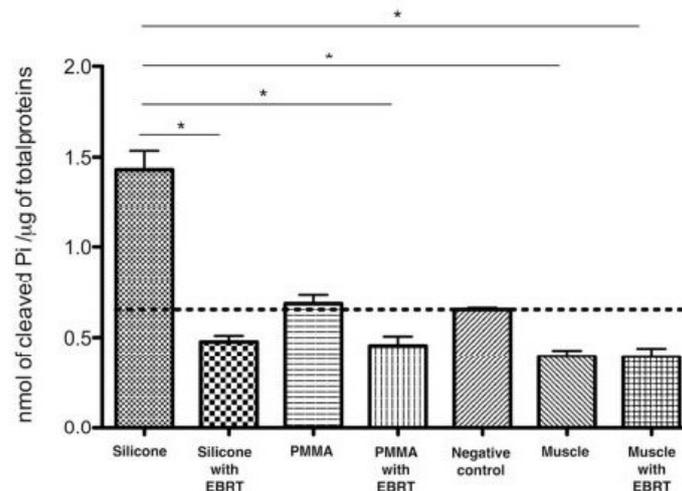
While BMP2 and VEGF expression were revealed in all membrane lysates, their concentrations were not significantly modified by the EBRT procedure or by the spacer type (Figure 6).



**Figure 6:** A: Comparison of BMP2/total protein ratios of the induced membranes in the different study conditions. B: Comparison of the VEGF/total ratios of the induced membranes in the different study conditions. No significant difference was found. (EBRT: External beam radiotherapy).

### Quantification of ALP activity in HMBSCs

Intracellular ALP activity of HMBSCs treated every day for 3 days with 100 µg of IM lysates was quantified in all groups. For both spacer types, EBRT significantly decreased the ALP activity of HMBSCs treated with the corresponding lysates. The influence of the spacer was observed only in silicone non-irradiated membranes. Lysates obtained from muscle irradiated or not were used as negative control (Figure 7).



**Figure 7 :** Intracellular alkaline phosphatase activity in cleaved inorganic phosphate (Pi) per µg of total protein from the induced membranes. Each histogram represents the alkaline phosphatase activity obtained from three different experiments. Each manipulation was performed on 4 induced membrane samples for one condition. Significant differences represented with star. Difference considered significant at a p value < 0.05. (EBRT: External beam radiotherapy)

#### 4. Discussion

The results suggest that EBRT did not modify the histological architecture of IM, whatever the spacer used. Vascular density within irradiated IM was significantly reduced. BMP2 and VEGF production seemed to be preserved despite EBRT.

One of the goals of this study was to replace PMMA as spacer material by silicone, which may be easier to handle and remove during the second step of the surgery, without damaging the IM and thus preserving its biological function. The results suggest that, as previously reported in an ectopic site (24), silicone spacers induce a pseudo-synovial membrane at osseous sites with quite similar characteristics to those induced by PMMA, the reference spacer. Thus, it may be possible to replace PMMA spacers by silicone spacers at osseous sites when using Masquelet's procedure. The procedure was well tolerated by the rats and no infectious complications occurred during the postoperative course. Despite the bilateral femoral defect, all rats were able to move around in the cages and seek food the day after the procedure. Both spacer types were also well tolerated. No difference was found concerning the macroscopic aspect of the induced membranes 11 weeks after spacer implantation. Unlike previously described protocols using PMMA spacers, we encountered difficulties in removing them (16,30,31). A larger incision and in some cases complementary osteotomies had to be performed to remove them, which led to a weakening of the membrane. Indeed, it would have been difficult to perform the complete two-step reconstruction with these membranes. On the other hand, the silicone spacers were easily removed in all cases with no adherence to the IM or to the bony ends (32).

No severe side-effect due to EBRT was observed, contrary to previous reports (33). Only a transient and completely reversible depilation was observed. The EBRT protocol (25 daily administrations of 2 Gy) was identical to that used in humans as an adjuvant therapy for head and neck squamous cell carcinomas. In fact, higher doses seem to be necessary to induce acute side effects in rats. Grade 1 or 2 epithelitis has been reported with a single administration of 30 to 45 Gy, which is similar to a 120 to 180 Gy dose in a multi-split administration protocol (34). Long-term side effects were not studied since all the rats were sacrificed at the eleventh week of the study.

Our finding of a microscopic organization of IM with an inner and an outer layer is similar to that previously described in rats and other species at a bone site (30). In our study, only the PMMA-IM with EBRT were significantly thicker and presented a more extensive inflammatory cell infiltrate. In a previous study at a subcutaneous site, PMMA-IM were thicker regardless of the condition of irradiation, suggesting more an acute foreign body reaction (24). These deleterious effects of EBRT on PMMA-IM may be related to the PMMA itself. When submitted to irradiation, PMMA has already shown its chemical stability but only with a single high dose (25 to 75 Gy) (35). In our study, PMMA spacers received an initial radiation dose for sterilization, and then a fractionated irradiation for 5 weeks during the EBRT procedure. These successive sessions of irradiation may have induced the release of unknown and potentially deleterious substances in the medium, as previously suggested by Qaradawi *et al.* concerning

physical alterations of PMMA when exposed to repeated EBRT sessions (36). On the contrary, silicone IM were not significantly different with or without EBRT, suggesting the good behavior of the spacer material at the irradiated bone site.

Besides the histological aspects observed in the membranes induced by the two spacer types, the vascularization of the membranes was also analyzed and quantified. Whatever the spacer or the EBRT treatment, all IM presented an extensive circumferential vascular network located mainly within the outer layer. EBRT did not modify this vascular pattern in the IM and there was no significant difference in IM vascularization regarding the spacer used in the same irradiation conditions. However, EBRT significantly decreased the number of blood vessels in the membranes induced by both spacer materials. It may be that EBRT downregulates angiogenesis when given during formation of the IM around the spacer. However, the level of VEGF, which plays an important role in angiogenesis, remained unchanged whatever the conditions.

The osteoinductive potential of IM remains a controversial issue. The production of BMP2 in IM has previously been demonstrated in animal models (16). In our study, BMP2 production in IM was also evidenced at week 11 after surgery, regardless of the condition. Other studies found that production of BMP2 was maximal four weeks after surgery but data after 6 weeks were not reported (10,17,37,38). Our data now show that BMP2 production is still present at week 11. However, the osteoinductive factors produced by IM seem to be insufficient to induce osteoblastic differentiation on HBMSCs. Indeed, when lysates of these membranes were added to cell culture media, the ALP activity of HBMSCs incubated in the presence of IM lysates was not significantly different from that of the negative control, whatever the spacer or EBRT procedure. IM with silicone spacers and without EBRT induced much higher ALP activity in HBMSCs than the other IM types. Medical-grade silicone has been shown to be able to induce a pseudo synovial type membrane (21), but its ability to induce osteo-differentiation has not previously been reported. This result needs to be confirmed by another study and might be of interest for a two-step bone reconstruction procedure using the IM technique when no EBRT is needed. Nevertheless, our data suggest that EBRT could have a negative effect on the osteoinductive properties of IM because ALP activity in HBMSCs was significantly decreased when treated with irradiated IM lysates in comparison to non-irradiated ones.

## 5. Conclusion

EBRT did not modify the histological properties of IMs with either spacer type but decreased their vascular density. VEGF and BMP2 production within IMs was not affected by irradiation. Silicone spacers are able to induce membranes with similar histological characteristics to PMMA-IM and may be used instead of PMMA but without EBRT.

### Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the Laboratory Animal Care Facility (Service Commun des Animaleries) for housing and taking care of the rats. The authors would like to thank the PRECI team (Villeneuve d'Ascq, France) for performing the irradiation procedure. This project was financed by the French foundation: "Fondation pour la Recherche Médicale"

### Bibliography

1. Hertel R, Gerber A, Schlegel U, Cordey J, Rügsegger P, Rahn BA. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report. *Injury*. **25 Suppl 1**, A59, 1994.
2. Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* **74**(3), 368, 1984.
3. Gerber A, Gogolewski S. Reconstruction of large segmental defects in the sheep tibia using polylactide membranes. A clinical and radiographic report. *Injury*. **33 Suppl 2**, B43, 2002.
4. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pfluger DH, Stoddart M, Masquelet AC, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury*. **40 Suppl 4**, S95, 2009.
5. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet.* **45**, 346, 2000.
6. Aparé T, Bigorre N, Cronier P, Duteille F, Bizot P, Massin P. Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing. *Orthop Traumatol Surg Res.* **96**, 549, 2010.
7. Karger C, Kishi T, Schneider L, Fitoussi F, Masquelet A-C, French Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (SoFCOT). Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop. Traumatol. Surg. Res. OTSR.* **98**(1), 97, 2012.
8. Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, Deminiere C, Siberchicot F, Fricain J-C. Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* [Internet]. **38**(12), 1289, 2009.
9. Jin F, Xie Y, Wang N, Qu X, Lu J, Hao Y, et al. Poor osteoinductive potential of subcutaneous bone cement-induced membranes for tissue engineered bone. *Connect. Tissue Res.* **54**(4-5), 283, 2013.
10. Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* [Internet]. 2013.
11. Viateau V, Guillemin G, Calando Y, Logeart D, Oudina K, Sedel L, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg.* **35**, 445, 2006.
12. Pelissier P, Lefevre Y, Delmond S, Villars F, Vilamitjana-Amedee J. [Influences of induced membranes on

- heterotopic bone formation within an osteo-inductive complex. Experimental study in rabbits]. *Ann Chir Plast Esthet.* **54**, 16, 2009.
13. Sorin T, Mansuy L, Colson T, Minetti C, Brix M, Simon E. [Ewing's sarcoma of the mandible in children: reconstruction by induced membrane]. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. Chir. Orale* [Internet]. **115**(5), 318, 2014.
  14. Liu H, Hu G, Shang P, Shen Y, Nie P, Peng L, et al. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop Traumatol Surg Res.* **99**, 959, 2013.
  15. Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, Brouillaud B, Renard M, Amedee J, et al. Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo. *J Orthop Res.* **27**, 155, 2009.
  16. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res.* **22**, 73, 2004.
  17. Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* [Internet]. 2014.
  18. Mégevand C, Pasche P, Jaques B. [Long-term complications of radiotherapy after mandibular reconstruction with vascularized bone graft]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* [Internet]. **Suppl 125**, 109S, 2000.
  19. Freund R, Wolff TW, Freund B. Silicone block interposition for traumatic bone loss. *Orthopedics* [Internet]. **23**(8), 795, 2000.
  20. Katznel EB, Koltz PF, Tierney R, Williams JP, Awad HA, O'Keefe RJ, et al. A novel animal model for studying silicone gel-related capsular contracture. *Plast. Reconstr. Surg.* [Internet]. **126**(5), 1483, 2010.
  21. Monje F, Mercuri L, Villanueva-Alcojol L, de Mera JJF. Synovial metaplasia found in tissue encapsulating a silicone spacer during 2-staged temporomandibular joint replacement for ankylosis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* [Internet]. **70**(10), 2290, 2012.
  22. Jacobson GM, Sause WT, Thomson JW, Plenk HP. Breast irradiation following silicone gel implants. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet]. **12**(5), 835, 1986.
  23. Ryu J, Yahalom J, Shank B, Chaglassian TA, McCormick B. Radiation therapy after breast augmentation or reconstruction in early or recurrent breast cancer. *Cancer* [Internet]. **66**(5), 844, 1990.
  24. de Monès E, Schlaubitz S, Oliveira H, d'Elbée J-M, Bareille R, Bourget C, et al. Comparative study of membranes induced by PMMA or silicone in rats, and influence of external radiotherapy. *Acta Biomater.* [Internet]. 2015.
  25. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* [Internet]. **4**(9), 529, 2003.
  26. Paris F. Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science* (80-. ). [Internet]. **293**(5528), 293, 2001.
  27. Hauer-Jensen M, Kong FM, Fink LM, Anscher MS. Circulating thrombomodulin during radiation therapy of lung cancer. *Radiat. Oncol. Investig.* [Internet]. **7**(4), 238, 1999.
  28. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* [Internet]. **33**(1), 99, 1995.
  29. Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* [Internet]. **29A**(9), 699, 1993.

30. Viateau V, Bensidhoum M, Guillemin G, Petite H, Hannouche D, Anagnostou F, et al. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop. Clin. North Am.* [Internet]. **41**(1), 49, 2010.
31. Lye KW, Tideman H, Wolke JCG, Merckx MAW, Chin FKC, Jansen JA. Biocompatibility and bone formation with porous modified PMMA in normal and irradiated mandibular tissue. *Clin. Oral Implants Res.* [Internet]. **24 Suppl A**, 100, 2013.
32. Schützenberger S, Kaipel M, Schultz A, Nau T, Redl H, Hausner T. Non-union site debridement increased the efficacy of rhBMP-2 in a rodent model. *Injury* [Internet]. **45**(8), 1165, 2014.
33. Collen EB, Mayer MN. Acute effects of radiation treatment: skin reactions. *Can. Vet. J.* [Internet]. Canadian Veterinary Medical Association; **47**(9), 931, 2006.
34. Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg.* **47**, 602, 2009.
35. Dogan DO, Ozguven Y, Karakus G, Sahin O, Polat NT, Yucel B, et al. The effects of therapeutic x-ray doses on mechanical, chemical and physical properties of poly methyl methacrylate. *Acta Odontol Scand.* **71**, 45, 2013.
36. Al-Qaradawi IY, Abdulmalik DA, Madi NK, Almaadeed M. Gamma irradiation effects on polymethyl methacrylate. *Phys. status solidi* [Internet]. **4**(10), 3727, 2007.
37. Gruber HE, Ode G, Hoelscher G, Ingram J, Bethea S, Bosse MJ. Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. *Bone Jt. Res.* [Internet]. **5**(4), 106, 2016.
38. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.* [Internet]. **22**(1), 73, 2004.

### C. Conclusion de l'Article 2

Grâce à ce second article, nous avons pu mettre en évidence les points suivants :

- Nous avons pu confirmer l'effet délétère de la radiothérapie sur la vascularisation de la membrane induite avec une diminution significative du nombre de vaisseaux au mm<sup>2</sup> observé suite au protocole de radiothérapie.
- Nous avons également pu comparer la membrane induite formée en présence du ciment chirurgical de référence, le PMMA, et en présence d'un autre conformateur, le silicone. Nous avons pu confirmer que le silicone, tout comme le PMMA avait la capacité d'induire la formation d'une membrane.
- D'un point de vue histologique, ces membranes, induites par les deux conformateurs différents, ne semblent pas modifiées par la radiothérapie. Les membranes présentent, quelque soit le conformateur, une structure organisée en deux couches : la couche externe étant principalement formée de collagène et la couche interne de plusieurs alignements de fibroblastes.
- De même, les sécrétions de facteurs de croissance (BMP2 et VEGF) libérés par la membrane ne sont pas modifiés significativement par la radiothérapie, quelque soit le conformateur utilisé.
- Enfin, les propriétés histologiques de la membrane induite formée par le silicone sont identiques à celles formées par le PMMA.

Ainsi, ce travail, a permis de montrer que le silicone pouvait également être utilisé comme conformateur. Cependant, bien que la manipulation de la membrane induite par le conformateur de référence, le PMMA, ne soit pas aisée, l'utilisation d'un autre type de conformateur, tel que le silicone, ne semble pas améliorer significativement les propriétés biologiques de cette membrane ni sa manipulation. Les travaux suivants seront poursuivis avec le PMMA comme conformateur.

En conclusion, les résultats obtenus dans cet **Article 2** nous ont permis :

- De mettre au point les différentes pratiques opératoires et la procédure de radiothérapie du site opéré chez le rat ;
- De définir l'influence de la radiothérapie sur les propriétés biologiques de la membrane induite en présence de deux conformateurs différents ;

- De confirmer l'utilisation du PMMA comme conformateur pour la réalisation du 1<sup>er</sup> temps opératoire.

Nous avons donc choisi de poursuivre ces études expérimentales avec ce même modèle animal et de procéder à la deuxième étape chirurgicale de cette technique : la reconstruction osseuse en sites irradiés à l'aide des nouvelles générations de matrices, dopées en strontium, développées dans la première partie de cette thèse.

