

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé UBL*

Spécialité : Recherche clinique, innovation technologique, santé publique

Par

**Amadou TOURE**

## **Contribution au développement de substituts osseux auto-réticulants en ingénierie tissulaire osseuse maxillo-faciale**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 19 Décembre 2018

Unité de recherche : RMeS INSERM UMRS 1229

Thèse N° :

### **Rapporteurs avant soutenance :**

M Philippe POMAR                      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Toulouse III

M Jean-Christophe FRICAIN      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux

### **Composition du Jury :**

Rapporteurs : M Philippe POMAR                      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de  
Toulouse III

M Jean-Christophe FRICAIN      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de  
Bordeaux

Examineur : M Olivier GAUTHIER                      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, ONIRIS, Ecole  
Nationale Vétérinaire de Nantes

Dir. de thèse : M Pierre WEISS                      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de  
Nantes

Co-dir. de thèse : M Bernard GIUMELLI                      Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de  
Nantes



Je dédie cette thèse à...

A mes parents,

A mon épouse,

A mes frères et sœurs,

A toute ma famille et aux amis.....

Pour le soutien, l'amour, l'amitié, les moments importants de la vie passés ensemble...

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire (LIOAD Unité INSERM UMRS 791), devenu RMeS INSERM U-1229, de la Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Nantes.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail, en particulier :

Monsieur le Professeur Pierre WEISS, PU-PH, ancien Directeur du LIOAD.

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir au LIOAD U-791, de m'avoir initié à la recherche fondamentale et d'avoir spontanément accepté de diriger ma thèse. Je vous remercie très sincèrement pour votre rigueur scientifique, votre enthousiasme au travail, votre sens des relations humaines, votre bonne humeur, ainsi que la disponibilité, les encouragements et la confiance placée en moi. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Bernard GIUMELLI, PU-PH, co-directeur de thèse, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nantes.

Vous avez cru en moi depuis ma formation initiale et avez accepté de codiriger ma thèse malgré vos nombreuses occupations et obligations professionnelles. Veuillez trouver dans ce travail cher Maître, le témoignage de mes sincères remerciements, de mon profond respect, de ma gratitude, de ma reconnaissance, de mon sincère attachement et admiration pour tout ce que vous m'avez apporté tant au plan professionnel que personnel. Merci Grand Frère !

Mes deux rapporteurs de thèse :

Monsieur le Professeur Philippe POMAR, PU-PH, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de rapporter mon travail de thèse malgré vos nombreuses responsabilités et charges professionnelles. Vos travaux dans le domaine de la prothèse maxillo-faciale (PMF) font de vous une référence internationale et une source d'inspiration pour moi. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon estime, de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Christophe FRICAIN, PU-PH, Directeur de recherche INSERM.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de rapporter ma thèse malgré vos nombreuses obligations professionnelles et les contraintes de temps. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Mon examinateur de thèse:

Monsieur le Professeur Olivier GAUTHIER, PU-PH, ONIRIS-Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail malgré vos nombreuses responsabilités académiques et occupations au centre de recherches et d'investigations précliniques (CRIP) de l'ONIRIS ENVN. J'ai pu apprécier, au cours de nos échanges et collaborations, votre rigueur scientifique, vos compétences chirurgicales, votre pragmatisme, votre sens des relations humaines, votre courtoisie et votre disponibilité. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude, de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Les membres extérieurs de mon comité de suivi de thèse : Monsieur le Docteur Hervé PETITE et Monsieur le Docteur Jean LEBIDEAU : pour votre rigueur scientifique, vos critiques suggestives, vos conseils avisés au cours de cette thèse. Recevez toute ma gratitude et mon profond respect.

Le personnel du laboratoire RMeS (ex LIOAD) :

Monsieur le Docteur Jérôme GUICHEUX, PhD-HDR, Directeur de recherche INSERM et du RMeS.

Pour les conseils avisés, le pragmatisme et la rigueur scientifique. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Madame le Docteur Catherine Le Visage, PhamD, Directrice de recherche INSERM, Directrice adjointe du RMeS.

Pour les conseils avisés, la rigueur scientifique, la quête permanente de la perfection au travail, la bonne humeur communicative et la disponibilité. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude, de mon estime et de mon profond respect.

Monsieur Paul PILET, Madame Sophie SOURICE, Madame Caroline VIGNES, Monsieur Thierry ROUILLON, ingénieurs d'étude et/ou de recherche.

Je ne cesserais jamais de vous remercier infiniment pour votre aide précieuse au MEB, au microscanner, en histologie, en biologie et en chimie ; mais aussi pour

le soutien et les encouragements. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude, de mon estime et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Guy DACULSI, Directeur de recherche INSERM de classe exceptionnelle.

Pour votre enthousiasme, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines, mais aussi pour nous avoir offert gracieusement des échantillons de granules de BCP pour nos expérimentations. Vous m'avez convié et inscrit à mon premier congrès scientifique ISACB-6 en 2013, me permettant de présenter mes résultats préliminaires in vitro. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude, de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Michel BOULER (PU, Directeur de recherche CNRS), Madame le Docteur Sophie QUILLARD (MCU IUT), pour votre rigueur scientifique, vos encouragements, votre enthousiasme, vos conseils avisés et vos immenses qualités.

A Pierre CORRE, Pauline BLERY et aux membres du groupe ITO actuel REGOS, pour les échanges enrichissants, les conseils avisés, les collaborations futures.

Aux statutaires du RMeS : Johann C, Laurent et Sarah B, Philippe L, Martial M, Julie L, Joëlle V, Valérie G, Aurélie S, Marion F, Frédéric J, Olivier H : pour les échanges enrichissants, le soutien et la bonne ambiance.

Aux incontournables et indispensables personnels administratif et technique : Valérie P, Aurore V, Carole G, Mélanie V, Sophie S, Maïthé G, Gilles S : pour l'accueil chaleureux, la bonne ambiance et la disponibilité.

Aux amis et collègues de bureau, ainsi qu'aux étudiants de l'unité: Khalid K, Gildas R, Elise V, Jintao Z, Wheizen L, Samy Y, Fahd H, Pierre-Gabriel P, Thomas M, Than Tâm, Christophe M, Sophie P, Nicolas M, Vincent H, Annabelle B, Maude G, Elodie L, Elsa M, Eléonore C, Richard K, Alain K, Jean-Luc M, Lara F, Pauline C, Sylvie B, Marie-Michèle G, Cyril D... pour la bonne ambiance, les échanges enrichissants.

Aux collaborateurs de l'unité de thérapeutique expérimentale et de l'école vétérinaire de Nantes : toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur Olivier LABOUX, Pr Assem SOUEIDAN, Dr Saïd KIMAKHE, Dr Emmanuelle LEROUXEL, Dr Isabelle HYON et l'ensemble du personnel de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nantes: pour l'accueil chaleureux et les encouragements.

Aux collègues et amis du Département de Prothèses : Pr Yves AMOURIQ, Pr Laurent LEGUEHENNEC, Dr Pierre LE BARS, Dr François BODIC, Pauline B, Erwan F, Aurélien F, Edouard L, Fabienne J, Claire M, Thierry P. Pour votre enthousiasme, votre soutien, vos encouragements, et la bonne ambiance de travail. Pour les collaborations cliniques à venir.

A Erwan FREUCHET : pour ton amitié, ta disponibilité, ton hospitalité, tes encouragements et les réflexions philosophiques partagées.

A, Lisa N, Justine L, Eric D et Erwann : pour votre soutien, votre amitié, votre hospitalité et vos encouragements.

Aux amis et collègues du Service de Prothèse de l'Institut d'Odontologie et de Stomatologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar : Colonel SECK MT, Dr TOURE SN, Dr Lambane D, Pr MBODJ EB, Pr GUEYE M, Dr NDIAYE C, Dr NABHANE E, Dr THIOUNE N, Dr KAMARA PI, Dr BADJI K, Dr CISSE B, M BITEYE M, M THIAM MAM, M THIARE B. Pour votre soutien, votre disponibilité, vos encouragements, vos conseils avisés et la bonne ambiance au travail.

Aux collègues et amis, ainsi qu'à l'ensemble du personnel de l'Institut d'Odontologie et de Stomatologie de la FMPO de l'UCAD : pour votre soutien, vos encouragements, vos conseils avisés et la bonne ambiance de travail.

Aux amis et collègues de la Brigade Nationale des Sapeurs-Pompiers : Dentiste Lt-Colonel SECK AK et tous les éléments du GSSM : pour votre soutien, votre disponibilité, vos encouragements, vos conseils avisés, la rigueur et la bonne ambiance au service.

## TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	3
Table des matières.....	7
Liste des abréviations.....	11
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	17
Résumé.....	18
Abstract.....	19
<b>1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>20</b>
1.1. Historique de la prothèse maxillo-faciale (PMF).....	20
1.2. Définition de la PMF.....	21
1.3. Principes généraux.....	22
1.4. Etiologie des pertes de substance maxillo-faciales.....	27
<b>1.4.1. Les pertes de substance congénitales.....</b>	<b>27</b>
1.4.1.1. Définition et données épidémiologiques.....	27
1.4.1.2. Rappel embryologique.....	27
1.4.1.3. Formation du palais primaire.....	28
1.4.1.4. Formation du palais secondaire.....	28
1.4.1.5. Physiopathologie.....	29
1.4.1.5.1. Rappels anatomophysiologiques.....	29
1.4.1.5.2. <u>Causes</u> .....	<u>30</u>
1.4.1.5.2.1. <i>Facteurs génétiques ou endogènes</i> .....	30
1.4.1.5.2.2. <i>Facteurs environnementaux ou</i>	
<i>exogènes</i> .....	30
1.4.1.6. Conséquences.....	31
1.4.1.6.1. <u>Respiration</u> .....	<u>31</u>
1.4.1.6.2. <u>Déglutition</u> .....	<u>31</u>
1.4.1.6.3. <u>Phonation – Elocution</u> .....	<u>31</u>
1.4.1.6.4. <u>Croissance faciale</u> .....	<u>32</u>
1.4.1.6.5. <u>Pronostic</u> .....	<u>32</u>
1.4.1.7. Formes cliniques – Classifications.....	32
1.4.1.7.1. <u>Classification de Veau</u> .....	<u>32</u>
1.4.1.7.2. <u>Classification de Kernahan et Stark</u> .....	<u>33</u>
1.4.1.7.3. <u>Classification de Benoist</u> .....	<u>34</u>
1.4.1.7.4. <u>Classification de Chancholle</u> .....	<u>35</u>
<b>1.4.2. Les pertes de substance traumatiques.....</b>	<b>36</b>

<b>1.4.3. Les pertes de substance infectieuses et toxiques.....</b>	<b>37</b>
<b>1.4.4. Les pertes de substance carcinologiques.....</b>	<b>37</b>
1.4.4.1. Définitions et données épidémiologiques.....	37
1.4.4.2. Classification des pertes de substance carcinologiques..	39
1.4.4.2.1. <u>Classification TNM des carcinomes épidermoïdes des</u>	
<u>VADS.....</u>	<u>40</u>
1.4.4.2.2. <u>Classification des pertes de substance acquises</u>	
<u>maxillaires (PSAM).....</u>	<u>41</u>
1.4.4.2.3. <u>Classification des pertes de substance mandibulaires</u>	
<u>(PDSM).....</u>	<u>43</u>
<b>1.5. Thérapeutiques médico-chirurgicales des cancers des VADS.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5.1. La chirurgie.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5.2. La radiothérapie.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5.3. La chimiothérapie.....</b>	<b>46</b>
<b>1.6. Conséquences des thérapeutiques médico-chirurgicales.....</b>	<b>47</b>
<b>1.6.1. Conséquences de la chirurgie d'exérèse.....</b>	<b>47</b>
1.6.1.1. Aux maxillaires.....	47
1.6.1.2. A la mandibule .....	47
1.6.1.3. Répercussions psychologiques .....	48
<b>1.6.2. Conséquences de la radiothérapie .....</b>	<b>48</b>
1.6.2.1. La peau.....	49
1.6.2.2. Le tissu nerveux .....	49
1.6.2.3. Les vaisseaux.....	49
1.6.2.4. Les muscles manducateurs.....	49
1.6.2.5. Les muqueuses.....	49
1.6.2.6. Le goût.....	50
1.6.2.7. Les glandes salivaires et la salive.....	50
1.6.2.8. Les dents.....	51
1.6.2.9. Les os des mâchoires.....	51
<b>1.6.3. Conséquences de la chimiothérapie .....</b>	<b>52</b>
<b>1.7. Place de la PMF dans le traitement des pertes de substance</b>	
<b>congénitales et acquises.....</b>	<b>52</b>
<b>1.7.1. Relation d'aide.....</b>	<b>52</b>
<b>1.7.2. Place de la PMF dans la prise en charge des pertes de</b>	
<b>substance congénitales .....</b>	<b>53</b>
<b>1.7.3. Place de la PMF dans le traitement des cancers des VADS.</b>	<b>54</b>
<b>1.8. Problématique .....</b>	<b>57</b>
<b>1.9. Rappels sur la structure et la physiologie du tissu osseux.....</b>	<b>58</b>
<b>1.9.1. Structure osseuse.....</b>	<b>58</b>
<b>1.9.2. Remodelage osseux.....</b>	<b>59</b>
<b>1.9.3. Processus de cicatrisation osseuse.....</b>	<b>61</b>

1.9.4. La greffe osseuse.....	62
1.10. Ingénierie tissulaire osseuse (ITO).....	63
1.10.1. Définition de l'ingénierie tissulaire.....	64
1.10.2. Principe de l'ingénierie tissulaire osseuse.....	64
1.10.3. Preuve de concept.....	64
1.10.4. Les biomatériaux.....	65
1.10.4.1. Définition.....	65
1.10.4.2. Classification.....	65
1.10.4.3. Propriétés requises des biomatériaux utilisés en ITO....	65
1.10.4.4. Différentes familles de biomatériaux utilisés en ITO....	67
1.10.4.4.1. <u>Les polymères.....</u>	<u>67</u>
1.10.4.4.2. <u>Les céramiques.....</u>	<u>69</u>
1.10.4.4.3. <u>Les métaux.....</u>	<u>70</u>
1.10.4.4.4. <u>Les matériaux composites.....</u>	<u>71</u>
1.10.5. Les facteurs de croissance.....	71
1.10.5.1. <u>Les protéines morphogénétiques osseuses (bone morphogenetic protein BMP).....</u>	<u>72</u>
1.10.5.2. <u>Autres facteurs de croissance.....</u>	<u>75</u>
1.10.6. Les cellules ostéogéniques.....	75
2. ETUDE EXPERIMENTALE.....	78
2.1. Problématique.....	78
2.2. Objectifs.....	79
2.3. Etude in vivo.....	80
2.3.1. Evaluation de SOAR + BMP2 sur un défaut segmentaire de taille critique d'ulna de chien.....	80
2.3.1.1. Introduction.....	80
2.3.1.2. Matériel et méthode.....	81
2.3.1.2.1. <u>Substituts osseux auto-réticulants.....</u>	<u>81</u>
2.3.1.2.2. <u>Facteurs de croissance BMP2.....</u>	<u>83</u>
2.3.1.2.3. <u>Préparation du SOAR.....</u>	<u>83</u>
2.3.1.2.4. <u>Animaux.....</u>	<u>84</u>
2.3.1.2.5. <u>Anesthésie et procédure chirurgicale.....</u>	<u>84</u>
2.3.1.2.6. <u>Contrôles radiographiques.....</u>	<u>85</u>
2.3.1.2.7. <u>Analyses microscanner.....</u>	<u>85</u>
2.3.1.2.8. <u>Analyses MEB et microanalyses X (EDX).....</u>	<u>86</u>
2.3.1.2.9. <u>Analyses histologiques.....</u>	<u>86</u>
2.3.1.2.10. <u>Analyses statistiques.....</u>	<u>87</u>
2.3.1.3. Résultats.....	88
2.3.1.3.1. <u>Clinique.....</u>	<u>88</u>
2.3.1.3.2. <u>Radiographie.....</u>	<u>88</u>

2.3.1.3.3.	<u>Explantation.....</u>	90
2.3.1.3.4.	<u>Résultats micro CT.....</u>	90
2.3.1.3.5.	<u>Résultats MEB.....</u>	92
2.3.1.3.6.	<u>Résultats histologiques.....</u>	100
2.3.1.4.	Discussion .....	105
2.3.1.5.	Conclusion .....	110
<b>2.3.2.</b>	<b>Evaluation de l'ostéoinduction de SOAR + BMP2 in vivo en site calvaria chez le rat.....</b>	<b>112</b>
2.3.2.1.	Introduction .....	112
2.3.2.2.	Matériel et méthode .....	114
2.3.2.2.1.	<u>Biomatériaux .....</u>	114
2.3.2.2.2.	<u>Facteurs de croissance BMP2 .....</u>	115
2.3.2.2.3.	<u>Animaux .....</u>	115
2.3.2.2.4.	<u>Conditions expérimentales .....</u>	116
2.3.2.2.5.	<u>Anesthésie et procédure chirurgicale .....</u>	117
2.3.2.2.6.	<u>Explantation .....</u>	118
2.3.2.2.7.	<u>Etudes de la repousse osseuse.....</u>	118
2.3.2.3.	Résultats .....	121
2.3.2.3.1.	<u>Procédure chirurgicale.....</u>	121
2.3.2.3.2.	<u>Résultats au micro-CT.....</u>	121
2.3.2.3.3.	<u>Résultats en MEB.....</u>	124
2.3.2.3.4.	<u>Résultats histologiques .....</u>	127
2.3.2.4.	Discussion.....	133
2.3.2.5.	Conclusion .....	137
	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>138</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>140</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>161</b>

## Liste des abréviations

AH : acide hyaluronique

ALP : alcalin phosphatase

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANOVA : analyse of variance

ATM : articulation temporo-mandibulaire

AVP : accident de la voie publique

$\beta$ -TCP :  $\beta$ -tricalcium phosphate

BCP : biphasic calcium phosphate

BMP : bone morphogenetic protein

BMU : basic multicellular unit

BPTM : bucco-pharyngectomie transmandibulaire

BSE : back-scattered electron

CAD-CAM : computer-assisted design ; computer-assisted manufacturing

CBN : communication bucco-nasale

CBS : communication bucco-sinusienne

CDA : calcium deficient apatite

CHI : chitosan

CHI-Si : chitosan silanisé

DBM : demineralized bone matrix

DCI : dénomination commune internationale

DNS dinitrosalicylic acid

DV : dimension verticale

EGF : epidermal growth factor

EDX : energy dispersive X spectroscopy

ENVN : école nationale vétérinaire de Nantes

FDA : food and drug administration

FGF : fibroblast growth factor  
FLAP : fente labio-alvéolo-palatine  
GMMA : glycol méthyle méthacrylate  
GOA : greffe osseuse autologue  
GUNA : gingivite ulcéro-nécrotique aigue  
HA : hydroxyapatite  
HAS : haute autorité de la santé  
HCl : acide chlorhydrique  
HES : hematoxylin-eosin staining  
HMPC-Si : hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé  
IGF : insulin-like growth factor  
IL : interleukine  
INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
ITO : ingénierie tissulaire osseuse  
KDa : kilo Dalton  
LIOAD : laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire  
 $\mu$ CT : micro-computed tomography  
MEB : microscopie électronique à balayage  
MEC : matrice extracellulaire  
MOT : moelle osseuse totale  
NaOH : hydroxyde de sodium  
OMS : organisation mondiale pour la santé  
ONM : ostéonécrose des maxillaires  
ORN : ostéoradionécrose  
PBS : phosphate buffer saline  
PCL : poly ( $\epsilon$ -caprolactone)  
PDGF : platelet derivated growth factor