#### D. Modèle de résection segmentaire de fémur chez le rat : reconstruction en territoires irradiés

##### Le modèle expérimental de reconstruction osseuse

Le développement d'un modèle de résection osseuse murin, tel qu'effectué dans ce travail de thèse, est un outil intéressant pour évaluer la fonctionnalité de produits d'ingénierie tissulaire et la reconstruction osseuse de lésions complexes et de taille critique, conduisant à un défaut de cicatrisation osseuse en l'absence de remplacement.

En absence de régénération osseuse, le tissu cicatriciel interposé entre les segments osseux non-unis est un tissu fibreux ou cartilagineux. En dehors de toute intervention chirurgicale, une telle situation n'évoluera jamais vers la restauration de la continuité osseuse : c'est la non-consolidation.

Les modèles de résection osseuse développés chez l'animal sont nombreux. S'ils ont permis de mieux comprendre la pathogénie et la physiopathologie des retards de consolidation ou des non-consolidations, ils permettent désormais d'évaluer la biofonctionnalité des matériaux de restauration osseuse.

La mise au point de modèles de résections segmentaires diaphysaires chez le rat n'est pas simple. La cicatrisation osseuse dans cette espèce est rapide et s'assortit d'une importante prolifération de tissu cartilagineux. Les résections osseuses effectuées chez cette espèce portent généralement sur le fémur. Les résections médio-diaphysaires de 5 à 8 mm de long, soit 20 à 25 % de la longueur de l'os, sont souvent stabilisées par des plaques d'ostéosynthèse.

Dans ce travail, et dans la continuité de l'**Article 2**, nous avons souhaité poursuivre par une étude de faisabilité afin de remplacer l'autogreffe utilisée dans la technique de Masquelet par la matrice composite mise au point dans la première partie de notre travail.

Le point clé de cette technique est la formation de la membrane induite, offrant des propriétés de protection et de bioactivité pour la survie des greffes osseuses.

L'**Article 2** a montré que la radiothérapie n'affectait pas significativement les propriétés biologiques de la membrane induite, quel que soit le conformateur utilisé, le PMMA ou le silicone, inséré dans la perte de substance osseuse.

La mise en place, au sein de la cavité de la membrane induite, d'une matrice composite ostéoinductrice et qui active la formation de néovaisseaux, pourrait permettre de s'affranchir de l'utilisation de l'autogreffe souvent supplémentée de facteurs ostéoinducteurs.

Les différentes étapes de cette étude expérimentale sont les suivantes, et reprennent le premier temps chirurgical décrit dans l'axe 2 :

- Mise au point du protocole chirurgical de la technique de Masquelet dans une lésion segmentaire chez le rat, comme décrit dans l'**Article 2**
- Retrait du conformateur de PMMA
- Implantation de la matrice composite de polysaccharides (dopée ou non en strontium) après irradiation
- Analyse des tissus néoformés par micro-CT et histologie

Les résultats obtenus ne sont que préliminaires. Toutes les implantations ont été effectuées et le traitement de radiothérapie a été réalisé pour cette 1<sup>ère</sup> étude, sur tous les groupes d'animaux, pour des raisons de disponibilité du laboratoire ONCOVET qui assure les procédures de radiothérapie. Le deuxième groupe de rats, non irradiés, est en cours d'étude.

### Matériels et méthodes

Le « Matériels et Méthodes » écrit en anglais est présenté dans l'**Annexe 4** en vu de la préparation de l'article correspondant.

Pour ce deuxième modèle expérimental, comme dans le cas du modèle du condyle fémoral chez le rat [87, 127], nous avons utilisé la matrice de polysaccharides supplémentée en particules d'HA (dopée ou non en strontium), sous forme de billes injectables de 250 à 500 µm [279].

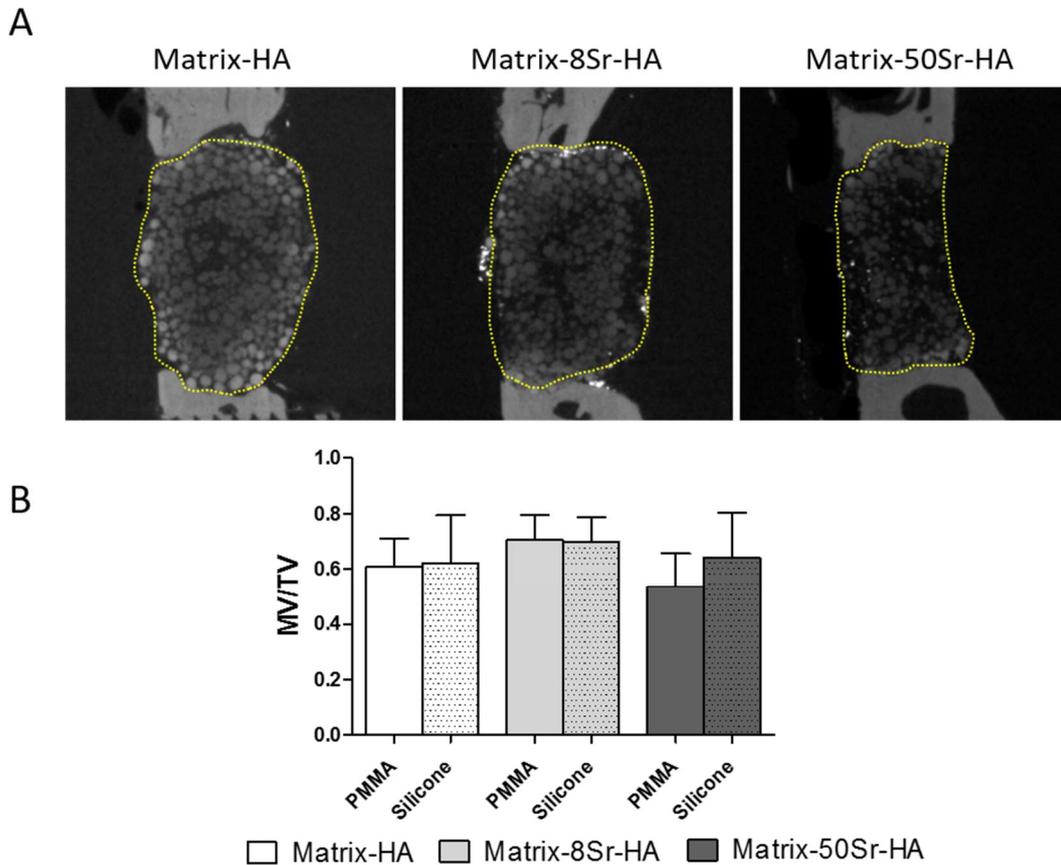
Les trois formulations suivantes sont sous forme de billes injectables de 250 à 500 µm

- Matrix-HA
- Matrix-8Sr-HA
- Matrix-50Sr-HA

ont été produites au sein de l'Unité Inserm 1148. Les particules d'hydroxyapatite ont été synthétisées en suivant le même protocole que celui décrit dans l'**Article 1**.

Résultats préliminaires obtenus sur les groupes d'animaux ayant subi une radiothérapie

Etude de la minéralisation osseuse par Micro-CT



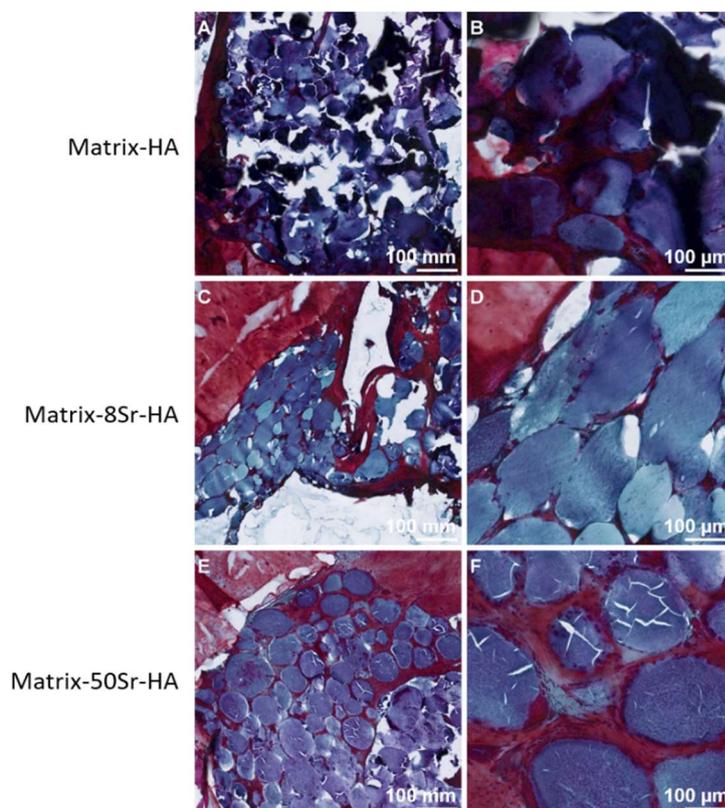
**FIGURE 1 : ANALYSES PAR MICRO-CT DES MATRICES DE HA CONTENANT DES PARTICULES DE HA DOPEES OU NON EN STRONTIUM**

Ces analyses ont été effectuées sur le groupe d'animaux ayant subi une radiothérapie. Les prélèvements de fémurs ont été réalisés 12 semaines après le deuxième temps chirurgical. (A) Photos représentatives des fémurs. Les lésions sont mises en évidence par les pointillés jaunes. (B) Analyse quantitative de volume de tissu minéralisé par rapport au volume total (MV/TV) après implantation. Huit échantillons ont été analysés pour chaque condition et pour chaque temps d'implantation. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique One Way ANOVA.

Les matrices contenant trois formulations différentes (non dopée, 8Sr-HA et 50Sr-HA) ont donc été implantées lors du deuxième temps opératoire de la technique de Masquelet, en remplacement de la greffe d'os autologue. Les animaux ont été sacrifiés 12 semaines après cette implantation.

L'analyse par micro-CT des explants (**Figure 45A**) n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les différentes conditions testées, contrairement aux observations que nous avons pu faire après l'implantation de ces matrices au niveau de lésions condyliques de rats (**Figure 45B**).

## Etude de la néoformation osseuse par histologie : résultats préliminaires



**FIGURE 2 : COLORATION AU TRICHROME DE MASSON DU TISSU NEOFORME AU SEIN DES DIFFERENTES MATRICES IMPLANTEES DANS LES LESIONS SEGMENTAIRES DE FEMURS DE RATS SOUMIS A UN TRAITEMENT DE RADIOTHERAPIE**

*Ces analyses ont été effectuées sur le groupe d'animaux ayant subi une radiothérapie. Les prélèvements de fémurs ont été réalisés 12 semaines après le deuxième temps chirurgical, puis décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes de 7-9 μm ont été réalisées puis colorées à l'aide du Trichrome de Masson*

L'observation des premières coupes colorées au Trichrome de Masson (**Figure 46**) permet de mettre en évidence la colonisation des billes par du tissu ostéoïde autour et entre les billes. A ce jour, l'absence d'analyses quantitatives du tissu ostéoïde formé ne permet pas de conclure. La coloration et l'analyse d'un nombre suffisant de coupes histologiques devraient permettre de conclure si une substitution de 50% de strontium (Matrix-50Sr-HA) permet de stimuler la formation de tissu ostéoïde.

### Perspectives

Les résultats obtenus sont considérés comme préliminaires, les analyses sur les animaux non irradiés étant en cours d'expérimentation. Ce groupe est actuellement dans la dernière phase de la procédure : les implantations des matrices composites dans la cavité laissée par le ciment ont été réalisées et les rats seront sacrifiés dans les semaines à venir.

Concernant la procédure de radiothérapie, réalisée entre les deux étapes chirurgicales, aucun effet secondaire n'a été observé mis à part une légère diminution de la pilosité au niveau de la zone irradiée.

A ce jour, et à partir de ce groupe d'animaux ayant subi un protocole de radiothérapie, les résultats obtenus avec les trois types de matrices, ne permettent pas de montrer un rôle positif du strontium dans la régénération osseuse de territoires irradiés. Aucune différence significative au niveau du MV/TV n'a été observée, que les matrices soient supplémentées ou non en strontium. Ces résultats devront être comparés à ceux obtenus dans les groupes contrôles non irradiés afin de voir l'incidence de la radiothérapie sur la régénération tissulaire.

Bien que qualitative, les premiers résultats histologiques démontrent après 12 semaines d'implantation, une formation importante de tissu ostéoïde entre et autour des billes de polysaccharides. Seule une analyse quantitative réalisée sur les deux groupes d'animaux nous permettra de conclure sur l'efficacité des matrices de polysaccharides, dopées ou non en strontium, à régénérer un site irradié. De même, une analyse quantitative de la néovascularisation osseuse devra être réalisée pour étudier un rôle éventuel du strontium dans la vascularisation du tissu néoformé après irradiation.

Cette étude réalisée dans un modèle d'implantation en site osseux et au niveau d'une lésion de taille critique chez le petit animal, devra être finalisée avant de poursuivre l'évaluation de ces matrices composites dans un modèle préclinique chez le mini-porc. Ce travail sera présenté en perspective dans la troisième partie de cette thèse.



# Troisième partie :

## Perspectives

**Etude de la performance des matrices de polysaccharides pour la reconstruction en territoires irradiés chez le mini-porc**

## A. Introduction

Cette troisième partie de thèse est consacrée à l'évaluation de la performance des matrices de polysaccharides dopées ou non en strontium dans des modèles de reconstructions osseuses selon la technique de Masquelet chez le gros animal [54] (**Figure 47**). De la même façon que pour le modèle chez le rat, un protocole de radiothérapie sera mis au point chez le mini-porc.



FIGURE 3 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA TROISIEME PARTIE

Ces essais sont actuellement en cours et pourraient conduire à la rédaction d'un article.

Ce modèle consiste en la mise au point d'une lésion osseuse segmentaire dans la mandibule chez le gros animal (modèle du mini-porc) pour mimer un contexte de traitement des cancers de la voie orale

Pour ce modèle, outre les étapes chirurgicales liées à la méthode décrite par Masquelet la procédure de radiothérapie chez le mini-porc devra être mise au point. Cette étape a été réalisée au sein d'ONCOVET, plateforme vétérinaire à Villeneuve d'Ascq.

## B. Choix du modèle expérimental

Concernant ce deuxième modèle expérimental, nous avons sélectionné le mini-porc, considéré, dans le domaine de la régénération tissulaire comme le plus proche de l'Homme (1, 2 à 1,5 mm de régénération osseuse/jour pour le porc et 1 à 1,5 mm/jour pour l'Homme) [228].

Ce modèle expérimental associé à une procédure de radiothérapie a été retenu pour se rapprocher au mieux du contexte clinique de la reconstruction osseuse après résection d'une tumeur de la voie orale. En effet, 500 000 cas de cancers des Voies AéroDigestives Supérieures (VADS) sont diagnostiqués au niveau mondial. En France, ces cancers représentent 17 000 cas par an. Leur traitement repose sur une association de chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Pour les tumeurs infiltrant la mandibule, la résection de celle-ci peut être partielle ou interruptrice et une reconstruction est indispensable. Le lambeau libre de péroné constitue la référence [50]. Cependant, tous les patients ne peuvent pas bénéficier de ce type de reconstruction en raison d'un terrain déjà trop fragile au niveau du site de prélèvement et / ou d'un trop gros déficit de vascularisation sur le site opéré, par exemple. La technique de reconstruction en deux temps décrite par Masquelet semble adaptée à la reconstruction mandibulaire dans ce contexte bien spécifique de la chirurgie carcinologique pour les raisons suivantes :

- Une reconstruction en deux temps permet d'attendre que le traitement par radiothérapie soit fini pour ensuite réaliser une reconstruction osseuse par greffe osseuse et/ou un biomatériau
- Une chirurgie proche de la muqueuse de la cavité buccale présente un risque de contamination du site opératoire en cas de brèche de la muqueuse : la membrane induite constitue une protection supplémentaire du greffon lors de sa mise en place
- La membrane induite apporte un support vascularisé nécessaire à la formation osseuse

Le but de ce modèle expérimental sera de démontrer l'efficacité des matrices composites de polysaccharides dopée en strontium, dans ce modèle préclinique pertinent de reconstruction mandibulaire après radiothérapie.

Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec le Dr De Monès, et le Dr Sagardoy, du Service d'Oto-Rhino-Laryngologie (ORL), spécialisé en Cancérologie, au sein du CHU Pellegrin de Bordeaux.

## Matériels et méthodes

Le « Matériels et Méthodes » écrit en anglais est présenté dans l'**Annexe 5** en vu de la préparation de l'article correspondant.

Concernant la mise en place de ce modèle expérimental : les infrastructures vétérinaires disponibles à Bordeaux ne nous ont pas permis de réaliser ces expérimentations et d'assurer le protocole de radiothérapie chez ces animaux. Nous avons donc dû faire appel à une infrastructure présente au sein du domaine universitaire de Lille, le DUHRE, qui permet d'héberger des mini-porcs. Par ailleurs, le Centre de Cancérologie Vétérinaire ONCOVET, à Villeneuve d'Ascq, permet également d'accueillir les gros animaux afin de réaliser des procédures d'irradiation.

La description détaillée des étapes chirurgicales chez le mini-porc est présentée dans l'Annexe 5 et reprise ci-dessous.

Brièvement, le protocole chirurgical de l'application de la technique de Masquelet à la résection mandibulaire de mini-porc est composé des étapes suivantes :

- **Avulsion dentaire** des molaires de l'animal sur 6 cm au niveau de la zone prévue de l'ostéotomie. Cette étape est réalisée afin d'éviter une communication avec l'intérieur de la bouche lors de l'ostéotomie ;
- Temps 1 de la technique de Masquelet : **ostéotomie** et mise en place du ciment chirurgical (PMMA) ;
- Protocole de **radiothérapie**. A ce jour, ce protocole n'a pu être réalisé sur aucun des animaux, compte tenu des aléas opératoires rencontrés sur les animaux non irradiés. En effet, nous souhaitons dans un premier temps valider la technique et réaliser nos animaux contrôles avant de mettre en place ce protocole ;
- Temps 2 de la technique de Masquelet : retrait du ciment et **comblement** de la cavité osseuse formée. Le comblement est réalisé en routine avec de l'os autologue prélevé au niveau de la crête iliaque du patient ;  
Nous avons réalisé cette même étape sur un mini-porc. Il s'agit de notre animal contrôle, permettant ainsi de valider le modèle. Nous avons par la suite remplacé la greffe d'os autologue par ces matrices de polysaccharides contenant du HA dopé ou non en strontium. Des animaux sont déjà en cours d'expérimentation pour réaliser cette étape ;
- **Sacrifice** de l'animal et étude histologique de la zone d'implantation.

### C. Résultats préliminaires

Ainsi, les différentes étapes des temps 1 et 2 sont illustrées par les **Figures 48** et **49**. La **Figure 48** qui présente l'étape de l'ostéotomie, la photo A représente la préparation de la zone d'incision, (B) montre la façon dont la peau du cochon est incisée. La photo C illustre la protection des voies d'abord, la photo D montre en blanc l'os de la mandibule. La plaque d'ostéosynthèse est ensuite positionnée (E), puis la zone d'ostéotomie est délimitée (F). La fraction d'os à retirer est découpée à la scie, et la zone de coupure est irriguée avec du sérum physiologique stérile (G et H). Le PMMA est ensuite préparé (I), puis placé dans la zone d'implantation (K). Cette zone aura au préalable été préparée : un film de silastic et deux fils de sutures ont été positionnés dans la cavité (J). Enfin, les deux fils de suture permettent une bonne fixation du ciment polymérisé à la plaque, pour un maintien optimal au niveau du défaut (L).

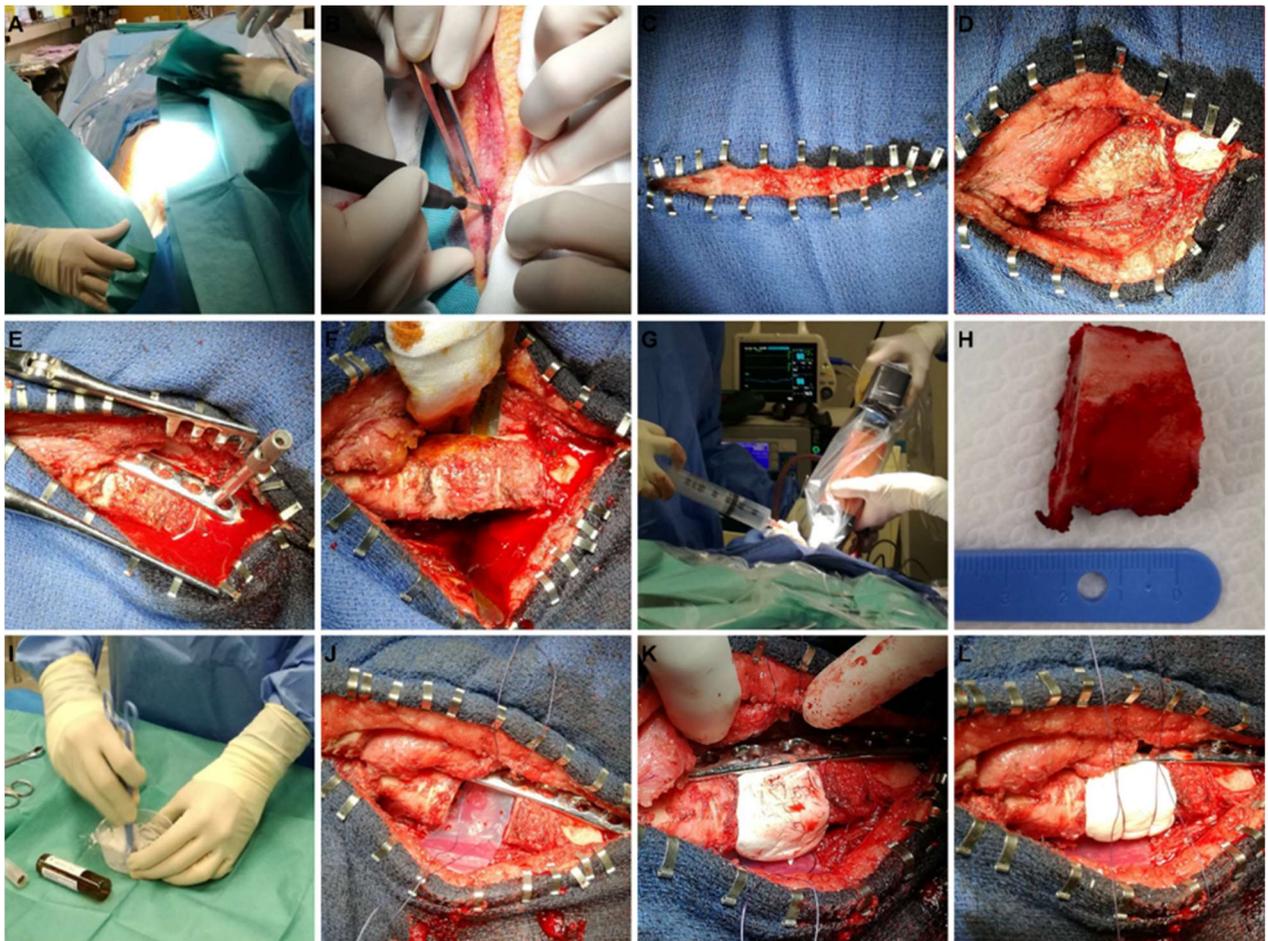
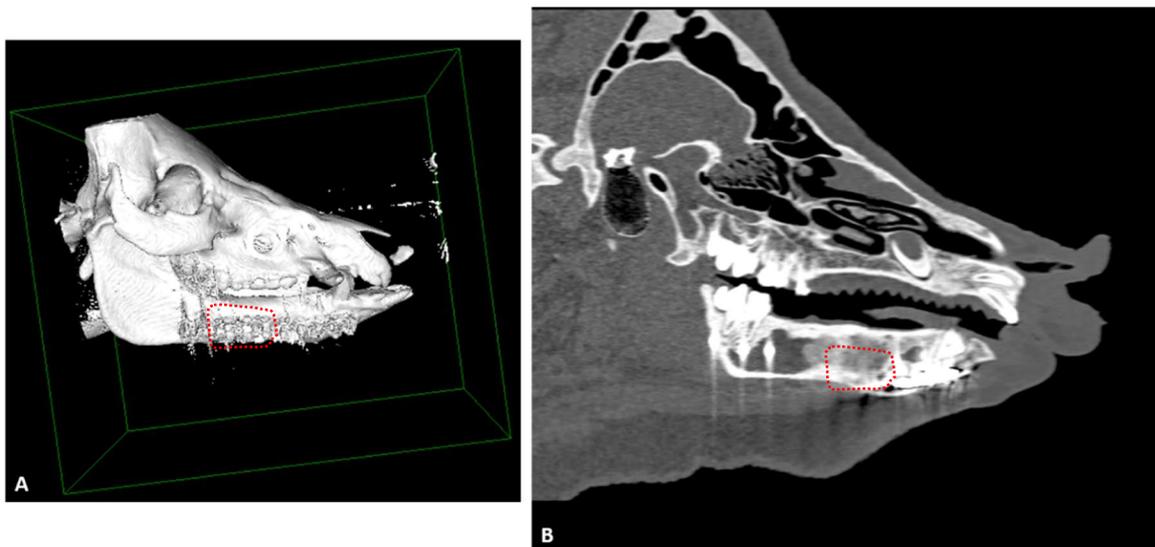


FIGURE 4 : DIFFERENTES ETAPES DE LA PREMIERE CHIRURGIE DE LA TECHNIQUE DE MASQUELET

La **Figure 49**, quant à elle, retrace les différentes étapes de la seconde partie de la technique de Masquelet : le prélèvement de la greffe d'os autologue afin de combler la cavité laissée par le ciment. La zone d'implantation est tout d'abord réouverte et le ciment est retiré. La présence d'une membrane autour du ciment est observée (A). L'os autologue est prélevé au niveau de la crête iliaque du cochon (B), puis cet os est déposé dans la cavité (C et D). Enfin, une fois la cavité complètement comblée (E), la membrane est suturée (F) avant la fermeture des berges.



**FIGURE 5 : DIFFERENTES ETAPES DE LA SECONDE CHIRURGIE DE LA TECHNIQUE DE MASQUELET**



**FIGURE 6 : RESULTATS DE L'IMPLANTATION DE L'OS AUTOLOGUE DANS UN DEFAUT SEGMENTAIRE DE MANDIBULE CHEZ LE MINI-PORC**

*Sur les deux photos, la zone d'implantation est délimitée par des pointillés rouges. (A) : Reconstruction 3D, réalisée au scanner, de la mandibule du mini-porc greffée avec de l'os autologue après 4 mois d'implantation (logiciel utilisé : Osirix®) ; (B) : Scanner de la mandibule du mini-porc avant reconstruction 3D.*

Les résultats préliminaires obtenus suite à la greffe d'os autologue chez le mini-porc nous montrent (**Figure 50**) une reconstruction totale du défaut après 4 mois d'implantation, nous permettant ainsi de valider ce modèle expérimental et de pouvoir initier les études avec les matrices composites de polysaccharides dopées en strontium et développées dans la première partie.

## D. Discussion

### *Problèmes rencontrés au cours des différentes étapes chirurgicales et solutions apportées*

A ce jour, seuls les résultats obtenus sur un seul animal ayant subi toutes les étapes chirurgicales de la technique de Masquelet et ayant reçu une autogreffe peuvent être présentés dans ce manuscrit.

Ce modèle expérimental reste extrêmement complexe et les premiers essais précliniques réalisés sur 6 animaux nous ont permis d'apporter des solutions aux difficultés rencontrées citées ci-après.

### Avulsion dentaire

Comme nous l'avons décrit brièvement dans le protocole expérimental, la première étape consiste en une avulsion des dents (molaires) de l'animal.

En effet, les étapes suivantes sont réalisées à partir de l'extérieur de la mâchoire de l'animal. Cependant, le cochon possède des dents avec des racines longues et profondes. Leur extraction n'a pas toujours été aisée (morceau de racine non extrait, ou dent cassée, par exemple). De plus, les animaux que nous utilisons sont relativement jeunes. Certains animaux opérés possédaient encore leurs dents de lait. Les premiers animaux opérés n'ont donc pas été correctement édentés, ce qui a eu pour conséquence principale une repousse des dents.

- Nous avons dû procéder à une avulsion dentaire plus poussée (curetage plus profond de l'os mandibulaire par exemple).

Nous nous sommes également rendu compte de l'importance de réaliser une bonne suture des gencives, afin d'éviter des infections et des abcès dans la zone de retrait des dents.

- Nous avons pour cela prêté une attention accrue à la fin de chaque intervention à l'état de la gencive, en vérifiant systématiquement la bouche et la bonne qualité des points de suture

### Ostéotomie

Au cours de cette étape, nous avons rencontré de nombreuses difficultés.

La première difficulté a été l'impossibilité d'opérer l'animal suite aux infections consécutives de l'avulsion dentaire.

La seconde difficulté rencontrée est liée à la faible épaisseur de la gencive chez le mini-porc. Il est donc aisé de perforer la gencive lors des différentes étapes de cette chirurgie. Cette perforation induit une communication avec la bouche, des infections bactériennes peuvent alors s'installer. Nous avons également constaté que la gencive pouvait être altérée lorsque nous implantions le PMMA. En effet, ce ciment polymérise *in situ* et de façon exothermique. La chaleur libérée peut endommager la gencive adjacente.

- Afin de diminuer au maximum les dégâts sur les tissus environnants, nous irriguons à présent le PMMA en cours de polymérisation avec de l'eau stérile glacée.

Nous avons également observé une communication avec l'intérieur de la bouche liée à l'implantation du PMMA. En effet, ce dernier, lorsqu'il polymérise devient très rigide. S'il est mal modelé avant sa polymérisation, il conservera cette forme, au risque de perforer les tissus environnants. C'est ce que nous avons pu constater au moment du retrait du ciment d'une des cavités. Le PMMA possédait des aspérités piquantes liées à un mauvais modelage pouvant causer une déchirure de la gencive.

- Nous avons donc décidé de modeler au mieux le PMMA, afin qu'il soit plus lisse au niveau de la partie en contact avec la gencive. C'est pour cette raison que nous plaçons un silastic entre la gencive et le PMMA le temps de la mise en place et de la polymérisation du ciment.
- Nous avons également décidé de mettre en place un lambeau de muscle platysma et de l'interposer entre la gencive et le PMMA lors des dernières interventions.

Les infections bactériennes font partie des risques associés à la chirurgie de la voie buccale. Nous les avons principalement observées lors de la deuxième étape de la technique, lors du retrait du conformateur et de la mise en place de la matrice ou de l'autogreffe. Ces infections sont souvent difficiles à détecter car le mini-porc continue de se comporter normalement (pas de perte d'appétit, pas de comportement agressif lié à la douleur). Un examen de l'intérieur de la bouche doit être réalisé sous anesthésie générale de l'animal et ne peut donc pas être réalisé quotidiennement. Concernant les multiples infections bactériennes que nous avons pu observer, dont certaines en absence de communication avec la bouche, nous pensons qu'elles proviennent également de germes d'origine cutanée.

- Nous avons donc décidé de mettre en place, lors des dernières opérations, des champs de bordures afin de limiter les contaminations du champ opératoire.

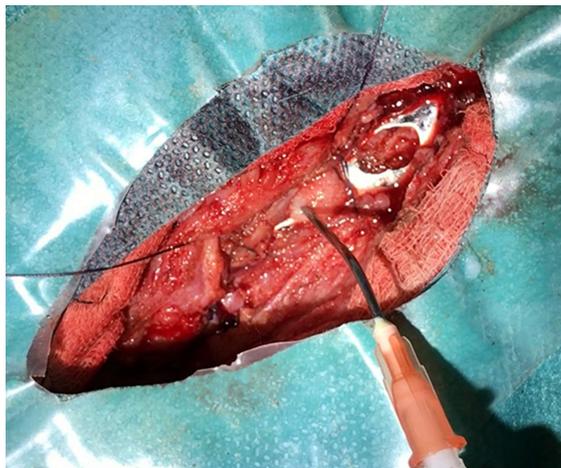
### Comblement de la cavité formée par la membrane induite

A partir des 6 mini-porcs utilisés pour la mise au point de ce modèle expérimental, nous avons pu effectuer deux types de comblement de la cavité formée par le conformateur après incision de la membrane induite et retrait de celui-ci :

- Mise en place de l'os autologue qui a donné les premiers résultats obtenus au scanner (**Figure 51**) ;
- Injection des billes de polysaccharides contenant de particules d'hydroxyapatite non dopée (Matrix-HA).