PDSM : perte de substance mandibulaire  
PFA : paraformaldéhyde  
PGA : polyglycolic acid  
PLA : polylactic acid  
PMF : prothèse maxillo-faciale  
PMMA : polymethylmetharylic acid  
PRF : plasma riche en fibrine  
PRP : plasma riche en plaquettes  
PSA : perte de substance acquise  
PSAI: perte de substance acquise interruptrice  
PSAM : perte de substance acquise maxillaire  
PSANI : perte de substance acquise non interruptrice  
PVC : chlorure de polyvinyle  
rhBMP2 : recombinant human bone morphogenetic protein-2  
RMeS : regenerative medicine and skeleton  
SOAR : substitut osseux auto-réticulant  
TDM : tomodensitométrie  
TGF $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
TNM : tumeurs, nodules, métastases  
TRAP : tartrate resistant acid phosphatase  
UICC : union internationale contre le cancer  
UTE : unité de thérapeutique expérimentale  
UV : ultra-violet  
VADS : voies aérodigestives supérieures  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

## Liste des figures

Figure 1 : Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien comblés avec SOAR sans BMP2: a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.

Figure 2: Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien implantés avec le mélange SOAR chargé en BMP2 (0,2 mg/mL): a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.

Figure 3: Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien comblés avec le mélange IBS2 + BMP2 (0,2 mg/mL) ; IBS2 : 40% BCP / 60% HPMC-Si non réticulé lors de l'implantation : a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.

Figure 4: images  $\mu$ CT en 3D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-implantation. Les défauts ont été comblés avec : a) SOAR sans BMP2, b) SOAR avec BMP2, c) GOA, d) SOAR avec BMP2.

Figure 5: images MEB en 2D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-mortem sur échantillon métallisé Au-Pd de SOAR SANS BMP2. Seuillage de gris des composants dans la région d'intérêt : a, b, c, d) os en gris, biomatériau en blanc, tissu mou en noir ; e) os en jaune, biomatériau en rouge, tissu environnant en noir. **p)** proximal, **d)** distal.

Figure 6: images MEB en 2D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-mortem sur échantillon métallisé Au-Pd de SOAR AVEC BMP2. Seuillage de gris des composants dans la région d'intérêt : a, b, c, d) os en gris, biomatériau en blanc, tissu mou en noir ; e) os en jaune, biomatériau en rouge, tissu mou en noir. **p)** proximal, **d)** distal.

Figure 7: effet de la BMP sur le potentiel du SOAR à induire la néoformation osseuse dans les défauts d'ulna de chien.

Figure 8: effet de la BMP sur la résorption des granules de BCP dans les défauts ulnaires de chien.

Figure 9: coloration de MOVAT et HES à 20 semaines sur des échantillons comblés avec SOAR sans BMP2. MOVAT : a, b, c) os en jaune/vert ; BCP (\*) en bleu ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical; HES : d) grossissement X 200 : BCP en gris, collagène en rose pâle.

Figure 10: coloration de MOVAT et HES à 20 semaines sur des échantillons comblés avec SOAR avec BMP2. MOVAT : a, b, c) os en jaune/vert ; BCP (\*) en bleu/blanc ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical; HES : d) grossissement X 200 : os et tissu ostéoïde en rose foncé/mauve, BCP en gris, tissu mou en rose pâle.

Figure 11: coloration de MOVAT à 20 semaines sur des échantillons de contrôle GOA. Os en jaune/vert ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical.

Figure 12: images  $\mu$ CT en 3D de défauts de calvaria à 8 semaines post-implantation. Défauts comblés avec : a) HMPC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

Figure 13: Action de la BMP sur le potentiel des différents substituts à induire la néoformation osseuse. Données au  $\mu$ CT 3D.

Figure 14: image MEB en 2D de défauts de calvaria à 8 semaines post-mortem sur échantillon métallisé Au-Pd. Seuillage de gris des composants dans la région d'intérêt : os en gris, biomatériau en blanc, tissu mou en noir. Défauts comblés avec : a) HMPC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

Figure 15: Action de la BMP sur le potentiel des différents substituts à induire la néoformation osseuse. Données au  $\mu$ CT 2D.

Figure 16: Coloration de Goldner à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si. Le tissu minéralisé apparaît en vert, le biomatériau en blanc, le tissu conjonctif et ostéoïde en gris.

Figure 17: Coloration de Movat à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si. Le tissu osseux apparaît en jaune/vert, le biomatériau en bleu/blanc, le tissu conjonctif en rouge pâle.

Figure 18: Coloration HES à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5 (zoom x 10 des zones d'intérêt). Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si. Tissu osseux en rose foncé/mauve, BCP en gris, tissu mou en rose pâle.

Figure 19: Coloration TRAP à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si. Cellule TRAP + multinucléée observée dans la condition HPMC-Si + BCP + BMP (a), en encadré.

Figure 20: Coloration CD68 à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si, c) HPMC-Si. Monocytes et macrophages observés avec les conditions expérimentales CHI-Si + HPMC-Si (b) et HPMC-Si (c).

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification TNM des carcinomes épidermoïdes des VADS selon l'UICC (2002)

Tableau II : classification des PSAM selon Brown (2000)

Tableau III : classification à visée thérapeutique des FLAP de Destruhaut

Tableau IV: quantification de la surface occupée par les différents composants tissulaires au MEB (mm<sup>2</sup>) selon le substitut osseux utilisé

Tableau V: synthèse de la quantification des tissus dans les défauts ulnaires selon SOAR +/- BMP2

Tableau VI: test statistique de l'action de la BMP sur la repousse osseuse

Tableau VII: test statistique de l'action de la BMP sur le biomatériau

Tableau VIII: rapport Ca/P comparatif entre os néoformé et os natif

Tableau IX: répartition des conditions d'implantation dans les défauts de calvaria

Tableau X: % quantitatif de néoformation osseuse par seuillage de gris au micro-CT 3D dans la région d'intérêt du défaut de calvaria de rat

Tableau XI: % quantitatif de granules de BCP résiduels par seuillage de gris au micro-CT 3D dans la région d'intérêt du défaut de calvaria de rat

Tableau XII: % quantitatif de néoformation osseuse par seuillage de gris au MEB 2D au niveau de la région d'intérêt du défaut de calvaria de rat

Tableau XIII: % quantitatif de granules de BCP résiduels par seuillage de gris au MEB 2D au niveau de la région d'intérêt du défaut de calvaria de rat

Tableau XIV : Rapport Ca/P comparatif entre os néoformé par CHI-Si + HPMC-Si + BMP et SOAR + BMP

## **Résumé**

Les pertes de substance osseuses cranio-maxillo-faciales nécessitent une réhabilitation des fonctions manducatrices, l'esthétique et le psychisme. La greffe osseuse autologue (GOA) reste le « gold standard » mais peut-être associé à une morbidité du site donneur; d'où la nécessité d'une alternative. L'utilisation de produits d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) demeure un challenge pour les cliniciens et les chercheurs.

Leur succès dépend essentiellement de l'interaction entre le biomatériau support, les morphogènes utilisés. Les stratégies d'ITO, médiées par la BMP2, présentent des limites. Pour y remédier, différents systèmes de délivrance des protéines sont étudiés ou testés.

Ce travail contribue au développement d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR), améliorant l'efficacité locale de BMP2 et la régénération de perte de substance osseuse. Pour ce faire, nous développons un biomatériau composite constitué de phosphate de calcium biphasé (BCP) et d'un hydrogel d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé (HPMC-Si). L'hypothèse est que le relargage progressif de BMP2 induirait la régénération osseuse sans engendrer d'effets indésirables.

Les résultats obtenus permettent de considérer ce biomatériau composite comme une alternative prometteuse à la greffe. Des investigations supplémentaires, pour une meilleure efficacité et sécurité, s'avèrent nécessaires en vue d'un transfert en clinique humaine.

### **Mots clés :**

Prothèse maxillo-faciale, hydrogel, phosphate de calcium, biomatériau composite, protéine ostéogénique osseuse (BMP2), ingénierie tissulaire osseuse, perte de substance, régénération osseuse.

# CONTRIBUTION TO THE DEVELOPMENT OF SELF-CROSS-LINKABLE BONE SUBSTITUTE FOR MAXILLOFACIAL BONE TISSUE ENGINEERING

## **Abstract :**

Cranio-maxillofacial bone loss requires rehabilitation of the manducatory functions and aesthetics. Autologous bone graft (ABG) remains the gold standard but may be associated with donor site morbidity; hence the need for an alternative. The use of bone tissue engineering (BTE) products remains a challenge for clinicians and researchers.

Their success depends essentially on the interaction between the biomaterial and the morphogens used. BTE strategies, mediated by BMP2, have limitations. To remedy this, different protein delivery systems are studied or tested.

This work contributes to the development of a self-crosslinking bone substitute (SCBS), improving the local efficiency of BMP2 and the regeneration of bone loss.

Therefore, we develop a composite biomaterial consisting of two phases, calcium phosphate granules (BCP) and a silanized hydroxypropyl-methylcellulose hydrogel (Si-HPMC). The hypothesis is that the gradual release of BMP2 induces bone regeneration without causing any undesirable effects. The results obtained make it possible to consider this composite biomaterial as a promising alternative to grafting. Additional investigations, for better efficiency and safety, are needed for a transfer to human clinic.

## **Keywords:**

Maxillofacial prosthesis, hydrogel, calcium phosphate, composite biomaterial, bone morphogenetic protein-2 (BMP2), bone tissue engineering, critical size defect, bone regeneration.

# CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT DE SUBSTITUTS OSSEUX AUTO-RETICULANTS EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE MAXILLO-FACIALE

## 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Historique de la prothèse maxillo-faciale (PMF)

La prothèse maxillo-faciale (PMF) est une discipline importante située à l'interface de plusieurs spécialités médico-chirurgicales et odontologiques. Elle est sans doute l'une des plus anciennes disciplines ayant pour vocation la réhabilitation du corps humain en général, et maxillo-faciale en particulier.

En effet, la volonté de dissimuler les anomalies innées ou acquises du visage remonte à la plus haute antiquité, notamment près de trois millénaires avant notre ère [1]. Le visage, en plus de regrouper tous les organes des sens ainsi que des fonctions vitales, représente l'image de « soi » véhiculé et perçu par l'entourage ; d'où la nécessité pour l'Homme, d'améliorer son apparence. Ainsi, les techniques et moyens de reconstitution de la face ont connu des progrès avec le temps.

Au décours de fouilles archéologiques, des pièces faciales ont été retrouvées sur les visages de momies, dans des tombeaux de l'Ancienne Egypte. Ces masques faciaux destinés à dissimuler l'altération du visage, sont considérés comme les balbutiements de la prothèse maxillo-faciale. Il s'agissait de pièces cosmétiques dorées ou argentées, en bois, en terre cuite, en métal etc... Khaidem et al. [2] ont rapporté l'existence de prothèse oculaire dans la culture de l'Ancienne Chine. Cependant, ces épithèses seraient placées en post mortem.

Au XVI<sup>ème</sup> siècle, la PMF est reconnue comme un moyen de réhabilitation à part entière sous l'impulsion d'Ambroise Paré (1510-1590), considéré comme « le père » de la prothèse maxillo-faciale. Ce chirurgien a pu établir la complémentarité entre la chirurgie et la prothèse, en proposant après des interventions mutilantes, des épithèses de reconstitution. Ces prothèses faciales externes (yeux artificiels, pyramides nasales...) étaient maintenues par différents artifices à types de bandelettes métalliques, de lacets, masqués dans la chevelure.

A partir du XVIII<sup>ème</sup> siècle, le chirurgien-dentiste Pierre Fauchard (1678-1761) contribua de façon notoire à la reconstruction maxillo-faciale. Il réalisa une prothèse faciale en argent comprenant une mandibule articulée aux maxillaires et restaurant lèvre, joue et menton ; celle-ci fut dissimulée sous une grande moustache afin de remplacer les séquelles de mandibulectomie chez un soldat.

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, des praticiens comme William Morton (1819-1868), Claude Martin (1843-1911) donnèrent à la PMF une dimension médicale par l'apport de

la technologie prothétique à la chirurgie maxillo-faciale. La révolution industrielle permit aussi le développement de nouveaux matériaux comme la vulcanite, le caoutchouc et les céramiques translucides, mieux appropriés à la réalisation de prothèses maxillo-faciales.

Au XX<sup>ème</sup> siècle, les deux Guerres Mondiales avec leurs cortèges de graves mutilations, ont permis un développement de la chirurgie réparatrice de la face, l'essor de la réhabilitation par prothèse faciale ainsi que la recherche sur les matériaux. L'introduction des résines acryliques en 1937 dans la profession dentaire a permis d'améliorer considérablement la prise en charge des pertes de substance de la face. Leur facilité de coloration et de mise en œuvre les ont rendues attractives aussi bien pour les réhabilitations intraorales qu'extraorales, malgré leur rigidité. Les matériaux souples tels que les chlorures de polyvinyle (PVC) et les élastomères de silicone sont des biomatériaux de choix dans la confection d'épithèses. Cependant, les PVC changent de teinte au contact des liquides biologiques, d'où leur tendance à l'abandon. Les élastomères de silicone présentent de meilleures propriétés de résistance vis-à-vis des facteurs exogènes tels que les rayons UV, la chaleur, les substances chimiques...

Au troisième millénaire, les avancées dans la chimie des polymères ont donné un regain d'intérêts dans le développement de nouveaux matériaux pour les prothèses maxillo-faciales. De même, les technologies de pointe comme le prototypage rapide, la technique CAD-CAM sont introduites et maintenant utilisées dans le domaine des prothèses maxillo-faciales. Les nouvelles thérapies comme l'ingénierie tissulaire et la médecine régénératrice font également leurs premiers pas dans la réhabilitation maxillo-faciale.

## 1.2. Définition de la PMF

La prothèse maxillo-faciale se définit comme l'art et la science de la reconstruction artificielle du massif facial dans les cas de pertes de substance acquises ou de malformations congénitales ; donc par des procédés non chirurgicaux.

Selon le Larousse, la prothèse est définie comme un dispositif implanté dans l'organisme pour suppléer un organe manquant ou pour restaurer une fonction compromise. Cependant, étymologiquement, la prothèse vient du terme grec « *Pro* » : « au lieu de », et « *Tithêmi* » : « placer » ; c'est un dispositif de remplacement d'un organe ou d'une partie du corps totalement ou partiellement, reproduisant la même forme et si possible rendant les mêmes services fonctionnels.

De même, le terme épithèse est issu du grec « *Epi* » : « sur, au-dessus », et « *Tithêmi* » : « placer » ; il s'agit d'un dispositif destiné à remplacer un organe situé à une extrémité du corps.

Le terme orthèse vient du grec « *Ortho* » : « droit », et « *Tithêmi* » : « placer » ; c'est un dispositif destiné à protéger, à immobiliser ou à soutenir le corps ou une de ses parties à laquelle il est directement fixé.

Ces notions permettent, entre autres, d'aborder les principes de la PMF.

### 1.3.Principes généraux

Ils découlent des domaines où les procédés chirurgicaux seuls ne suffisent pas à prendre en charge la pathologie consécutive : à l'exérèse carcinologique, aux agénésies et/ou anomalies congénitales, aux traumatismes.

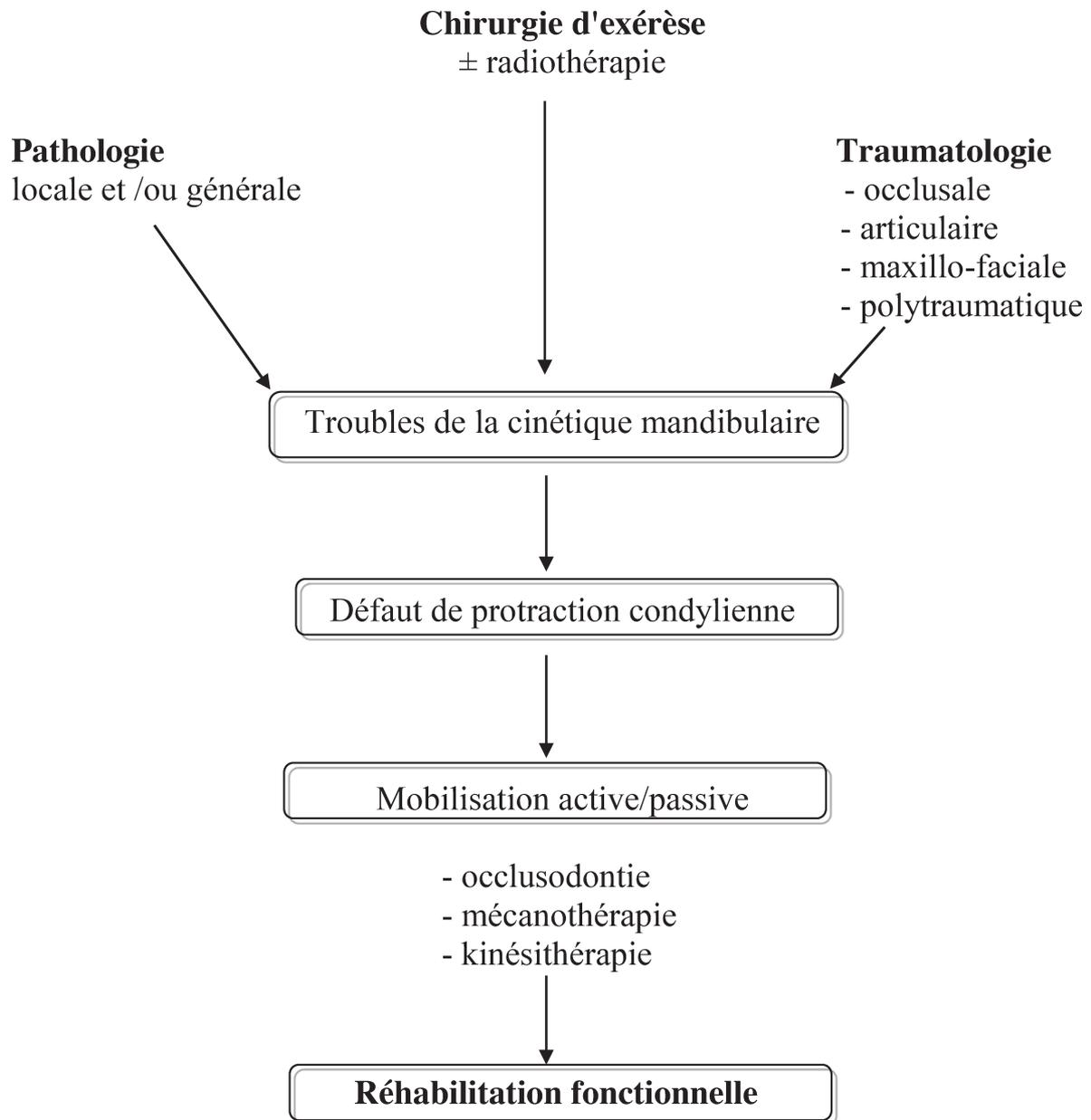
Les principaux objectifs de la réhabilitation et prothèse maxillo-faciale comprennent la restauration de l'esthétique et des différentes fonctions, la protection des tissus, l'effet thérapeutique de guérison, la réinsertion psychosociale [274].