Malheureusement, les animaux ayant bénéficié de l'implantation de cette matrice n'ont pu être menés au bout de la procédure en raison de problèmes rencontrés cités précédemment.

Cependant, ce premier essai d'implantation de matrices sous forme de billes au sein de la cavité laissée par le PMMA, nous a permis d'évaluer le comportement du matériau lorsqu'il est injecté dans un défaut de large volume. Nous avons pu injecter de façon aisée ce matériau par un orifice entre la plaque d'ostéosynthèse et la membrane induite, une fois le ciment retiré (**Figure 51**).



**FIGURE 7 : COMPLEMENT DE LA CAVITE A L'AIDE DE LA MATRICE COMPOSITE DE HA SOUS FORME DE BILLES INJECTABLES DE 250 A 500  $\mu$ M DE DIAMETRE A L'AIDE D'UNE SERINGUE MUNIE D'UNE CANULE**

### E. Conclusions et perspectives

Ces données préliminaires ont permis de mettre en place le modèle expérimental chez le mini-porc et d'apporter les solutions nécessaires pour s'affranchir des difficultés rencontrées.

Quatre mini porcs ont à nouveau été opérés et sont actuellement entre l'étape 1 et l'étape 2 de la technique de Masquelet.

Les lésions mandibulaires vont être comblées avec la matrice sous forme de billes injectables dopées en strontium (Matrix-8Sr-HA et Matrix-50Sr-HA). La **Figure 52** reprend le calendrier des différentes étapes qui sont en cours sur les 4 animaux opérés



**FIGURE 8 : CALENDRIER DES OPERATIONS CHIRURGICALES PREVUES SUR LES 4 MINI-PORCS ACTUELLEMENT EN COURS**

Concernant le protocole de radiothérapie : nous souhaitons dans un premier temps mettre au point et valider cette technique de Masquelet appliquée au défaut segmentaire de mandibule chez le mini-porc, réaliser les expériences avec les matrices composites dopées en strontium avant d'initier la procédure de traitement par radiothérapie entre les deux étapes chirurgicales.

Les mini-porcs prévus après cette série de 4 implantations seront destinés à ce traitement.



# CONCLUSION GENERALE

Pour résumer, ce travail de thèse s'est axé autour de **trois parties**.

La **première partie** concerne la caractérisation et la mise au point d'une matrice composite de polysaccharides contenant des particules d'HA dopées ou non en strontium. Nous avons défini le meilleur rapport entre le contenu minéral (particules de HA) et le contenu en polysaccharides. Seules les études *in vivo* réalisées en site ectopique et hétérotopique (modèle de condyle fémoral chez le rat) ont permis de définir le meilleur taux de substitution en strontium capable d'activer à la fois la néoformation osseuse et la vascularisation. Cette formulation correspond à 30% (p/p) de particules d'hydroxyapatite présentant un taux de substitution en strontium de 50%.

La **seconde** et la **troisième partie** de ce travail ont porté sur l'utilisation de ces nouvelles générations de matrices dans le cadre de l'application de la technique de Masquelet pour la reconstruction en territoires irradiés. La reconstruction de sites irradiés reste extrêmement complexe. Seuls les produits d'ingénierie tissulaire combinant des matrices, une composante cellulaire et / ou des facteurs ostéogéniques, ont la capacité de reconstruire de tels sites où les difficultés majeures restent : la taille critique de ces lésions et les dommages des structures cellulaires, vasculaires et nerveuses, causés par la radiothérapie.

Démontrer les performances de ces matrices composites constitue un véritable défi dans le domaine de la médecine régénérative. La technique de Masquelet et la membrane induite constituent des outils méthodologiques pertinents pour évaluer la performance de ces matrices injectables. Malheureusement, les difficultés rencontrées pour la mise en place de ces modèles expérimentaux n'ont pas permis de finaliser ces études dans les temps impartis. Les infrastructures nécessaires à la mise en place de ces modèles sont également un frein pour la réalisation rapide de ces protocoles pré-cliniques.

Outre la finalisation des études expérimentales en cours chez le rat et le mini-porc, les perspectives de ce travail concernent les points suivants :

#### *Synthèse des particules d'hydroxyapatite dopées ou non en strontium*

Les particules d'HA, dopées ou non en strontium, ont été synthétisées suivant une méthode de précipitation en milieu aqueux, à une température de 90°C. Cette technique figure parmi un grand nombre de procédés permettant de réaliser la synthèse d'HA. Cependant, nous pourrions comparer d'autres méthodes de synthèse d'HA, telles que celles décrites par Sadat-Shojai *et al.* [2]. Cette revue met particulièrement en évidence l'influence du mode de synthèse sur la forme, la taille et la bioactivité des particules obtenues. Les propriétés des matrices contenant les particules d'HA pourraient être éventuellement améliorées avec des tailles, des formes différentes de ces particules. De même, le mode de dispersion de ces

particules, en essayant de réduire la formation de ces agrégats pourrait améliorer les propriétés biologiques de ces matrices composites. Enfin, il serait intéressant de déterminer plus finement la composition des échantillons d'HA synthétisés.

#### *Porosité de la matrice implantée en site ectopique*

Nous avons également mentionné dans l'introduction que la porosité des matériaux de substitution osseuse avait une grande importance pour permettre l'invasion tissulaire. En effet, lorsque les pores sont compris entre 100 et 350  $\mu\text{m}$ , la mise en place de la vascularisation, et la colonisation cellulaire du matériau est plus importante. Les matrices que nous avons implantées en site sous cutané possèdent des pores allant de 10 à 400  $\mu\text{m}$ . La porosité de ces matrices influence les propriétés mécaniques de ces matrices. Il en est de même pour sa dégradabilité. Obtenir un équilibre entre ces deux paramètres reste un défi difficile à relever. L'utilisation de billes de diamètre entre 250  $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$  a permis, en partie, de résoudre les problèmes d'invasion cellulaire puis tissulaire. Du tissu ostéoïde se forme au contact, autour et entre les billes, de la périphérie vers le centre de l'implant. Néanmoins, ces billes de polysaccharides sont toujours présentes après 8 semaines d'implantation dans le modèle de lésion du condyle fémoral. Il serait intéressant d'optimiser leur dégradation en jouant sur les étapes de réticulation de ces matrices.

#### *Diamètre des billes implantées en site orthotopique*

Dans ce travail, ainsi que dans les travaux précédents, nous avons choisi d'utiliser des billes allant de 250 à 500  $\mu\text{m}$ . Cependant, il serait intéressant de tester des billes de tailles inférieures et / ou supérieures à celles-ci, afin de voir si cela modifie la colonisation tissulaire du matériau. Nous avons déjà testé des billes dont la taille est comprise entre 100 et 300  $\mu\text{m}$  injectées au sein du défaut condyloaire de fémur de rats. Aucune différence en termes de volume de minéralisation n'a pu être observée, que ce soit en présence ou non de strontium.

#### *Choix des cellules utilisées pour l'étude in vitro et choix des gènes étudiés en qPCR*

Lors de la première partie de ce travail, nous avons choisi d'étudier l'effet de la présence du strontium sur l'expression des gènes spécifiques de la lignée ostéoblastique. Pour cela, nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses humaines ensemencées dans les matrices. Nous avons choisi de quantifier l'expression de deux gènes (runx2 et OPN) impliqués dans la différenciation ostéoblastique précoce et tardive induite par le strontium. Cependant, il aurait également été intéressant d'étudier des gènes tels que l'ostéocalcine, ou l'ALP.

Les réponses des cellules souches endothéliales humaines (EPCs) en présence de strontium auraient également pu être étudiées. En effet, le strontium est connu pour son double rôle dans l'ostéoblastogénèse et dans la promotion de l'angiogénèse. De ce fait, les expressions

des marqueurs spécifiques à l'angiogénèse tels que VEGF, le facteur vWF ou encore le CD31 pourraient être analysés [298, 299].

#### *Etude des voies de signalisation*

Un autre point important, auquel nous ne nous sommes pas intéressés au cours de ce travail, concerne les différentes voies de signalisation impliquées dans le mode d'action du strontium. En effet, il serait intéressant de mettre en évidence la ou les voies de signalisation activées par le strontium présent dans ces matrices. La voie du CaSR reste une cible de choix dans ce travail [197, 198] ainsi que les voies OPG/RANKL et la voie Wnt.

#### *Etude du relargage du strontium par les matrices*

En lien avec le paragraphe précédent, la cinétique de relargage de strontium fait également partie des points importants à explorer. *In vitro*, le relargage du strontium peut être étudié dans des solutions physiologiques, *in vivo*, son relargage reste plus difficile à appréhender.

#### *Choix du conformateur utilisé dans la technique de Masquelet*

Durant la seconde partie de ce travail, nous avons montré que le silicone pouvait être utilisé comme conformateur en remplacement du PMMA à la première étape de la technique de Masquelet. Cependant, bien que le silicone n'induisse pas de changements structuraux ni histologique de la membrane induite, il n'induit pas un bénéfice significatif en comparaison du PMMA en terme de facilité de manipulation, comme le laissait penser les études précédentes réalisées chez le rat en site ectopique [61]. Ainsi, pour les expériences *in vivo* suivantes, nous avons choisi de continuer à utiliser le PMMA, actuellement utilisé en routine clinique pour cette technique. Cela nous permet de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les données de la littérature.

#### *Protocole de radiothérapie et effet sur les propriétés biologiques de la membrane induite*

Nous avons pu observer que le traitement par radiothérapie des rats opérés n'avait pas d'effets secondaires sur ces animaux, mais réduisait significativement l'épaisseur de la membrane induite ainsi que sa vascularisation. A l'opposé, les quantités de BMP2 et de VEGF présentes dans les extraits protéiques de la membrane induite ne sont pas modifiées par la radiothérapie. En revanche, l'activité de la phosphatase alcaline des MSCs, en présence de ces extraits protéiques, est significativement plus faible en présence des extraits des membranes induites provenant de rats irradiés.

Les rats supportant bien les doses quotidiennes auxquelles ils ont été soumis, nous pourrions envisager d'augmenter ces doses de radiations afin de réduire le nombre de jours de traitement.

*En conclusion, ce travail ouvre d'importantes perspectives dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse et dans le développement de nouvelles matrices « prêtes à l'emploi » pour des applications en chirurgie orale et orthopédique.*

*Dès lors que ces essais précliniques auront été effectués du petit au gros animal, le transfert de cette nouvelle génération de matrices de polysaccharides pourra alors être proposé. La société SILTISS, qui produit actuellement ces matrices composites (non dopées en strontium), pourra prendre en charge son développement et sa production industrielle en conditions GMP, son étude de biocompatibilité et son transfert vers la clinique.*



# COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

## Publications

### **Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharidematerialiseffect on ectopic bone formation**

**C. Ehret**, R. Aid-Launais, T. Sagardoy, R Siadous, R. Bareille, S. Rey, S. Pechev, L. Etienne, J. Kalisky, E. de Mones, D. Letourneur, J. Amedee Vilamitjana

PLoS One. 2017 Sep 14;12(9):e0184663. doi: 10.1371/journal.pone.0184663

### **Influence of external radiotherapy on the properties of PMMA versus silicone induced membranes in a bilateral segmental bone defect in rats.**

**Ehret C.**, Sagardoy T., Bareille R., Benoit J., Amédée Vilamitjana J., De Mones E.

Tissue Eng Part A. 2017 Aug 29. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0095.

## Communications orales dans des congrès nationaux ou internationaux

2015	<p><b>Bioengineering of mandibular reconstruction in cancer surgery</b></p> <p><b>Ehret C.</b>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Fricain JC., De Mones E., Amedee J.</p> <p>Journée FR Tecsan - Bordeaux, Mai 2015</p>
2016	<p><b>Effect of a composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium on tissue mineralization formed in ectopic site</b></p> <p><b>Ehret C.</b></p> <p>French American Doctoral Exchange Seminar (FADEX) - Grenoble, Mars 2016 [Prix : bourse de mobilité]</p> <p><b>A composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium for bone tissue regeneration</b></p> <p><b>Ehret C.</b>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Fricain JC., De Mones E., Amedee J.</p> <p>Journée FR Tecsan - Bordeaux, Juin 2016</p>

	<p><b>A composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium for bone tissue regeneration</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., De Mones E., Amedee J.</p> <p>2<sup>ème</sup> Workshop of Regenerative Medecine – Bordeaux, Octobre 2016</p>
2017	<p><b>Impact of a Sr-doped hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Aid R., Sagardoy T., Siadous R., Bareille R., Rey S., Pechev S., Etienne L., Kalisky J., De Mones E., Letourneur D., Amedee J.</p> <p>Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM) – Lyon, Mai 2017</p> <p><b>A composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium for bone tissue regeneration</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., De Mones E., Amedee J.</p> <p>European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) – Davos, Juin 2017</p>

## Communications affichées dans des congrès nationaux ou internationaux

2015	<p><b>Bioengineering of mandibular reconstruction in cancer surgery</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Kalisky J., Aid R., Siadous R., Bareille R., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Amedee J.</p> <p>Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM) – Superbesse, Février 2015</p> <p>[Présentation « Flash »]</p> <p><b>Bioengineering of mandibular reconstruction in cancer surgery</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Fricain JC., De Mones E., Amedee J.</p> <p>Journée FR Tecsan - Bordeaux, Mai 2015</p> <p><b>Bioengineering of mandibular reconstruction in cancer surgery</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Fricain JC., De Mones E., Amedee J.</p> <p>European Society of Biomaterials (ESB) - Cracovie, Aout 2015</p> <p><b>Bioengineering of mandibular reconstruction in cancer surgery</b></p> <p><u>Ehret C.</u>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., Fricain JC., De Mones E., Amedee J.</p> <p>Colloque BIOMAT – Ile de Ré, Octobre 2016</p> <p>[Présentation « Flash »]</p>
------	--

2016	<p><b>A composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium for bone tissue regeneration</b></p> <p><b>Ehret C.</b>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Kalisky J., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., De Mones E., Amedee J.</p> <p>Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM) – Nancy, Juin 2016</p>
2016	<p><b>A composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium for bone tissue regeneration</b></p> <p><b>Ehret C.</b>, Sagardoy T., Aid R., Siadous R., Bareille R., Pechev S., Etienne L., Letourneur D., De Mones E., Amedee J.</p> <p>European Orthopedic Research Society (EORS) – Bologne, Septembre 2016</p> <p>[Présentation « Flash »]</p>
2016	<p><b>Effect of a composite matrix containing various ratios of hydroxyapatite doped with strontium on tissue mineralization formed in ectopic site</b></p> <p><b>Ehret C.</b>, Aid R., Kalisky J., Sagardoy T., Siadous R., Bareille R., Pechev S., Etienne L., Fricain JC., Letourneur D., Amedee J.</p> <p>World Biomaterials Congress (WBC) – Montréal, Mai 2016</p>
2017	<p><b>Impact of a Sr-doped hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration.</b></p> <p><b>C. Ehret</b>, R. Aid-Launais, T. Sagardoy, R Siadous, R. Bareille, S. Rey, S. Pechev, L. Etienne, J. Kalisky, E. de Mones, D. Letourneur, J. Amédée Vilamitjana*</p> <p>Journée FR Tecsan - Bordeaux, Juin 2017</p>

## Publications faisant suite au travail de :

### Master 1 (Unité U974 – Inserm, Paris)

#### **Cellular micro-environments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors.**

Bertrand AT, Ziaei S, **Ehret C**, Duchemin H, Mamchaoui K, Bigot A, Mayer M, Quijano-Roy S, Desguerre I, Lainé J, Ben Yaou R, Bonne G, Coirault C.