La restauration de l'esthétique chez un patient présentant des défauts graves de la face et de la tête est un précieux service rendu par la PMF dans un contexte dramatique. Le remplacement de pertes de substance maxillo-mandibulaire, de la pyramide nasale, du pavillon de l'oreille, de la région oculo-palpébrale, ou la construction d'un dispositif reconstituant le contour manquant du visage ou du crâne, nécessite une grande compétence clinique ainsi que l'utilisation des matériaux disponibles. Le but dans chaque situation clinique est de réaliser une prothèse restaurant le défaut, améliorant l'esthétique ainsi que le psychisme du malade. L'appareil peut être temporaire dans les cas de patients devant subir une chirurgie plastique de remplacement des pertes de substance consécutives à des accidents, à des blessures balistiques ou à des exérèses chirurgicales. Ou bien, la prothèse peut être d'usage lorsque la chirurgie est contre-indiquée, notamment chez certains patients atteints de tumeurs néoplasiques. Dans les deux cas de figures, un appareil garantissant un grand confort et une sécurité au patient devrait être confectionné.

Dans certaines situations, des dispositifs prothétiques peuvent être conçus uniquement pour protéger les tissus sains adjacents, notamment les boucliers de protection en plomb ou en radium contre les effets des traitements ionisants, les masques protecteurs pour les greffes de peau cranio-céphaliques. Dans d'autres cas, ils sont conçus principalement comme dispositifs curatifs tels que les prothèses porte-aiguilles d'iridium ( $\text{Ir}^{192}$ ) dans la curie thérapie interstitielle ou les attelles utilisées en période postopératoire immédiate. Sous une autre approche,

le rôle éminemment fonctionnel de la PMF ne peut être nié. En effet, elle peut d'abord servir de préparation tissulaire à un geste chirurgical, et ensuite dans le sens d'une rééducation fonctionnelle mettant en œuvre des techniques dynamiques visant à atténuer ou à récupérer une fonction altérée au décours d'une chirurgie, par les effets secondaires d'une radio-chimiothérapie ou par des séquelles de pathologie locale ou générale. La prise en charge des limitations de l'ouverture buccale liées aux désordres cranio-mandibulaires (constriction permanente ou temporaire) apparaît dans ce contexte.

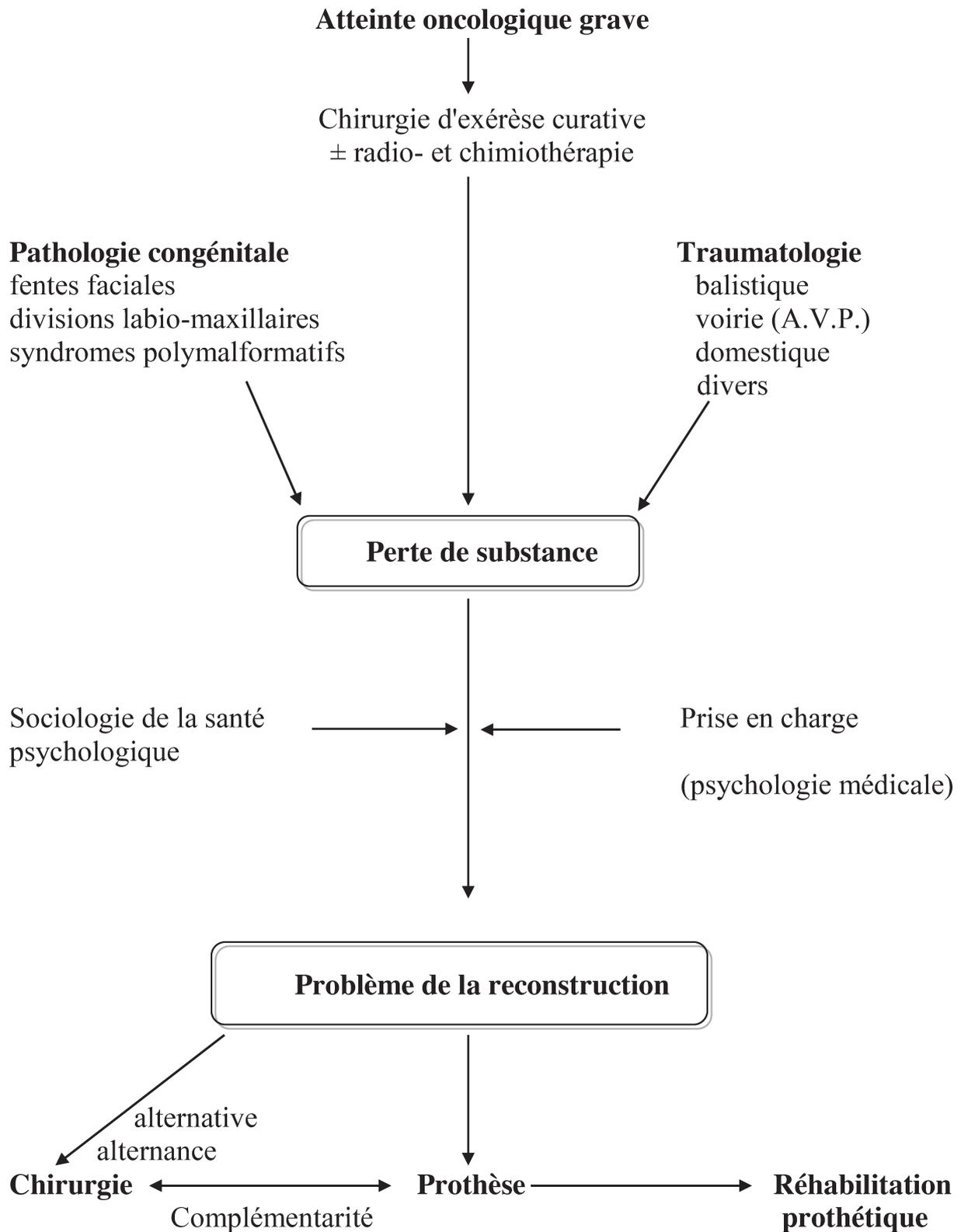
# LA REHABILITATION FONCTIONNELLE MAXILLO-FACIALE



L'amélioration apportée à l'esthétique et à la fonction est non seulement essentielle pour le bien-être physique du malade, mais contribue également à son épanouissement psychologique et moral. En effet, l'impact des tumeurs et des pertes de substance acquises secondaires à l'exérèse carcinologique ou d'autres formes thérapeutiques, semble souvent spectaculaire et pousse le patient à développer une attitude de résignation ou de désespoir. Il ne suffit pas seulement de mettre en place un traitement définitif pour contrôler ou guérir le patient de sa maladie. Souvent, d'importants efforts sont nécessaires pour lui redonner une apparence normale et des fonctions suffisantes afin de rétablir l'espoir et lui redonner l'ambition de mener une vie psychosociale utile. L'entourage familial joue également un rôle important dans la prise en charge des patients de PMF, dans le cadre d'une relation d'aide [4].

La pratique de la PMF se conçoit dans le cadre d'une démarche médicale, en collaboration étroite avec des techniques chirurgicales ; c'est la notion de prise en charge pluridisciplinaire ou symbiose chirurgico-prothétique.

## LA SYMBIOSE CHIRURGICO-PROTHETIQUE



La symbiose chirurgico-prothétique favorise le respect des impératifs de rétention, de stabilisation, de sustentation et d'étanchéité, ainsi que les conditions opératoires de réalisation et l'intégration occluso-fonctionnelle de la future prothèse maxillo-faciale. Les défauts maxillo-faciaux à l'origine d'une réhabilitation chirurgico-prothétique peuvent être d'ordre congénital, traumatique et carcinologique.

## 1.4. Etiologie des pertes de substance maxillo-faciales

### 1.4.1. Les pertes de substance congénitales

#### 1.4.1.1. Définition et données épidémiologiques

Les fentes labio-alvéolo-palatines (FLAP) sont les malformations congénitales faciales les plus fréquentes. Elles correspondent à l'interruption de la continuité d'une partie ou de la totalité du palais primaire et/ou du palais secondaire, du fait d'un arrêt prématuré de leur développement embryonnaire. En effet, pendant l'organogenèse, les bourgeons de la face connaissent un développement volumétrique, une coalescence épiblastique et une mésodermisation. L'absence ou le défaut de mésodermisation va empêcher l'accolement et la fusion des bourgeons faciaux qui vont laisser apparaître une déhiscence sous l'action de la musculature et induire la formation de fentes faciales.

Ces dysmorphoses sont très polymorphes et leur répartition géographique est très variable. La fréquence des FLAP est beaucoup plus élevée dans certaines régions du monde comme le Japon et la Malaisie; et chez certaines populations comme les indiens nord-américains. Elle est par contre plus faible dans les populations mélanodermes. On recense 1 cas sur 700 à 1000 naissances chez les leucodermes, et 1/2500 naissances chez les mélanodermes [5, 6, 7, 8, 11]. En France, toutes variétés confondues, ces malformations touchent 1 sur 800 naissances.

Ces malformations ont en commun, la provocation de troubles fonctionnels (de respiration, de déglutition et surtout d'élocution), esthétique, mais aussi psychologique et social.

#### 1.4.1.2. Rappel embryologique :

De la fécondation à l'âge adulte, l'être humain va croître de façon très inégale, aussi bien dans l'espace que dans le temps. A la 4<sup>ème</sup> semaine du développement intra-utérin, l'embryon mesure 1mm et présente une double courbure au niveau de la nuque et du vertex. Sur l'extrémité céphalique de l'embryon vont apparaître précocement 5 bourgeons groupés autour de la cavité buccale primitive ou stomodeum, fermée par la membrane bucco-pharyngienne:

- 1 bourgeon impair médian : le bourgeon naso-frontal ;
- 4 bourgeons latéraux : 2 bourgeons maxillaires supérieurs et 2 bourgeons maxillaires inférieurs issus du 1<sup>er</sup> arc branchial.

Le bourgeon naso-frontal, contenant le proencéphale, émet à la 4<sup>ème</sup> semaine les placodes optiques, futures placodes cristalliniennes ; et à la 5<sup>ème</sup> semaine, les placodes olfactives. Les bourgeons sont constitués d'un noyau mésenchymateux central recouvert d'ectoblaste. Entre la 4<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine (S<sub>4</sub>-S<sub>10</sub>) de la vie intra-utérine, ces bourgeons vont se diviser, s'accoler et fusionner ; le tout se passant autour d'un axe médian qui deviendra le canal palatin antérieur (ou foramen incisif).

#### 1.4.1.3. Formation du palais primaire

Le palais primaire se forme en avant du canal palatin antérieur entre S<sub>4</sub>-S<sub>7</sub> par une confluence se faisant de l'arrière vers l'avant. Il donnera le seuil narinaire, la lèvre supérieure, le vestibule, les procès alvéolaires et la partie toute antérieure du palais osseux (prémaxillaire).

Le bourgeon frontal descend verticalement entre les deux bourgeons maxillaires supérieurs. Il se subdivise lui-même en quatre bourgeons médians : les deux internes se soudent pour former le bourgeon nasal interne ; les deux autres externes forment de chaque côté un bourgeon nasal externe (droit et gauche).

Ces bourgeons sont des masses de mésoderme recouvertes d'ectoderme. Au cours de leur confluence, cet ectoderme va se résorber et le mésoderme va fusionner, s'interpénétrant, réalisant ainsi une mésodermisation.

#### 1.4.1.4. Formation du palais secondaire

Entre la 6<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine, en arrière du canal palatin antérieur, se forme le palais secondaire qui comporte la majorité du palais osseux et le voile. Le palais secondaire est formé par la coalescence sur la ligne médiane d'une structure verticale : le septum nasal issu du bourgeon frontal ; de deux lames horizontales : les processus palatins issus des bourgeons maxillaires supérieurs.

L'abaissement de la langue permet la fusion de ces structures qui séparent ainsi la cavité buccale des fosses nasales. Le redressement de ces structures est dû à des phénomènes physico-chimiques (synthèse et hydratation de l'acide hyaluronique, et orientation des cellules mésenchymateuses, du collagène) et leur soudure, à l'apoptose des cellules ectoblastiques de recouvrement. Au plan

structural, l'ossification enchondrale des condensations mésenchymateuses aboutit à la formation du palais dur et le tassement du mésenchyme myogène à celle du palais mou.

La fusion se fait de l'avant vers l'arrière, à partir du canal palatin antérieur. Une absence de fusion de ces processus palatins (par défaut de migration linguale ou rupture secondaire de la ligne de fusion) détermine des fentes vélo-palatines.

#### 1.4.1.5. Physiopathologie

##### 1.4.1.5.1. Rappels anatomophysiologiques

Topographiquement, la voûte palatine ou palais osseux est constituée au niveau :

Des 2/3 antérieurs par les apophyses palatines des maxillaires ;

Du 1/3 postérieur par les lames horizontales des os palatins.

La voûte palatine est ceinturée par l'arcade alvéolo-dentaire ou processus alvéolaire des os maxillaires.

Le voile s'insère sur le bord postérieur des lames horizontales des palatins et par ses piliers antérieur et postérieur, sur le squelette et le pharynx.

Dans les conditions normales, l'étanchéité entre l'oropharynx et le rhinopharynx est obtenue principalement par l'élévation du voile, et accessoirement par le soulèvement de la muqueuse pharyngée.

Le voile est une cloison musculo-membraneuse composée par 5 paires de muscles :

- 1 paire médiane : azygos de la luette ;
- 2 paires ascendantes :
  - Les péristaphylins internes : éleveurs du voile ;
  - Les péristaphylins externes : tenseurs du voile ;
- 2 paires descendantes :
  - Muscles glosso-staphylins : muscles du pilier antérieur du voile : constricteurs de l'isthme bucco-pharyngien ou isthme du gosier ;
  - Muscles pharyngo-staphylins : muscles du pilier postérieur : ferment l'isthme pharyngo-nasal.

L'innervation de ces muscles est assurée par le pneumogastrique (X) à l'exception du péristaphylin externe innervé par le nerf mandibulaire (tronc commun V<sub>3</sub>).

Les muscles constricteurs supérieurs du pharynx contribuent à réduire la lumière pharyngée dans le sens transversal et sagittal. Lorsqu'il existe une insuffisance vélaire et une déperdition nasale, le

bord supérieur des muscles constricteurs s'hypertrophie et forme le bourrelet de Passavant [12].

#### 1.4.1.5.2. Causes [5, 6, 7, 8, 11]

L'étiologie des fentes faciales n'est pas univoque ; il est admis deux ordres de facteurs pouvant intervenir dans la genèse des FLAP : des facteurs génétiques ou endogènes et des facteurs environnementaux ou exogènes. Ils peuvent agir isolément ou en association : c'est l'hérédité multifactorielle.

##### *1.4.1.5.2.1. Facteurs génétiques ou endogènes*

L'étiologie génétique des fentes labio-palatines non-syndromiques est très complexe. Certains gènes sont dits dominants, c'est dans cette catégorie que se situent les fentes labiales par rapport aux fentes palatines. L'incidence familiale oscille autour de 30 %. Les formes complètes sont plus fréquentes. Plusieurs gènes sont évoqués dans l'apparition des fentes bucco-faciales non-syndromiques: les gènes du facteur de croissance transformant  $\alpha$  et  $\beta$  (TGF $\alpha$  et TGF $\beta$ ), les gènes homéobox (MSX1 et MSX2), le récepteur de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), la méthionine synthétase, le récepteur de l'acide rétinoïque... (liste non exhaustive). Le chromosome 8(8q24.21) jouerait un rôle clé selon Birnbaum et al [9]. En effet, le bras long de ce chromosome (locus 640-kb) contient de multiples marqueurs associés aux phénotypes des fentes, qui seraient retrouvés aussi bien dans les fentes labiales que palatines, dans les formes non-syndromiques.

##### *1.4.1.5.2.2. Facteurs environnementaux ou exogènes*

L'évaluation de ces facteurs passe par la tératogénèse expérimentale. Actuellement, deux facteurs environnementaux principaux sont retenus comme favorisant : l'épilepsie et la carence en acide folique.

- L'épilepsie  
Les mères épileptiques ont davantage d'enfants malformés, les fentes venant au premier rang. C'est la fréquence des crises et non le traitement qui serait à l'origine des malformations.
- La carence en acide folique  
Ainsi, l'alcool et la fièvre maternelle (hyperthermie) au cours du premier trimestre de la grossesse agiraient indirectement en entraînant une carence maternelle en acide folique.

Certains facteurs physiques, mis en cause il y a quelques années, ne semblent plus être retenus aujourd'hui. Cependant, de par leur caractère sporadique, nous nous devons de les citer : l'âge parental, le tabagisme, la carence en riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>),

l'hypervitaminose A, les irradiations, le diabète mal équilibré, certaines infections (rubéole, toxoplasmose, V.I.H.), certaines substances chimiques (antiémétiques, diazépam, corticoïdes, Thalidomide®...)

Il existerait une interaction entre facteurs génétiques et environnementaux, c'est l'hérédité polygénique multifactorielle à seuil d'après Carter (1965) [10].

Les fentes labio-maxillo-palatines seront à l'origine de troubles divers.

#### 1.4.1.6. Conséquences

Les conséquences physiologiques sont beaucoup plus importantes dans les fentes vélo-palatines que dans les fentes labio-alvéolaires.