*J Cell Sci.* 2014 Jul 1;127(Pt 13):2873-84. doi: 10.1242/jcs.144907.

### Master 2 (Unité U1026 – Inserm, Bordeaux)

#### **Controlling stem cell behavior by fine-tuning the supramolecular assemblies of Low Molecular Weight Gelators.**

Latxague L, Ramin M, Appavoo A, **Ehret C**, Chassande O, Barthelemy P.

*Angew Chem Int Ed Engl.* 2015 Apr 7;54(15):4517-21. doi: 10.1002/anie.201409134.

**A new composite hydrogel combining the biological properties of collagen with the mechanical properties of supramolecular scaffold for bone tissue engineering**

Maisani M, Ziane S, **Ehret C**, Lesvesque L, Siadous R, Le Meins J-F, Chevalier P, Barthélémy P, De Oliveira H, Amédée J, Mantovani D, Chassande O.

*Accepté pour publication dans Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (25/08/2017)*



# BIBLIOGRAPHIE

1. Center, S.C. *Bone marrow*. 2014; Available from: <https://siteman.wustl.edu/glossary/cdr0000045622/>.
2. Sadat-Shojai, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(8): p. 7591-621.
3. Cooper, D.M., et al., *Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity*. *Calcif Tissue Int*, 2004. **74**(5): p. 437-47.
4. Barrère, F., *Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions*. *Materials Science and Engineering*, 2008.
5. Dallas, S.L., M. Prideaux, and L.F. Bonewald, *The osteocyte: an endocrine cell ... and more*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(5): p. 658-90.
6. Boskey, A.L., *Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects*. *Bonekey Rep*, 2013. **2**: p. 447.
7. Kular, J., et al., *An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level*. *Clin Biochem*, 2012. **45**(12): p. 863-73.
8. Lataillade, J.J., et al., *[Are stem cells as old as their niches? The quest for eternal life...]*. *Med Sci (Paris)*, 2010. **26**(6-7): p. 582-5.
9. Sugiyama, T. and T. Nagasawa, *Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012. **11**(3): p. 201-6.
10. Tamma, R. and D. Ribatti, *Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(1).
11. Recker, R., et al., *Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(10): p. 1628-33.
12. Li, G., et al., *Influence of age and gender on microarchitecture and bone remodeling in subchondral bone of the osteoarthritic femoral head*. *Bone*, 2015. **77**: p. 91-7.
13. Jevon, M., et al., *Gender- and age-related differences in osteoclast formation from circulating precursors*. *J Endocrinol*, 2002. **172**(3): p. 673-81.
14. Negishi-Koga, T. and H. Takayanagi, *Bone cell communication factors and Semaphorins*. *Bonekey Rep*, 2012. **1**: p. 183.
15. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(33): p. 25103-8.
16. Tang, D., et al., *Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration*. *Biomaterials*, 2016. **83**: p. 363-82.
17. Robling, A.G., T. Bellido, and C.H. Turner, *Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006. **6**(4): p. 354.
18. Heino, T.J., T.A. Hentunen, and H.K. Väänänen, *Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen*. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(1): p. 185-97.
19. Chen, X., et al., *Osteoblast-osteoclast interactions*. *Connect Tissue Res*, 2017: p. 1-9.
20. Marie, P.J., et al., *Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone*. *Calcif Tissue Int*, 2001. **69**(3): p. 121-9.
21. Marie, P.J., *Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption*. *Osteoporos Int*, 2005. **16 Suppl 1**: p. S7-10.
22. Saidak, Z. and P.J. Marie, *Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis*. *Pharmacol Ther*, 2012. **136**(2): p. 216-26.
23. Wittrant, Y., et al., *RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1704**(2): p. 49-57.
24. Kohli, S.S. and V.S. Kohli, *Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications*. *Indian J Endocrinol Metab*, 2011. **15**(3): p. 175-81.
25. Oryan, A., et al., *Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations*. *Biofactors*, 2014. **40**(5): p. 459-81.
26. Koch, H., J.A. Jadowiec, and P.G. Campbell, *Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2005. **14**(6): p. 621-31.
27. Chen, C.Y., et al., *Overexpression of Insulin-Like Growth Factor 1 Enhanced the Osteogenic Capability of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. *Theranostics*, 2017. **7**(6): p. 1598-1611.
28. Garg, P., et al., *Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts*. *Orthop Surg*, 2017. **9**(1): p. 13-19.
29. Crane, J.L., et al., *IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass*. *Bone Res*, 2013. **1**(2): p. 186-94.

30. Crane, J.L. and X. Cao, *Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling*. J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 466-72.
31. Tondreau, T., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation*. Differentiation, 2004. **72**(7): p. 319-26.
32. Cheng, H., et al., *Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A**(8): p. 1544-52.
33. Gautschi, O.P., S.P. Frey, and R. Zellweger, *Bone morphogenetic proteins in clinical applications*. ANZ J Surg, 2007. **77**(8): p. 626-31.
34. Govender, S., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(12): p. 2123-34.
35. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3318-25.
36. Feng, X. and J.M. McDonald, *Disorders of bone remodeling*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 121-45.
37. Singer, F.R., *Bone Quality in Paget's Disease of Bone*. Curr Osteoporos Rep, 2016. **14**(2): p. 39-42.
38. Jimi, E., et al., *The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects*. Int J Dent, 2012. **2012**: p. 148261.
39. Guerado, E. and E. Caso, *Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients*. World J Orthop, 2017. **8**(2): p. 87-98.
40. Pacifici, L., et al., *Metals used in maxillofacial surgery*. Oral Implantol (Rome), 2016. **9**(Suppl 1/2016 to N 4/2016): p. 107-111.
41. García-Gareta, E., M.J. Coathup, and G.W. Blunn, *Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration*. Bone, 2015. **81**: p. 112-21.
42. Cole, B.J.M., T.R.M. Carter, and S.A.M. Rodeo, *Allograft Meniscal Transplantation : Background, Techniques, and Results*. Journal of Bone & Joint Surgery, 2002. **Volume 84**.
43. Chim, H., et al., *Reconstruction of mandibular defects*. Semin Plast Surg, 2010. **24**(2): p. 188-97.
44. Taylor, G.I., R.J. Corlett, and M.W. Ashton, *The Evolution of Free Vascularized Bone Transfer: A 40-Year Experience*. Plast Reconstr Surg, 2016. **137**(4): p. 1292-305.
45. Okoturo, E., *Non-vascularised iliac crest bone graft for immediate reconstruction of lateral mandibular defect*. Oral Maxillofac Surg, 2016. **20**(4): p. 425-429.
46. Taylor, G.I., G.D. Miller, and F.J. Ham, *The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques*. Plast Reconstr Surg, 1975. **55**(5): p. 533-44.
47. Hidalgo, D.A., *Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction*. Plast Reconstr Surg, 1989. **84**(1): p. 71-9.
48. Zhang, C., et al., *Microsurgical free flap reconstructions of the head and neck region: Shanghai experience of 34 years and 4640 flaps*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2015. **44**(6): p. 675-84.
49. Bak, M., et al., *Contemporary reconstruction of the mandible*. Oral Oncol, 2010. **46**(2): p. 71-6.
50. Almubarak, S., et al., *Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration*. Bone, 2016. **83**: p. 197-209.
51. Kumar, B.P., et al., *Mandibular Reconstruction: Overview*. J Maxillofac Oral Surg, 2016. **15**(4): p. 425-441.
52. Frost, H.M., *A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians*. Angle Orthod, 2004. **74**(1): p. 3-15.
53. Spiegelberg, B., et al., *Ilizarov principles of deformity correction*. Ann R Coll Surg Engl, 2010. **92**(2): p. 101-5.
54. Masquelet, A.C., et al., *[Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]*. Ann Chir Plast Esthet, 2000. **45**(3): p. 346-53.
55. Trials, C.; Available from: <https://clinicaltrials.gov/>.
56. Pelissier, P., et al., *Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration*. J Orthop Res, 2004. **22**(1): p. 73-9.
57. Giannoudis, P.V., et al., *Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions*. Injury, 2011. **42**(6): p. 591-8.
58. Olesen, U.K., et al., *The Masquelet technique of induced membrane for healing of bone defects. A review of 8 cases*. Injury, 2015. **46 Suppl 8**: p. S44-7.

59. Nau, C., et al., *Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur*. Injury, 2016. **47**(2): p. 325-34.
60. Bosemark, P., H. Isaksson, and M. Tägil, *Influence of systemic bisphosphonate treatment on mechanical properties of BMP-induced calluses in a rat fracture model: comparison of three-point bending and twisting test*. J Orthop Res, 2014. **32**(5): p. 721-6.
61. de Monès, E., et al., *Comparative study of membranes induced by PMMA or silicone in rats, and influence of external radiotherapy*. Acta Biomater, 2015. **19**: p. 119-27.
62. Jia, D., et al., *Rapid loss of bone mass and strength in mice after abdominal irradiation*. Radiat Res, 2011. **176**(5): p. 624-35.
63. Franklyn, W.D., *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England*. Vol. Volume 4. 1987.
64. Costello, B.J., P. Kumta, and C.S. Sfeir, *Regenerative Technologies for Craniomaxillofacial Surgery*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. **73**(12 Suppl): p. S116-25.
65. Konopnicki, S. and M.J. Troulis, *Mandibular Tissue Engineering: Past, Present, Future*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. **73**(12 Suppl): p. S136-46.
66. Fernandez-Yague, M.A., et al., *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomaterial strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **84**: p. 1-29.
67. Research, G.V. *Bone Graft And Substitutes Market Worth \$3.6 Billion By 2024*. 2016; Available from: <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-bone-grafts-substitutes-market>.
68. Woodard, J.R., et al., *The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity*. Biomaterials, 2007. **28**(1): p. 45-54.
69. Bai, F., et al., *The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(12): p. 3791-803.
70. Xiao, X., et al., *The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9409.
71. Malhotra, A. and P. Habibovic, *Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration*. Trends Biotechnol, 2016. **34**(12): p. 983-992.
72. Swetha, M., et al., *Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering*. Int J Biol Macromol, 2010. **47**(1): p. 1-4.
73. Vestermark, M.T., *Strontium in the bone-implant interface*. Dan Med Bull, 2011. **58**(5): p. B4286.
74. Wang, Y., et al., *The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite*. Nat Mater, 2012. **11**(8): p. 724-33.
75. Oliveira, S.M., et al., *An improved collagen scaffold for skeletal regeneration*. J Biomed Mater Res A, 2010. **94**(2): p. 371-9.
76. Yunus Basha, R., T.S. Sampath Kumar, and M. Doble, *Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **57**: p. 452-63.
77. Ezoddini-Ardakani, F., et al., *Histologic evaluation of chitosan as an accelerator of bone regeneration in microdrilled rat tibias*. Dent Res J (Isfahan), 2012. **9**(6): p. 694-9.
78. Chatelet, C., O. Damour, and A. Domard, *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films*. Biomaterials, 2001. **22**(3): p. 261-8.
79. Singh, R.S., et al., *Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering*. Carbohydr Polym, 2016. **153**: p. 455-62.
80. Aydogdu, H., et al., *Pullulan microcarriers for bone tissue regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **63**: p. 439-49.
81. Autissier, A., D. Letourneur, and C. Le Visage, *Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture*. J Biomed Mater Res A, 2007. **82**(2): p. 336-42.
82. Cheng, K.C., A. Demirci, and J.M. Catchmark, *Pullulan: biosynthesis, production, and applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **92**(1): p. 29-44.
83. Huh, M.S., et al., *Polysaccharide-based Nanoparticles for Gene Delivery*. Top Curr Chem (J), 2017. **375**(2): p. 31.
84. Nelson, V.J., et al., *A chitosan/dextran-based hydrogel as a delivery vehicle of human bone-marrow derived mesenchymal stem cells*. Biomed Mater, 2017. **12**(3): p. 035012.
85. Chaouat, M., et al., *The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5546-53.

86. Frasca, S., et al., *Calcium-phosphate ceramics and polysaccharide-based hydrogel scaffolds combined with mesenchymal stem cell differently support bone repair in rats*. J Mater Sci Mater Med, 2017. **28**(2): p. 35.
87. Ribot, E.J., et al., *3D anatomical and perfusion MRI for longitudinal evaluation of biomaterials for bone regeneration of femoral bone defect in rats*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6100.
88. Shrivats, A.R., M.C. McDermott, and J.O. Hollinger, *Bone tissue engineering: state of the union*. Drug Discov Today, 2014. **19**(6): p. 781-6.
89. Lorenzo, A.C. and E.R. Caffarena, *Elastic properties, Young's modulus determination and structural stability of the tropocollagen molecule: a computational study by steered molecular dynamics*. J Biomech, 2005. **38**(7): p. 1527-33.
90. Liu, Y., J. Lim, and S.H. Teoh, *Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering*. Biotechnol Adv, 2013. **31**(5): p. 688-705.
91. Henkel, J., et al., *Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective*. Bone Res, 2013. **1**(3): p. 216-48.
92. Mondal, D., M. Griffith, and S.S. Venkatraman, *Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery : current scenario and challenges*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2016. **65**(5): p. 255-265.
93. Williams, J.M., et al., *Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering*. Biomaterials, 2005. **26**(23): p. 4817-27.
94. Makarov, C., et al., *In situ synthesis of calcium phosphate-polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(6): p. 1771-9.
95. Ghanaati, S., et al., *Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts*. J Tissue Eng Regen Med, 2011. **5**(6): p. e136-43.
96. Konopnicki, S., et al., *Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed  $\beta$ -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: an in vivo pilot study in a porcine mandible model*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. **73**(5): p. 1016.e1-1016.e11.
97. Zhang, W., et al., *Effects of strontium in modified biomaterials*. Acta Biomater, 2011. **7**(2): p. 800-8.
98. Autefage, H., *Rôle ostéoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphate de calcium biphasique*, in *Sciences de la matière*. 2010, Université Toulouse 3 Paul Sabatier. p. 204.
99. Samavedi, S., A.R. Whittington, and A.S. Goldstein, *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8037-45.
100. Sun, L., et al., *Independent effects of the chemical and microstructural surface properties of polymer/ceramic composites on proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs*. Acta Biomater, 2016. **42**: p. 364-77.
101. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, 2005. **36** Suppl 3: p. S20-7.
102. Autefage, H., et al., *Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate porous ceramics*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(2): p. 706-15.
103. Cazalbou, S., et al., *Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo*. J Bone Miner Metab, 2004. **22**(4): p. 310-7.
104. San Miguel, B., et al., *Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2010. **94**(4): p. 1023-33.
105. Silva, A.R., et al., *Synergistic effect between bioactive glass foam and a perfusion bioreactor on osteogenic differentiation of human adipose stem cells*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(3): p. 818-27.
106. Baino, F., G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, *Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering*. Front Bioeng Biotechnol, 2015. **3**: p. 202.
107. Hench, L.L., et al., *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. Journal of Biomedical Materials Research, 1971. **Volume 5, Issue 6**: p. 117-141.
108. Krishnan, V. and T. Lakshmi, *Bioglass: A novel biocompatible innovation*. J Adv Pharm Technol Res, 2013. **4**(2): p. 78-83.
109. Niinomi, M., et al., *Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone*. Regen Biomater, 2016. **3**(3): p. 173-85.

110. Amin Yavari, S., et al., *Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium*. *Biomaterials*, 2014. **35**(24): p. 6172-81.
111. Matassi, F., et al., *Porous metal for orthopedics implants*. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2013. **10**(2): p. 111-5.
112. Carradò, A., et al., *Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteointegration*. *Dent Mater*, 2017. **33**(3): p. 321-332.
113. Dupret-Bories, A., et al., *Development of surgical protocol for implantation of tracheal prostheses in sheep*. *J Rehabil Res Dev*, 2011. **48**(7): p. 851-64.
114. Vrana, N.E., et al., *Titanium microbead-based porous implants: bead size controls cell response and host integration*. *Adv Healthc Mater*, 2014. **3**(1): p. 79-87.
115. Ryan, G., A. Pandit, and D.P. Apatsidis, *Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications*. *Biomaterials*, 2006. **27**(13): p. 2651-70.
116. Li, J.P., et al., *Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition*. *Biomaterials*, 2007. **28**(18): p. 2810-20.
117. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. *Trends Biotechnol*, 2012. **30**(10): p. 546-54.
118. Lee, K.Y., E. Alsberg, and D.J. Mooney, *Degradable and injectable poly(aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering*. *J Biomed Mater Res*, 2001. **56**(2): p. 228-33.
119. Drury, J.L. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4337-51.
120. Fellah, B.H., et al., *Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute*. *J Orthop Res*, 2006. **24**(4): p. 628-35.
121. Daculsi, G., et al., *Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels*. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. **21**(3): p. 855-61.
122. Maisani, M., et al., *Cellularizing hydrogel-based scaffolds to repair bone tissue: How to create a physiologically relevant micro-environment?* *J Tissue Eng*, 2017. **8**: p. 2041731417712073.
123. Schardosim, M., et al., *Freeze-casting for PLGA/carbonated apatite composite scaffolds: Structure and properties*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017. **77**: p. 731-738.
124. Venkatesan, J. and S.K. Kim, *Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review*. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. **10**(10): p. 3124-40.
125. Danoux, C.B., et al., *Elucidating the individual effects of calcium and phosphate ions on hMSCs by using composite materials*. *Acta Biomater*, 2015. **17**: p. 1-15.
126. Fricain, J.C., et al., *A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2013. **34**(12): p. 2947-59.
127. Schlaubitz, S., et al., *Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e110251.
128. Vyas, V., T. Kaur, and A. Thirugnanam, *Chitosan composite three dimensional macrospheric scaffolds for bone tissue engineering*. *Int J Biol Macromol*, 2017.
129. Fritz, M., et al., *Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates*. *Nature*, 1994. **371**(6492): p. 49-51.
130. Kang, H.-W., et al., *A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity*. *Nat Biotech*, 2016. **34**(3): p. 312-319.
131. NIH. *Regenerative Medicine Program*. 2017; Available from: <https://commonfund.nih.gov/stemcells>.
132. Hao, Z., et al., *The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering*. *Biomater Sci*, 2017.
133. Rosset, P., F. Deschaseaux, and P. Layrolle, *Cell therapy for bone repair*. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2014. **100**(1 Suppl): p. S107-12.
134. Watanabe, Y., et al., *Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects?* *Injury*, 2016. **47 Suppl 1**: p. S47-51.
135. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. *Crit Rev Biomed Eng*, 2012. **40**(5): p. 363-408.
136. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
137. Bastami, F., et al., *Induced pluripotent stem cells as a new getaway for bone tissue engineering: A systematic review*. *Cell Prolif*, 2017. **50**(2).

138. Sheyn, D., et al., *Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate Into Functional Mesenchymal Stem Cells and Repair Bone Defects*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(11): p. 1447-1460.
139. Mathilde, G. and INSERM. *Cellules pluripotentes induites (IPS)*. 2013; Available from: <https://www.inserm.fr/thematiques/biologie-cellulaire-developpement-et-evolution/dossiers-d-information/cellules-pluripotentes-induites-ips>.
140. Grayson, W.L., et al., *Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(3): p. 140-50.
141. Pytlík, R., et al., *Efficacy and safety of human mesenchymal stromal cells in healing of critical-size bone defects in immunodeficient rats*. Physiol Res, 2017. **66**(1): p. 113-123.
142. Soltanoff, C.S., et al., *Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(1): p. 1-46.
143. Stanovici, J., et al., *Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery*. Curr Res Transl Med, 2016. **64**(2): p. 83-90.
144. Tirino, V., et al., *Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells*. Methods Mol Biol, 2012. **879**: p. 443-63.
145. Paino, F., et al., *Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(8): p. 699-713.
146. Aksel, H. and G.T. Huang, *Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro*. J Endod, 2017. **43**(6): p. 930-935.
147. Wongsupa, N., et al., *Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly( $\epsilon$ -caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects*. J Mater Sci Mater Med, 2017. **28**(5): p. 77.
148. Zajdel, A., et al., *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord*. Acta Biochim Pol, 2017. **64**(2): p. 365-369.
149. Fennema, E.M., et al., *Ectopic bone formation by aggregated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study*. J Tissue Eng Regen Med, 2017.
150. Scherberich, A., et al., *Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts*. J Cell Physiol, 2010. **225**(2): p. 348-53.
151. Saxer, F., et al., *Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study*. Stem Cells, 2016. **34**(12): p. 2956-2966.
152. Monsarrat, P., et al., *An Innovative, Comprehensive Mapping and Multiscale Analysis of Registered Trials for Stem Cell-Based Regenerative Medicine*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(6): p. 826-35.
153. Filipowska, J., et al., *The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning*. Angiogenesis, 2017. **20**(3): p. 291-302.
154. TRUETA, J. and J.D. MORGAN, *The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method*. J Bone Joint Surg Br, 1960. **42-B**: p. 97-109.
155. BROOKES, M., *CORTICAL VASCULARIZATION AND GROWTH IN FOETAL TUBULAR BONES*. J Anat, 1963. **97**: p. 597-609.
156. Thompson, T.J., P.D. Owens, and D.J. Wilson, *Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo*. J Anat, 1989. **166**: p. 55-65.
157. Marenzana, M. and T.R. Arnett, *The Key Role of the Blood Supply to Bone*. Bone Res, 2013. **1**(3): p. 203-15.
158. Stegen, S., N. van Gastel, and G. Carmeliet, *Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration*. Bone, 2015. **70**: p. 19-27.
159. Laschke, M.W. and M.D. Menger, *Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions*. Biotechnol Adv, 2016. **34**(2): p. 112-21.
160. Guerrero, J., *Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement tridimensionnel : application à l'ingénierie du tissu osseux*, in *Biologie Cellulaire*. 2014, Université de Bordeaux. p. 208.
161. Fedorovich, N.E., et al., *The role of endothelial progenitor cells in prevascularized bone tissue engineering: development of heterogeneous constructs*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(7): p. 2355-67.
162. Grellier, M., et al., *Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells*. J Cell Biochem, 2009. **106**(3): p. 390-8.

163. Guerrero, J., et al., *The use of total human bone marrow fraction in a direct three-dimensional expansion approach for bone tissue engineering applications: focus on angiogenesis and osteogenesis*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(5-6): p. 861-74.
164. Fu, W.L., et al., *Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(5-6): p. 948-59.
165. Yeatts, A.B. and J.P. Fisher, *Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress*. Bone, 2011. **48**(2): p. 171-81.
166. Sladkova, M. and G.M. de Peppo, *Bioreactor Systems for Human Bone Tissue Engineering. Processes*, 2014. **2**: p. 494-525.
167. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
168. Schorn, L., et al., *Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF*. Head Face Med, 2017. **13**(1): p. 11.
169. Begam, H., et al., *Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **70**(Pt 1): p. 856-869.
170. Kargozar, S., et al., *Acceleration of bone regeneration in bioactive glass/gelatin composite scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells over-expressing bone morphogenetic protein-7*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **75**: p. 688-698.
171. Gothard, D., et al., *Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man*. Eur Cell Mater, 2014. **28**: p. 166-207; discussion 207-8.
172. James, A.W., et al., *A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2*. Tissue Eng Part B Rev, 2016. **22**(4): p. 284-97.
173. Guillot, R., et al., *Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle*. Acta Biomater, 2016. **36**: p. 310-22.
174. Hu, K. and B.R. Olsen, *The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration*. Bone, 2016. **91**: p. 30-8.
175. Koç, A., et al., *Evaluation of adenoviral vascular endothelial growth factor-activated chitosan/hydroxyapatite scaffold for engineering vascularized bone tissue using human osteoblasts: In vitro and in vivo studies*. J Biomater Appl, 2014. **29**(5): p. 748-60.
176. Kaigler, D., et al., *Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration*. J Dent Res, 2006. **85**(7): p. 633-7.
177. Liu, F., et al., *In vitro study in stimulating the secretion of angiogenic growth factors of strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(3): p. 683-92.
178. Peng, H., et al., *VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(11): p. 2017-27.
179. Kitamura, M., et al., *FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial*. J Dent Res, 2011. **90**(1): p. 35-40.
180. Cochran, D.L., et al., *A Randomized Clinical Trial Evaluating rh-FGF-2/ $\beta$ -TCP in Periodontal Defects*. J Dent Res, 2016. **95**(5): p. 523-30.
181. Gu, Z., et al., *Application of strontium-doped calcium polyphosphate scaffold on angiogenesis for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(5): p. 1251-60.
182. Supová, M., *Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: a review*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14**(1): p. 546-63.
183. Bertinetti, L., et al., *Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of mg surface enrichment on morphology, surface hydration species, and cationic environments*. Langmuir, 2009. **25**(10): p. 5647-54.
184. Mansour, A., et al., *Extracellular matrices for bone regeneration: a literature review*. Tissue Eng Part A, 2017.
185. Andrés, N.C., et al., *Manipulation of Mg(2+)-Ca(2+) Switch on the Development of Bone Mimetic Hydroxyapatite*. ACS Appl Mater Interfaces, 2017. **9**(18): p. 15698-15710.
186. Huang, B., et al., *Facilitated receptor-recognition and enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 on magnesium-substituted hydroxyapatite surface*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24323.
187. Shepherd, D.V., et al., *An in vitro study into the effect of zinc substituted hydroxyapatite on osteoclast number and activity*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(11): p. 4136-41.

188. Thian, E.S., et al., *Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties*. J Mater Sci Mater Med, 2013. **24**(2): p. 437-45.
189. Friederichs, R.J., et al., *Synthesis, characterization and modelling of zinc and silicate co-substituted hydroxyapatite*. J R Soc Interface, 2015. **12**(108): p. 20150190.
190. Hu, D., et al., *Different response of osteoblastic cells to Mg(2+), Zn(2+) and Sr(2+) doped calcium silicate coatings*. J Mater Sci Mater Med, 2016. **27**(3): p. 56.
191. Geng, Z., et al., *Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite*. J Biomater Appl, 2016. **31**(1): p. 140-51.
192. Querido, W., A.L. Rossi, and M. Farina, *The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches*. Micron, 2016. **80**: p. 122-34.
193. Almeida, M.M., et al., *Strontium ranelate increases osteoblast activity*. Tissue Cell, 2016. **48**(3): p. 183-8.
194. Bakker, A.D., B. Zandieh-Doulabi, and J. Klein-Nulend, *Strontium ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts*. Bone, 2013. **53**(1): p. 112-9.
195. Wornham, D.P., et al., *Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures*. Osteoporos Int, 2014. **25**(10): p. 2477-84.
196. Pilmane, M., et al., *Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **78**: p. 1222-1230.
197. Goltzman, D. and G.N. Hendy, *The calcium-sensing receptor in bone--mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(5): p. 298-307.
198. Cianferotti, L., et al., *The calcium-sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back*. Osteoporos Int, 2015. **26**(8): p. 2055-71.
199. Takahashi, N., et al., *S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(6): p. 1082-7.
200. Bonnelye, E., et al., *Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro*. Bone, 2008. **42**(1): p. 129-38.
201. Hurtel-Lemaire, A.S., et al., *The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 575-84.
202. Canalis, E., et al., *The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro*. Bone, 1996. **18**(6): p. 517-23.
203. Li, Y., et al., *Effects of strontium on proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **418**(4): p. 725-30.
204. Zhou, J. and L. Zhao, *Multifunction Sr, Co and F co-doped microporous coating on titanium of antibacterial, angiogenic and osteogenic activities*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29069.
205. Chen, Y., et al., *Antibacterial, osteogenic, and angiogenic activities of SrTiO<sub>3</sub> nanotubes embedded with Ag<sub>2</sub>O nanoparticles*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **75**: p. 1049-1058.
206. W, X., S. G, and W. C, *Methodological Consideration of Various Intraosseous and Heterotopic Bone Grafts Implantation in Animal Models*. J Tissue Sci Eng, 2015.
207. Gilbert, S., *Osteogenesis: the development of bones*. 6th edition ed. 2000.
208. Singh, A.P. *Endochondral ossification and intramembranous ossification*. Available from: <http://boneandspine.com/endochondral-ossification-and-intramembranous-ossification/>.
209. Valdivia-Gandur, I., et al., *Novel use of cranial epidural space in rabbits as an animal model to investigate bone volume augmentation potential of different bone graft substitutes*. Head Face Med, 2016. **12**(1): p. 35.
210. Zelzer, E. and B.R. Olsen, *The genetic basis for skeletal diseases*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 343-8.
211. Habibovic, P. and K. de Groot, *Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 25-32.
212. Yang, Z., et al., *Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals*. Biomaterials, 1996. **17**(22): p. 2131-7.
213. Scott, M.A., et al., *Brief review of models of ectopic bone formation*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(5): p. 655-67.
214. Wechsler, S., et al., *A novel, tissue occlusive poly(ethylene glycol) hydrogel material*. J Biomed Mater Res A, 2008. **85**(2): p. 285-92.
215. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone morphogenetic protein*. J Dent Res, 1971. **50**(6): p. 1392-406.

216. Asatrian, G., L. Chang, and A.W. James, *Muscle pouch implantation: an ectopic bone formation model*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1213**: p. 185-91.
217. Véronique, V., *Caractérisation d'un modèle de résection segmentaire diaphysaire de grande taille chez la brebis. Application à l'étude de deux matériaux de substitution osseuse*. 1997, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. p. 101.
218. van Griensven, M., *Preclinical testing of drug delivery systems to bone*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **94**: p. 151-64.
219. den Boer, F.C., et al., *Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow*. *J Orthop Res*, 2003. **21**(3): p. 521-8.
220. Zheng, J., et al., *Systematic modification and evaluation of a canine model for elevation of the floor of the maxillary sinus*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2014. **52**(9): p. 784-8.
221. Saklıdır, T.H. *Sinus Lifting*. 2015; Available from: <http://www.sidedentalclinic.com/index.php?pid=490&lng=8>.
222. Marukawa, E., et al., *Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2002. **31**(3): p. 287-95.
223. Du, B., et al., *Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo*. *Int J Nanomedicine*, 2015. **10**: p. 2555-65.
224. Dorafshar, A.H., et al., *Reconstruction of porcine critical-sized mandibular defects with free fibular flaps: the development of a craniomaxillofacial surgery model*. *J Reconstr Microsurg*, 2014. **30**(4): p. 241-8.
225. Abu-Serriah, M., et al., *Mechanical evaluation of mandibular defects reconstructed using osteogenic protein-1 (rhOP-1) in a sheep model: a critical analysis*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2005. **34**(3): p. 287-93.
226. Struillou, X., et al., *Experimental animal models in periodontology: a review*. *Open Dent J*, 2010. **4**: p. 37-47.
227. Gallego, L., et al., *Repair of segmental mandibular bone defects in sheep using bone marrow stromal cells and autologous serum scaffold: a pilot study*. *J Clin Periodontol*, 2015. **42**(12): p. 1143-51.
228. Pearce, A.I., et al., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. *Eur Cell Mater*, 2007. **13**: p. 1-10.
229. Li, Y., et al., *Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials*. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2015. **3**(3): p. 95-104.
230. Castañeda, S., et al., *Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits*. *Skeletal Radiol*, 2006. **35**(1): p. 34-41.
231. Oheim, R., et al., *Sheep model for osteoporosis: sustainability and biomechanical relevance of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection*. *J Orthop Res*, 2013. **31**(7): p. 1067-74.
232. Newman, E., A.S. Turner, and J.D. Wark, *The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models*. *Bone*, 1995. **16**(4 Suppl): p. 277S-284S.
233. Aido, M., et al., *Effect of in vivo loading on bone composition varies with animal age*. *Exp Gerontol*, 2015. **63**: p. 48-58.
234. Lalande, C., *Développement d'un nouveau produit d'ingénierie tissulaire osseuse à base de polymères et de cellules souches du tissu adipeux*, in *Sciences, Technologie, Santé*. 2011, Université de Bordeaux. p. 191.
235. Macintyre, N.J. and A.L. Lorbergs, *Imaging-Based Methods for Non-invasive Assessment of Bone Properties Influenced by Mechanical Loading*. *Physiother Can*, 2012. **64**(2): p. 202-15.
236. Barradas, A.M., et al., *Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms*. *Eur Cell Mater*, 2011. **21**: p. 407-29; discussion 429.
237. Blouin, S., et al., *Relations between radiograph texture analysis and microcomputed tomography in two rat models of bone metastases*. *Cells Tissues Organs*, 2006. **182**(3-4): p. 182-92.
238. Le Nihouannen, D., et al., *Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite*. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. **19**(2): p. 667-75.
239. Campbell, G.M. and A. Sophocleous, *Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies*. *Bonekey Rep*, 2014. **3**: p. 564.
240. Oliveira, H., et al., *The proangiogenic potential of a novel calcium releasing composite biomaterial: Orthotopic in vivo evaluation*. *Acta Biomater*, 2017. **54**: p. 377-385.