##### 1.4.1.6.1. Respiration

La respiration sera très perturbée surtout chez le jeune enfant présentant une communication bucco-nasale. La diminution du réchauffement de l'air inspiré et les fausses routes alimentaires peuvent être la cause de rhinopharyngite, d'infection pulmonaire.

##### 1.4.1.6.2. Déglutition

Le nouveau-né présentant une division vélo-palatine s'alimente difficilement, la pression de succion étant diminuée. Cependant, avec l'âge, une adaptation pourra se faire, contrairement à ce qui se passe dans les pertes de substance acquises.

##### 1.4.1.6.3. Phonation - Elocution

Le trouble essentiel entraîné par ces divisions est d'ordre phonétique. Le son se forme au niveau des cordes vocales à partir de l'air brassé par les poumons. Le langage correspond à une modification du son au niveau du pharynx, de la cavité buccale et des fosses nasales. Le langage est composé par deux éléments : l'articulation et le timbre.

- L'articulation du langage est constituée :
  - par blocage de la colonne d'air puis sa libération : ce sont les phonèmes occlusifs P, B, T ;
  - en canalisant l'air et en le laissant sortir par un orifice étroit : ce sont les phonèmes constrictifs : S, V, F ;
  - en associant les deux : ce sont les phonèmes mixtes : X.
- Le timbre de la voix : c'est un phénomène de résonance lié à la forme et au volume de la cavité buccale et du cavum. Il ne concerne que les voyelles. Celles-ci se prononcent le voile étant fermé. En conséquence, un malade porteur de division vélo-palatine est incapable de prononcer les voyelles. Il compense la déficience vélaire :

Par des coups de glotte (son comprimé au niveau des cordes vocales) ;

Par le souffle rauque (débit d'air réglé par une position postérieure de la langue).

D'autre part, une fuite d'air peut entraîner des appuis linguaux erronés.

#### 1.4.1.6.4. Croissance faciale

Le maxillaire est plus large à la naissance chez les porteurs de fente et plus étroit à l'âge de trois ans. Le septum nasal peut distancer les segments osseux latéraux, aggravant la déformation. Les conséquences des lésions musculaires sont inévitables, évolutives et variables en fonction des individus.

On peut également noter une déformation oblique ovalaire de l'arcade alvéolaire supérieure, une déformation arciforme mandibulaire induisant un développement lingual postérieur en s'élargissant et en se raccourcissant, un trouble de l'articulé, une dysharmonie dento-maxillaire, une dysharmonie maxillo-mandibulaire. Ceci peut provoquer ultérieurement des malpositions dentaires, des germes surnuméraires et/ou des agénésies concernant surtout les incisives latérales. [8, 12]

#### 1.4.1.6.5. Pronostic

Avec le développement des techniques chirurgicales, la majeure partie des fentes labio-maxillaires bénéficie actuellement d'un traitement chirurgical efficace. Néanmoins, l'absence de chirurgie ou les échecs peuvent entraîner une atrophie des muscles péristaphylins internes et externes, une hypertrophie du bourrelet de Passavant.

Dans les fentes labio-alvéolaires, le préjudice est presque uniquement esthétique. Plus tard, les anomalies de l'articulé peuvent gêner l'articulation de certains phonèmes. Cependant, il ne faudra pas occulter les problèmes familiaux et sociaux engendrés par les divisions labio-vélo-palatines, avec leurs différentes formes.

#### 1.4.1.7. Formes cliniques – Classifications [11, 13, 14, 15]

Plusieurs classifications des FLAP ont été proposées, toutes établies sur des bases différentes.

##### 1.4.1.7.1. Classification de Veau

Elle repose sur une base anatomique. Cependant, elle ne tient pas compte des fentes purement labiales.

##### *1.4.1.7.1.1. Divisions simples du voile*

- Division totale du voile ;
- Division partielle du voile ;
- Division de la luette seule ;

- Division sous muqueuse.

#### *1.4.1.7.1.2. Division du voile et de la voûte palatine*

- Fente totale du voile associée à une division partielle ou totale du palais secondaire osseux ;
- Etroite ou large ;
- Uni- ou bilatérale (selon le rapport avec le vomer).

#### *1.4.1.7.1.3. Division vélo-palatine associée à une fente labio-alvéolaire unilatérale*

- Plus fréquente ;
- Division vélo-palatine toujours située du côté de la fente labio-alvéolaire unilatérale ;
- Malposition dentaire ;
- Agénésie de l'incisive latérale (si fente labio-alvéolaire située entre incisive centrale et canine).

#### *1.4.1.7.1.4. Division vélo-palatine associée à une fente labio-alvéolaire bilatérale*

- Tubercule médian (philtrum et table alvéolaire incisive) isolé et projeté en avant ;
- Vomer suspendu au fond de la fente ;
- Anomalies dentaires.

### 1.4.1.7.2. Classification internationale de Kernahan, Stark et Harkins

Elle repose sur une base embryologique.

#### *1.4.1.7.2.1. Division du palais primaire (3 groupes)*

- I<sub>A</sub> : fente unilatérale incomplète (1/3 ; 2/3 ; 3/3 de la lèvre) ;
- I<sub>B</sub> : fente unilatérale complète (1/3 ; 2/3 alvéolaire) ;
- I<sub>C</sub> : fente bilatérale complète (3/3 alvéolaire).

#### *1.4.1.7.2.2. Division du palais secondaire (2 groupes)*

- II<sub>D</sub> : fente incomplète du palais secondaire :
  - Voile = Staphyloschizis : 1/3 ; 2/3 ; 3/3 ;
  - Palais osseux = Uranoschizis : 1/3 ; 2/3 ; 3/3.
- II<sub>E</sub> : fente vélo-palatine complète = Palatoschizis.

#### *1.4.1.7.2.3. Divisions associées des palais primaire (Ire) et secondaire (IIre) (3 groupes)*

- III<sub>F</sub> : fente unilatérale complète des palais Ire et IIre ;

- III<sub>G</sub> : fente bilatérale complète des palais Ire et IIre ;
- III<sub>H</sub> : fente unilatérale incomplète des palais Ire et IIre :
  - Avec un pont labial ;
  - Avec un pont gingival.

#### *1.4.1.7.2.4. Modifications*

- Kernahan propose une schématisation par un « Y rayé » ; il suggère un arc antérieur représentant le palais primaire et une branche postérieure symbolisant le palais secondaire. Les différentes parties de chaque portion sont matérialisées par des « boîtes numérotées ». Une boîte vide signifie l'absence de fente dans cette zone.
- Larson quant à lui, propose une nouvelle illustration du Y en ajoutant deux nouvelles boîtes aux extrémités de l'arc antérieur et correspondant aux seuils nasaux. Des lettres, minuscules ou majuscules, selon que la fente est incomplète ou complète, remplacent les chiffres. En arrière, au niveau du palais osseux, des cases dédoublées représentent l'attachement du Vomer aux lames palatines à droite et à gauche. Au niveau du palais mou, la luette est représentée par une boîte supplémentaire ; et trois cas de figures sont possibles : l'uvule est divisée, ou la fente concerne le palais mou de façon complète ou incomplète.
- Autres formes :
  - Bifidité de la luette : sans incidence fonctionnelle ;
  - Division sous muqueuse : correspondant à l'absence de suture médiane des muscles vélaux sous une muqueuse indemne. L'aspect anatomo-clinique est rassurant alors que le trouble fonctionnel est identique à celui observé dans les vraies fentes vélo-palatines.

#### 1.4.1.7.3. Classification de Benoist

Elle repose sur des bases thérapeutiques et prothétiques ; elle comprend 3 classes.

*1.4.1.7.3.1. Classe I* : voile divisé mais tonique (obturateur dynamique de Suersen) ;

*1.4.1.7.3.2. Classe II* : voile suturé, court mais contractile (obturateur de Schiltsky) ;

*1.4.1.7.3.3. Classe III* : voile inerte, paralytique (obturateur statique de Mazaheri).

Chacune de ces classes peut se subdiviser :

- a. Associée à une fente palatine ;
- b. Associée à une malposition incisive ;
- c. Associée à un édentement partiel ;

d. Associée à un édentement complet.

Cette classification ne tient pas compte de la nature uni- ou bilatérale de la fente, mais considère les possibilités de contraction ou non des moignons vélares, indispensables au fonctionnement des prothèses vélo-palatines actuelles.

#### 1.4.1.7.4. Classification de Chancholle

Elle est basée sur la gravité de la fente et distingue deux formes : des formes bénignes et des formes graves.

##### 1.4.1.7.4.1. *Formes bénignes*

- PI<sub>1</sub> : fente labiale unilatérale ;
- PI<sub>2</sub> : fente labio-alvéolaire unilatérale ;
- PII<sub>1</sub> : fente du voile

La condition de bénignité est un maxillaire normal ou subnormal.

Caractéristiques tissulaires : bonne qualité, déplacement modéré des fragments, leur remise en place normalisera les fonctions manducatrices et la croissance faciale.

##### 1.4.1.7.4.2. *Formes graves*

- PI<sub>3</sub> : fente labio-alvéolaire unilatérale déformant l'arcade alvéolaire;
- PII<sub>2</sub> : fente palatine totale ;
- PI<sub>3</sub> + PII<sub>2</sub> : fente labio-palatine totale unilatérale.

La condition de gravité est un maxillaire divisé en deux fragments inégaux et déplacés.

Caractéristiques tissulaires : qualité défectueuse, déplacement important, leur remise en place ne normalisera pas les fonctions manducatrices, la croissance faciale, et entrainera une cicatrice.