241. Lee, A., et al., *Bioceramic nanocomposite thiol-acrylate polyHIPE scaffolds for enhanced osteoblastic cell culture in 3D*. *Biomater Sci*, 2017.
242. Akkiraju, H., J. Bonor, and A. Nohe, *An Improved Immunostaining and Imaging Methodology to Determine Cell and Protein Distributions within the Bone Environment*. *J Histochem Cytochem*, 2016. **64**(3): p. 168-78.
243. Yang, M., et al., *Osteogenic Factor Runx2 Marks a Subset of Leptin Receptor-Positive Cells that Sit Atop the Bone Marrow Stromal Cell Hierarchy*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 4928.
244. Fricain, J.C., et al., *A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2013. **34**(12): p. 2947-59.
245. Catros, S., et al., *Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. **18**(1): p. 62-70.
246. Boissard, C.I., et al., *Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(9): p. 3316-27.
247. Maji, K., et al., *Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2015. **26**(16): p. 1190-209.
248. Ghorbani, F., H. Nojehdehian, and A. Zamanian, *Physicochemical and mechanical properties of freeze cast hydroxyapatite-gelatin scaffolds with dexamethasone loaded PLGA microspheres for hard tissue engineering applications*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016. **69**: p. 208-20.
249. Guerrero, J., et al., *Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(9): p. 8200-13.
250. Roy, M., et al., *Effects of Zinc and Strontium Substitution in Tricalcium Phosphate on Osteoclast Differentiation and Resorption*. *Biomater Sci*, 2013. **1**(1).
251. Pors Nielsen, S., *The biological role of strontium*. *Bone*, 2004. **35**(3): p. 583-8.
252. Greenwald, A.S., et al., *Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications*. *J Bone Joint Surg Am*, 2001. **83-A Suppl 2 Pt 2**: p. 98-103.
253. Delloye, C., et al., *Bone allografts: What they can offer and what they cannot*. *J Bone Joint Surg Br*, 2007. **89**(5): p. 574-9.
254. Polo-Corrales, L., M. Latorre-Esteves, and J.E. Ramirez-Vick, *Scaffold design for bone regeneration*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014. **14**(1): p. 15-56.
255. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(4): p. 245-60.
256. Carano, R.A. and E.H. Filvaroff, *Angiogenesis and bone repair*. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(21): p. 980-9.
257. Beachler, D.C., et al., *Bone Morphogenetic Protein Use and Cancer Risk Among Patients Undergoing Lumbar Arthrodesis: A Case-Cohort Study Using the SEER-Medicare Database*. *J Bone Joint Surg Am*, 2016. **98**(13): p. 1064-72.
258. Kondiah, P.J., et al., *A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering*. *Molecules*, 2016. **21**(11).
259. Kim, K. and J.P. Fisher, *Nanoparticle technology in bone tissue engineering*. *J Drug Target*, 2007. **15**(4): p. 241-52.
260. Munarin, F., et al., *Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites*. *Int J Biol Macromol*, 2015. **72**: p. 199-209.
261. Vandecandelaere, N., C. Rey, and C. Drouet, *Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters*. *J Mater Sci Mater Med*, 2012. **23**(11): p. 2593-606.
262. Catros, S., et al., *Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature*. *IRBM*, 2010. **31**(4): p. 226-233.
263. Tayton, E., et al., *A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study*. *J Biomed Mater Res A*, 2014. **102**(8): p. 2613-24.
264. Cox, S.C., et al., *Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014. **35**: p. 106-14.
265. Gentleman, E., et al., *The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro*. *Biomaterials*, 2010. **31**(14): p. 3949-56.
266. Marie, P.J., *Strontium ranelate in osteoporosis and beyond: identifying molecular targets in bone cell biology*. *Mol Interv*, 2010. **10**(5): p. 305-12.

267. Landi, E., et al., *Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement*. Acta Biomater, 2007. **3**(6): p. 961-9.
268. Li, Y., et al., *Cancellous bone response to strontium-doped hydroxyapatite in osteoporotic rats*. J Appl Biomater Funct Mater, 2015. **13**(1): p. 28-34.
269. Lindahl, C., et al., *Incorporation of active ions into calcium phosphate coatings, their release behavior and mechanism*. Biomed Mater, 2012. **7**(4): p. 045018.
270. Lindahl, C., et al., *The influence of Sr content in calcium phosphate coatings*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **53**: p. 322-30.
271. Aina, V., et al., *Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(3): p. 1132-42.
272. Gopi, D., et al., *Development of strontium and magnesium substituted porous hydroxyapatite/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coating on surgical grade stainless steel and its bioactivity on osteoblast cells*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **114**: p. 234-40.
273. Nardone, V., et al., *In Vitro Effects of Strontium on Proliferation and Osteoinduction of Human Preadipocytes*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 871863.
274. Cheng, H., et al., *Strontium (Sr) and silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities*. Acta Biomater, 2016. **31**: p. 388-400.
275. Chen, Y.W., et al., *In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(7): p. 2655-62.
276. Elgali, I., et al., *Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events*. Acta Biomater, 2016. **29**: p. 409-23.
277. Frasnelli, M., et al., *Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **71**: p. 653-662.
278. Robert, D., et al., *Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1586-95.
279. Autissier, A., et al., *Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process*. Acta Biomater, 2010. **6**(9): p. 3640-8.
280. Boyd, A.R., et al., *The deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings*. J Mater Sci Mater Med, 2015. **26**(2): p. 65.
281. Boyd, A.R., et al., *Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique*. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications, 2015. **46**: p. 290-300.
282. Tadier, S., et al., *Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems: Compositions, release properties, and effects on human osteoprogenitor cells*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012. **100**(2): p. 378-90.
283. Boanini, E., et al., *Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(9): p. 2079-88.
284. Thormann, U., et al., *Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats*. Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8589-98.
285. Rosa, J.A., et al., *Strontium Ranelate Effect on the Repair of Bone Defects and Molecular Components of the Cortical Bone of Rats*. Brazilian dental journal, 2016. **27**(5): p. 502-507.
286. Valiense, H., et al., *In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2016. **104**(2): p. 274-82.
287. Chandran, S., et al., *Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model*. J Biomater Appl, 2016. **31**(4): p. 499-509.
288. Lin, K., et al., *Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics*. Biomaterials, 2013. **34**(38): p. 10028-42.
289. Luo, X., et al., *Strontium-containing apatite/polylactide composites enhance bone formation in osteopenic rabbits*. Acta Biomater, 2015. **26**: p. 331-7.
290. Chandran, S., et al., *Osteogenic efficacy of strontium hydroxyapatite micro-granules in osteoporotic rat model*. J Biomater Appl, 2016. **31**(4): p. 499-509.
291. Gao, P., et al., *Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23367.

292. Schumacher, M., et al., *A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro*. Acta Biomater, 2013. **9**(12): p. 9547-57.
293. Catros, S., et al., *Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo*. J Orthop Res, 2009. **27**(2): p. 155-61.
294. Zwetyenga, N., et al., *Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2009. **38**(12): p. 1289-97.
295. Mégevand, C., P. Pasche, and B. Jaques, *[Long-term complications of radiotherapy after mandibular reconstruction with vascularized bone graft]*. Schweiz Med Wochenschr, 2000. **Suppl 125**: p. 109S-111S.
296. Letourneur, D., L.V. Catherine, and S.M. Derkaoui, **<invention-title lang="EN" load-source="patent-office" mxw-id="PT183583861" style="color: rgb(34, 34, 34); font-family: Arial, sans-serif; font-size: 21px; font-weight: bold; background-color: rgb(255, 255, 255);">Crosslinked Polysaccharide Beads and Their Biomedical Uses</invention-title> Crosslinked Polysaccharide Beads and Their Biomedical Uses**. 2016.
297. Whalen, R.L., et al., *The effects of radiation therapy on the tissue capsule of soft tissue implants*. ASAIO J, 1994. **40**(3): p. M365-70.
298. Glienke, J., et al., *Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states*. Eur J Biochem, 2000. **267**(9): p. 2820-30.
299. Liu, D., et al., *Distinct molecular basis for endothelial differentiation: gene expression profiles of human mesenchymal stem cells versus umbilical vein endothelial cells*. Cell Immunol, 2014. **289**(1-2): p. 7-14.



# ANNEXES

## Annexe 1

NCT Number	Title	Clinical application	Materials	Study start
NCT02802319	Ridge Preservation Following Tooth Extraction Using Porcine and Bovine Xenograft Materials	Alveolar Bone Loss	Porcine Xenograft (Zcore)  Bovine Xenograft (Bio-Oss)	2016
NCT03149172	Comparison of Post Tooth Extraction Healing Using Different Xenograft Materials		Equimatrix®   Bio-Oss®   Endobon®	2014
NCT02275767	Histological Evaluation of Healing Following Ridge Preservation Using a Combined Cortical/Cancellous Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft		50% cortical/50% cancellous FDBA   100% cortical FDBA   100% cancellous FDBA	2014
NCT02515058	Ridge Preservation Following Tooth Extraction Using Two Mineralized Cancellous Bone Allografts		PUROS (Ridge Preservation bone grafting surgery)  FDBA (Ridge Preservation bone grafting surgery)	2015
NCT01105026	A Clinical Investigation to Evaluate the Healing of Tooth Extraction Sites Filled With BioRestoreâ„¸		Alveolar Bone Defect Regeneration Following Tooth Extraction	2008
NCT02255149	A Feasibility Study for Growth Bone Vertically With Titanium Mesh and Allograft in Lower Posterior Jaw		Bone/Mesh	2011
NCT02440048	Using Bonded-Apatite Cement at the Time of Extraction for Ridge Preservation at These Sites		Bond Apatite synthetic bone substitute   BioOss bovine bone substitute	2015
NCT03178526	The Effect of Lovastatin Gel in the Treatment of Chronic Periodontitis		Drug: Lovastatin gel   Drug: Placebo	2015
NCT03089619	Alveolar Management Following Teeth Extraction		Drug: Human-Spongiosa   collacone®	2016
NCT02120053	Interest of Bone Substitute Material in Immediate Complete Denture		Conventional protocol   Bone substitute material group	2013
NCT03112772	Socket Preservation for Dental Implant Site Development.	Bone Loss	Puros® Allograft   Other: CopiOs® Cancellous Particulate	2017

NCT00900718	Comparison of Straumann Bone Ceramic and Bio-Oss With Guided Tissue Regeneration for Alveolar Ridge Preservation		Straumann Bone Ceramic  Bio-Oss	2006
NCT01961635	Healing of Bone/Soft Tissue to Different Abutment Biomaterials and the Impact on Marginal Bone Loss		dental implants  Zirconia abutments  Titanium Abutments  cad-cam acrylic abutments  Subcrestal  platform-switch  one-time one-abutment  Torque 20 n/cm2	2016
NCT00901121	Maxillary Sinus Elevation With Bio-Oss or Straumann BoneCeramic	Teeth Loss  Bone Loss	Straumann BoneCeramic  Bio-Oss	2005
NCT00782236	Comparison of Straumann BoneCeramic vs. Allograft Bone in Extraction Sockets		Bone Graft Material	2006

Exemples d'essais cliniques à l'aide de biomatériaux. Tableau adapté des résultats de la recherche sur <https://clinicaltrials.gov> avec les mots clés : « bone loss » « material »

## Annexe 2

<b>Table 1   Clinical trials in which stromal cells were used for skeletal regeneration</b>			
<b>Indication</b>	<b>Cell source</b>	<b>Cell processing and delivery</b>	<b>Clinical trial</b>
<b>MSC</b>			
Non-union of bone	Autologous	Direct injection	NCT00512434, <sup>134</sup> NCT01206179, <sup>135</sup> NCT01429012, <sup>136</sup> NCT01788059 <sup>137</sup>
		Implantation with carrier	NCT00250302, <sup>138</sup> NCT01435434, <sup>139</sup> NCT02177565, <sup>140</sup> NCT01626625, <sup>141</sup> NCT01842477, <sup>142</sup> NCT01725698, <sup>143</sup> NCT01958502 <sup>144</sup>
ONFH	Autologous	Direct injection	NCT02065167, <sup>145</sup> NCT01700920, <sup>146</sup> NCT01544712 <sup>147</sup>
		Implantation with carrier	NCT01605383 <sup>148</sup>
Other (spine fusion, osteoarthritis)	Autologous	Direct injection	NCT01210950 <sup>149</sup>
		Implantation with carrier	NCT01552707, <sup>150</sup> NCT01389661 <sup>151</sup>
	Allogeneic	Direct injection	NCT01603836, <sup>152</sup> NCT02172885, <sup>153</sup> NCT00186914 <sup>154</sup>
		Implantation with carrier	NCT00001391, <sup>155</sup> NCT01207193, <sup>156</sup> NCT00221130 <sup>157</sup>
<b>ASC</b>			
Non-union of bone	Autologous	Implantation with carrier	NCT01532076 <sup>158</sup>
	Allogeneic	Direct injection	NCT02140528 <sup>159</sup>
ONFH	Autologous	Direct injection	NCT01643655 <sup>160</sup>
	Autologous	Direct injection	NCT01501461, <sup>161</sup> NCT01739504, <sup>162</sup> NCT01585857, <sup>163</sup> NCT01885819, <sup>164</sup> NCT02241408, <sup>165</sup> NCT01885832, <sup>166</sup> NCT02142842, <sup>167</sup> NCT01947348 <sup>168</sup>
		Implantation with carrier	NCT01633892, <sup>169</sup> NCT01645722, <sup>170</sup> NCT01218945 <sup>171</sup>

Abbreviations: ASC, adipose-tissue-derived stromal cell; MSC, bone-marrow-derived stromal cell; ONFH, osteonecrosis of the femoral head.

Exemples d'essais cliniques utilisant des cellules souches

D'après [140]

## Annexe 3

### Evaluation of a polysaccharide based composite scaffolds doped or not with strontium in the femoral condyle bone defect in rats

#### Materials and Methods

##### *Preparation and characterization of polysaccharide-based porous beads*

Three polysaccharide-based matrices were prepared using previously described methods [127, 244]. Briefly, pullulan and dextran dissolved in water at a final concentration of 30% w/v (Pullulan, Mw 200,000, Hayashibara, Japan; Dextran, Mw 500,000, Pharmacosmos, Denmark) were chemical cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP, 25% (w/v), Sigma) under alkaline conditions. Fucoidan extracted from *Fucus vesiculosus* of medium molecular weight (Sigma-Aldrich, 10% w/w), Hydroxyapatite obtained by wet precipitation of a 0.6 M solution of phosphoric acid and a 1 M solution of calcium hydroxide<sup>3</sup>, or both were added to the polysaccharide solution to obtain Matrix-Fuco, Matrix-HA or Matrix-HA-Fuco. Sodium chloride (54% (w/w)) was also added as porogen agent to prepare porous scaffolds. Scaffolds were obtained after freeze-drying in the form of dried 300–500 µm beads as previously reported<sup>4</sup>.

##### *Rat femoral condyle defect*

Animal experiments were performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” recommended by the National Society for Biomedical Research in France. Interventions were carried out in an accredited animal facility (authorization no. A33-063-917) at the University of Bordeaux, under authorization no. 5012032-A of the French Ministry of Agriculture and were approved by the Animal Ethic Committee of the University of Bordeaux. Anesthesia was induced with a mixture of 4% isoflurane/Air 1– 2 L/min (Baxter, Deerfield/IL, USA) and was maintained at 2% isoflurane/Air 0.8 L/min during the implantation. A stable body temperature was assured by the use of a heating device. Medial defects of 3.5 mm diameter and 4 mm depth were introduced in left and right femoral condyles of 28 female Wistar RjHan rats at 12 weeks of age weighting 250–300 g (Janvier, Le Genest, France) using a dental microdrill (Thomas, France). Bone defects of about 38 mm<sup>3</sup> were rinsed with physiological solution NaCl 0.9% (w/v). The defect was either left empty or filled with dry beads that were implanted into the site. Beads were rehydrated with PBS 1X before filling the defect. The scaffolds remained solid enough to stay inside the defect. Therefore, no membrane was needed to avoid leakage of the biomaterial. Absorbable Vicryl sutures were performed on lateral muscles before closing the cutaneous plan with non-absorbable prolene

sutures and suture clips. To assure analgesia, 0.3 mg/kg of buprenorphine (Vetergesic Multidose, Alstoe Veterinary, York, UK) was administered subcutaneously to each rat 30 min prior to the procedure as well as 24 hours afterwards. Animals were euthanized by an overdose of CO<sub>2</sub> after 4 and 8 weeks of implantation. The implants and the surrounding tissues were recovered and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 24 hours at 4°C. After rinsing in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, samples were processed for Micro-CT analysis and histology.

#### *Micro-computed tomography (Micro-CT)*

Condyle samples were fixed in 4 % (w:v) paraformaldehyde for 24 hours, and then rinsed in PBS 1X, were treated by micro-CT before histological analysis. The X-ray microtomographic devices used in this study is a Quantum FX Caliper (Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA). The X-ray source was set at 90 V and 160 µA. Sample up to a Field of View of 10 mm diameter and were imaged with a 3D isotropic voxel size of 20 µm. Full 3D high-resolution raw data are obtained by rotating both the X-ray source and the flat panel detector 360° around the sample, with a rotation step of 0.1° (scanning time: 3 min). The corresponding 3,600 image projections were then automatically reconstructed (RigakuSW software, Caliper) into a Dicom stack of 512 files using standard back-projection techniques. The three-dimensional (3D) images of samples were built by stacking 512 cross sections obtained by X-ray microtomography. The resulting 3D files were composed of grey-level images where lowest grey/dark pixels represented empty spaces and highest grey/bright pixels stood for the densest materials. Three-dimensional analyses were performed using eXploreMicroView® software (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). After reconstruction of the region of interest, mineralized volume (MV) and total volume (TV) volume were measured for each group. Eight samples were evaluated for each condition at each time point (4 and 8 weeks). Results were expressed as mean ± standard deviation.

#### *Histological evaluation*

Samples were retrieved and fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, then decalcified with Microdec (MM France) during 14 days at room temperature, dehydrated and paraffin-embedded. Transversal sections (7-9 µm thickness) were prepared and treated with Masson Trichrome for mineralized bone and osteoid staining. The sections were analyzed with an Eclipse 80i light microscope (Nikon, Japan). Pictures were captured with a Nanozoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics France) using objective UPS APO 20X NA 0.75 combined to an additional lens 1.75X, leading to a final magnification of 35X. Virtual slides were acquired with a TDI-3CCD camera. Images were analysed using the NDP software. The whole surface as well as the newly bone surface were quantitated in mm<sup>2</sup> using ImageJ. Stained slides from two samples per condition were processed for histological analysis, and three sections were fully imaged and analysed per sample and per condition. Results are shown as means with standard deviation per condition.

### *Immunolabelling of vWF on condyle defects*

Samples from condyle defect were retrieved and fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, then decalcified with Microdec (MM France) during 14 days at room temperature. Then the samples were dehydrated and embedded in paraffin. Sections (7-9 µm in thickness) were deparaffinized using toluene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (100-50 %) and finally washed in distilled water. Antigen recovery was performed with proteinase K, diluted at 1/20 within TE buffer (50mM Tris Base, 1mM EDTA, pH 8.0) at room temperature for 45 min. After washing with PBS1X, samples were permeabilized with a Triton X100 at 0.1% (in PBS1X) during 10 minutes at room temperature. Then, endogenous peroxidase was quenched in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in PBS, for 5 min. After washing with PBS 0.1M pH7.4, slides were blocked using 2% (w/v) BSA serum in PBS 0.1M pH7.4 for 30 min. For vWF immunolabeling, incubation was performed overnight with a rabbit polyclonal anti-rat vWF antibody (dilution 1:100; A0082; Dako – Agilent, Santa Clara, CA, USA) at 4° C. After two washes with PBS 0.1M pH7.4, the slides were incubated with according to the manufacturer's instruction (Anti-rabbit ABC kit; Vector Labs, Burlingame, CA, USA), and then revealed using Impact DAB solution (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Staining was stopped in distilled water, samples were then counterstained in Mayer's hematoxylin and washed in running tap water for 10 min. Finally, samples were dehydrated and mounted using Pertex. The number of vessels within the tissue was quantified using NDP view software. The whole surface and the number of vessels were quantified in mm<sup>2</sup>. Stained slides from two samples per condition were processed for immunostaining analysis, and three sections were fully imaged and analysed per sample and per condition. Results are shown as average with standard deviation per condition.

### *Statistical analysis*

All data were expressed as average ± standard deviation (SD). They were analyzed using standard analysis of one-way ANOVA test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*). The symbol \*\* indicates a significant difference with  $p < 0.01$ ; \*\*\* a significant difference with  $p < 0.001$ ; ns: non-significant difference.

## Annexe 4

### Evaluation of a polysaccharide based composite scaffolds doped or not with strontium in the femoral segmental bone defect in rats

#### Materials and Methods

##### *Preparation and characterization of polysaccharide-based porous beads*

Three polysaccharide-based matrices were prepared using previously described methods [127, 244]. Briefly, pullulan and dextran dissolved in water at a final concentration of 30% w/v (Pullulan, Mw 200,000, Hayashibara, Japan; Dextran, Mw 500,000, Pharmacosmos, Danmark) were chemical cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP, 25% (w/v), Sigma) under alkaline conditions. Fucoidan extracted from *Fucus vesiculosus* of medium molecular weight (Sigma-Aldrich, 10% w/w), Hydroxyapatite obtained by wet precipitation of a 0.6 M solution of phosphoric acid and a 1 M solution of calcium hydroxide<sup>13</sup>, or both were added to the polysaccharide solution to obtain Matrix-Fuco, Matrix-HA or Matrix-HA-Fuco. Sodium chloride (54% (w/w)) was also added as porogen agent to prepare porous scaffolds. Scaffolds were obtained after freeze-drying in the form of dried 300–500 µm beads as previously reported<sup>4</sup>.

##### *Rat femoral segmental defect*

Spacers were 6 mm in length and 5 mm in diameter. PMMA spacers were made of medical grade PMMA bone cement (CMW 3, DePuy international, Blackpool, England) hardened in glass Kimble tubes (Dutscher). The glass was broken to collect the solidified PMMA that was cut to the desired length and sterilized by 25 kGy of gamma radiation. Surgical procedures and animal postoperative care were conducted in accordance with the French Ministry of Research and Agriculture procedures for the care and the use of laboratory animals. The experiments were performed under the supervision of an authorized laboratory member (authorization B3310023) in an accredited animal facility (authorization A33-063-917). The rats had full-unlimited access to food and water and were able to move without restriction. Sixty-four female Wistar-RjHan rats (12 weeks age, 250g average weight) were obtained from a patented vendor (Janvier, Le Genest, France). Surgical procedures were performed under general anaesthesia using isoflurane inhalation (Medical Segla Electronique, Lormont, France). The postero-lateral side of the femoral bone was approached through a 3-cm skin incision. The bone was then drilled under saline irrigation to produce a 6-mm critical bone defect, filled with a PMMA spacer on the left and right sides in each animal. A 5-hole titanium mini-plate

(VP1313.09, Synthes, Solothurn, Switzerland) secured in place with two proximal and two distal cortical screws (1.5 mm in diameter, 7 mm in length, VS102.007, Synthes, Solothurn, Switzerland) was used to stabilize the proximal and distal femoral bone (Figure 1). The muscles and the superficial fascias were closed using absorbable 3/0 sutures (vicryl 4.0, Ethicon, division of Johnson & Johnson, Brussels, Belgium).

The skin was closed with Michel staples and then covered with aluminum spray (Aluspray, Vetoquinol, Lure, France). Animals were given a subcutaneous injection of a cephalosporin antibiotic (cefazoline 0.06 mg/kg) and an opioid painkiller (buprenorphine 0.05 mg/kg) during the procedure and the day after. The group was split in two. In these preliminary data, the irradiation started 3 weeks after spacer insertion. External Beam RadioTherapy (EBRT) was delivered at PRECI, an experimental veterinary radiotherapy platform (Villeneuve d'ASCQ, France.). An orthovoltage X-ray source (PANTAK, THERAPAX DXT 300, Gulmay Medical, Camberley, Surrey, UK) was used for the delivery of a 100kV low-energy photon beam. Rats were treated individually, under isoflurane anaesthesia, in a dorsal recumbency. A 5-cm circular applicator (SSD 30cm; 3-cm efficient field width) was directed, as a single field, on the bone defect over the medial aspect of each left and right hind limb. For each field, a 3-mm sheet of lead blocked the ipsilateral aspect of the pelvis. Twenty-five daily fractions (5-day week) of 2 Gray were administered to the implant (skin dose of 2.2 Gy) for a total dose of 50 Gray (total skin dose of 55Gy). During EBRT procedure and the period between EBRT and euthanasia, rats were evaluated every day, and weighted weekly. Irradiation related complications were screened: local skin inflammation, wound complication, hair modification.

After the EBRT procedure defects were opened and spacers were removed. Cavities were filled with the beads of HA and HA-Sr Matrix. The defect has been closed following the same procedure than for the first step of surgery. Rats were sacrificed 12 weeks after the second surgery with a CO<sub>2</sub> overdose. Samples were placed in a 4% (w/v) paraformaldehyde solution for 24 hours, then kept in 0.1 M PBS pH 7.4 at 4°C for  $\mu$ CT and histological analysis. The chronological processus of this technique is presented in **Figure 53**.



**FIGURE 9 : CHRONOLOGICAL PROCESSUS OF MASQUELET TECHNIQUE WITH EBRT ON RAT SEGMENTAL FEMORAL DEFECT**

### *Micro-computed tomography (Micro-CT)*

Femoral samples were fixed in 4 % (w:v) paraformaldehyde for 24 hours, and then rinsed in PBS 1X, were treated by micro-CT before histological analysis. The X-ray microtomographic devices used in this study is a Quantum FX Caliper (Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA). The X-ray source was set at 90 V and 160  $\mu$ A. Sample up to a Field of View of 10 mm diameter

and were imaged with a 3D isotropic voxel size of 20  $\mu\text{m}$ . Full 3D high-resolution raw data are obtained by rotating both the X-ray source and the flat panel detector 360° around the sample, with a rotation step of 0.1° (scanning time: 3 min). The corresponding 3,600 image projections were then automatically reconstructed (RigakuSW software, Caliper) into a Dicom stack of 512 files using standard back-projection techniques. The three-dimensional (3D) images of samples were built by stacking 512 cross sections obtained by X-ray microtomography. The resulting 3D files were composed of grey-level images where lowest grey/dark pixels represented empty spaces and highest grey/bright pixels stood for the densest materials. Three-dimensional analyses were performed using eXploreMicroView® software (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). After reconstruction of the region of interest, mineralized volume (MV) and total volume (TV) volume were measured for each group. Eight samples were evaluated for each condition. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

#### *Histological evaluation*

Samples were retrieved and fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde for 24 h at 4 °C, then decalcified with Microdec (MM France) during 14 days at room temperature, dehydrated and paraffin-embedded. Transversal sections (7-9  $\mu\text{m}$  thickness) were prepared and treated with Masson Trichrome for mineralized bone and osteoid staining. The sections were analyzed with an Eclipse 80i light microscope (Nikon, Japan). Pictures were captured with a Nanozoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics France) using objective UPS APO 20X NA 0.75 combined to an additional lens 1.75X, leading to a final magnification of 35X. Virtual slides were acquired with a TDI-3CCD camera. Images were analysed using the NDP software.

#### *Statistical analysis*

All data were expressed as average  $\pm$  standard deviation (SD). They were analyzed using standard analysis of one-way ANOVA test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*). The symbol \*\* indicates a significant difference with  $p < 0.01$ ; \*\*\* a significant difference with  $p < 0.001$ ; ns: non-significant difference.

## Annexe 5

# Evaluation of a polysaccharide based composite scaffolds doped or not with strontium in the mandible segmental bone defect in mini-pigs

### Materials and Methods

#### *Mandibular segmental defect*

Animal experiments were performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” recommended by the National Society for Biomedical Research in France. Interventions were carried out in an accredited animal facility at the DHURE (University of Lille, France) under authorization of the French Ministry of Agriculture.

#### *Surgical procedures*

Each animal was supposed to have three successive surgical procedures: 1) teeth extraction, 2) segmental mandibulectomy and spacer implantation, 3) spacer extraction and autologous bone graft into induced membrane.

The operations were performed under general anesthesia. After premedication (intramuscular injection of ketamine, xylazine and acepromazine), the anesthesia was induced and maintained with isoflurane inhalation through a constant-volume ventilator, administered through an endotracheal tube. The animals were connected to a heart monitor. The skin at the operation sites was shaved and disinfected with povidone-iodine solution before surgery and the wounds were closed in layers, using resorbable sutures (Vicryl™; Ethicon, Somerville, NJ) and non resorbable sutures (Mersuture™; Ethicon, Somerville, NJ). To reduce the risk of perioperative infection, the animals were treated with a daily dose of lincomycin and spectinomycin (0.1 mg/kg, Linco-Spectin™, Zoetis, Malakoff, France) for seven days. To control the pain, the animals were treated with a single transdermal application of fentanyl (Recuvyra™ 50 mg/ml, Elanco, Rueil Malmaison, France) on the neck before surgery. Four weeks after each procedure, the oral cavity was controlled under general anesthesia and an X-ray radiography was performed to check the mandible and the osteosynthesis.

During the first procedure, premolars and molars were extracted from the right mandible. Using different sized elevators, the marginal periodontium of teeth was freed and teeth was mobilized until movement with an extraction forceps. If necessary, teeth were split with a drilling instrument in the transverse plane. The fragments were carefully mobilized and

extracted. If root fracture occurred during the extraction an attempt was made to remove the remaining tip of the root. Mandible bone was then smoothed to avoid perforation of the gum tissue that was closed using resorbable sutures (Vicryl™; Ethicon, Somerville, NJ).

Eight weeks after, the right mandible was approached through a large lateral skin incision. A 4-cm critical-sized defect was performed using an oscillating saw under sterile-water irrigation. The approach was extra periosteal excepted on the gum side to avoid a communication with the oral cavity. Before resection, a pre-shaped osteosynthesis plate (VP4041.10, Synthes™, Etupes, France) was adapted using appropriate bending tools in order to maintain the correct position of the mandible. The plate was maintained with 6 screws (VS303.020, Synthes™, Etupes, France). The bone defect was then filled with a polymethylmethacrylate (PMMA) cement with gentamycin (Smartset GMV Bone Cement, DePuySynthes™, Saint Priest, France) as a spacer. A temporary silicone sheet was placed on the oral side of the defect to make sure that the spacer had an internal smooth surface. To limit the heat transmission providing from the in-situ exothermic reaction of PMMA polymerization that could damage the host tissues, the heat was controlled with continuous sterile iced-water irrigation.

Twelve weeks after, a bilateral transversal incision of 5 cm was made on top of each anterior iliac crest and particulate corticocancellous bone was harvested. The right mandible was approached through the same lateral but smaller incision. The induced membrane that has been spontaneously formed around the cement was incised at the level of the junction with the plate. The PMMA was removed. The proximal and distal bony-ends of the mandibular bone that had been healed were drilled under sterile-water irrigation. The cavity was filled with around 30 ml corticocancellous bone graft. The induced membrane was closed using resorbable sutures (Vicryl™; Ethicon, Somerville, NJ).