Autres critères de gravité :

- Bilatéralité des lésions même bénignes ;
- Liés au malade :
  - Hypotrophie globale du nouveau-né de mère trop jeune ou trop âgée ; tabagique, alcoolique, droguée, comitiale ;
  - Nouveau-né issu de grossesse pathologique ;
  - Prématurité ;
  - Associations malformatives (syndromes polymalformatifs)
  - Antécédents héréditaires malformatifs ;
  - Milieu familial déficient.

A la suite des pertes de substance congénitales, nous avons les défauts maxillo-faciaux acquis qui sont en majorité d'origine traumatique, infectieuse, carcinologique.

#### **1.4.2. Les Pertes De Substance Traumatiques**

Elles font souvent suite à des traumatismes relativement violents susceptibles d'induire des lésions d'arrachement et impliquant des défauts pluritissulaires. L'étiologie traumatique peut être d'ordre involontaire ou volontaire.

Les traumatismes involontaires concernent les accidents de la voie publique (A.V.P.), les accidents domestiques, sportifs, du travail, les agressions et tentatives d'homicides, des faits de guerre ou des événements assimilés, à l'origine de plaies balistiques souvent transfixiantes voire délabrantes. L'étendue et la gravité des lésions balistiques sont en rapport avec l'énergie des projectiles ; elles sont fonction de la masse et de la vitesse ces derniers.

Les traumatismes volontaires quant à eux comprennent les tentatives d'autolyse par armes à feu. Les armes utilisées sont le plus souvent des pistolets de petit calibre en milieu urbain et des fusils de chasse en zone rurale. Les dégâts balistiques provoqués par les armes de poing moderne (petit calibre mais à haute vitesse) sont nettement plus importants que ceux occasionnés par un fusil de chasse. En effet, si leur canon est appliqué sur la tempe ou introduit dans la bouche, les pertes de substance cranio-encéphaliques et faciales supérieures sont prédominantes. En revanche, un fusil de chasse posé sous le menton, entraîne de graves lésions au niveau mandibulaire ; celles-ci pouvant plus ou moins épargner l'étage moyen de la face et le crâne.

Les pertes de substance observées sont comparables à celles consécutives aux excrèses carcinologiques. Cependant, contrairement à ces dernières, les tissus environnants sont sains, non irradiés et les patients ne présentent pas d'altération de l'état général. La reconstruction de l'étage mandibulaire peut être faite par des techniques de greffes osseuses, de microchirurgie par lambeaux et/ou de distraction ostéogénique. En revanche, celle de l'étage moyen est plus délicate du fait de sa spécificité anatomique. Dans tous les cas, la reconstruction chirurgicale est privilégiée lorsque les résultats sont prometteurs. Malheureusement, cela n'est pas toujours possible ; d'où la nécessité de la symbiose chirurgico-prothétique, surtout chez des patients difficiles à prendre en charge et au profil psychologique exigeant.

L'étiologie traumatique concerne aussi les brûlures faciales. Ces défauts peuvent se manifester sous la forme d'une atteinte de la pyramide nasale, du pavillon de l'oreille, d'une fibrose cutanée compliquant de façon notoire les techniques de chirurgie plastique et réparatrice de la face.

D'autre part, il faut prendre en compte des pertes de substance secondaires avec ou sans défaut initial, consécutives à une nécrose entraînant une élimination de séquestre, ou à une dévascularisation comme dans la vascularite de Wegener à localisation maxillaire [18]. Ces nécroses aseptiques des maxillaires sont des cas exceptionnels avec une incidence 20 à 30 fois moins importante qu'à la mandibule à cause de la vascularisation de l'os et à ses qualités mécaniques [19].

### **1.4.3. Les Pertes De Substance Infectieuses Et Toxiques**

Il s'agit le plus souvent d'infection évoluant sur un terrain immunodéprimé chez des patients atteints de VIH ou chez des malades transplantés. Ce sont des nécroses maxillaires induites par plusieurs facteurs infectieux, notamment :

- ✓ Viral : herpes virus (entraînant des nécroses alvéolaires), infections à VIH 1 et 2 ;
- ✓ Nécrose osseuse due à la tuberculose ou à la syphilis (sa phase tertiaire induit des perforations palatines et un effondrement de la pyramide nasale) ;
- ✓ Infections mycosiques telles que l'aspergillose, les mucomycoses chez des sujets immunodéprimés ;
- ✓ Noma : au décours de gingivite ulcéro-nécrotique aigue (G.U.N.A.) survenant sur un tableau de malnutrition, dans les pays du tiers monde ;
- ✓ Ostéites.

L'étiologie toxique est essentiellement due à la pose incorrecte de produits caustiques tels que les dérivés arsénieux ( $As_2O_3$ ), à une ostéoradionécrose (ORN) au décours d'une radiothérapie, ou à une ostéonécrose des maxillaires (ONM) par traitement aux biphosphonates. Il faut mentionner aussi la survenue de nécrose aseptique à la suite d'ostéotomie, en insistant surtout sur les risques liés à la pluri-segmentation.

Cependant, avec l'utilisation moindre des dérivés arsénieux en pratique odontologique et une meilleure précision des rayonnements ionisants, les pertes de substance acquises d'origine toxique deviennent de plus en plus rares, contrairement aux atteintes oncologiques.

### **1.4.4. Les Pertes De Substance Carcinologiques**

#### **1.4.4.1. Définition et données épidémiologiques**

Il s'agit de solution de continuité tissulaire bucco-faciale acquise au décours d'une exérèse chirurgicale des tumeurs cervico-maxillo-faciales. Les tumeurs siégeant au niveau de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et du massif facial, constituent les cancers des voies aéro-digestives supérieures (V.A.D.S.).

Selon le rapport 2012 de la haute autorité de la santé (H.A.S.) [20], 16000 nouveaux cas de cancers des VADS ont été diagnostiqués en France. Il s'agit de

la quatrième localisation tumorale chez les hommes après les cancers broncho-pulmonaires, prostatiques et intestinaux et la quatorzième chez les femmes. En France, le taux de mortalité par cancers des VADS (environ 7500 morts en 2000 soit 3,4%) est la huitième cause de décès par cancers ; il occupe la première place en Europe et le troisième rang mondial derrière Hong-Kong et Singapour [21]. Classiquement, la distinction des tumeurs se fait essentiellement selon leur nature maligne ou bénigne.

Sur le plan histologique, les tumeurs malignes les plus fréquentes au niveau des VADS sont les carcinomes épidermoïdes spinocellulaires dans 90 % des cas, par opposition aux carcinomes basocellulaires. D'autres formes histologiques composent la fraction restante notamment les carcinomes adénoïdes kystiques (cylindromes) développés aux dépens des glandes salivaires accessoires, les sarcomes, les adénocarcinomes, les mélanomes (touchant les muqueuses), les lymphomes malins hodgkiniens ou non.

Les tumeurs bénignes susceptibles d'être à l'origine de résections chirurgicales larges sont rares. Cependant, elles peuvent dans certains cas être localement agressives, aboutissant à des pertes de substance considérables après leur exérèse. Nous distinguons les tumeurs kystiques notamment les améloblastomes, les kératokystes, les kystes radiculo-dentaires ; les tumeurs non kystiques telles que les myxomes, les cémentomes, les fibromes ossifiants « géants ».

Les cancers des VADS touchent généralement plus les hommes que les femmes. Cependant, l'évolution des taux d'incidence par sexe tend à s'inverser avec une diminution de -5% chez les hommes contre une augmentation de +1,6% chez les femmes entre 2000 – 2005 (source H.A.S.). Ces variations sont corrélées à la consommation éthylo-tabagique qui diminue chez l'homme tout en augmentant chez la femme. Le taux de survie à 5 ans avoisine les 40 %.

Le principal facteur de risque pour développer un cancer des VADS est l'intoxication alcoolo-tabagique. Le sujet le plus exposé au carcinome épidermoïde reste un homme âgé de 45 à 65 ans, grand consommateur de tabac et d'alcool, avec une hygiène bucco-dentaire défectueuse, de revenu moyen ou de situation socio-économique précaire. Selon le rapport 2012 de la H.A.S. 90 % des patients porteurs de cancers des VADS sont doublement exposés à l'effet synergique de l'alcool et du tabac. D'autres facteurs de risques tels que les carences vitaminiques "A" chez des sujets malnutris, la mauvaise hygiène bucco-dentaire, l'exposition professionnelle aux poussières de bois, à l'amiante, à l'acide sulfurique, la préexistence de lésion précancéreuse, les virus Epstein-Barr et Papilloma Humain à un degré moindre, sont évoqués comme étant des facteurs favorisants.

Les cancers des VADS sont très polymorphes du fait de leur localisation, de leur taille et de leur aspect. Ils peuvent siéger au niveau de toutes les régions aéro-digestives supérieures et généralement sur les maxillaires, la langue, le plancher buccal, le pharynx. Leur dimension et leur aspect lésionnel sont très variables et peuvent se présenter sous différentes formes : ulcéreuse, bourgeonnante, végétante, érosive, infiltrante, mixte, nodulaire, plus ou moins étendues...La forme ulcéreuse, reposant sur une base indurée plus ou moins infiltrante en profondeur, saignant souvent au contact de la lésion, est la forme la plus répandue de carcinome épidermoïde des VADS. Elle s'accompagne généralement d'une adénopathie satellite du fait de la lymphophilie de ces cancers.

L'exérèse de ces tumeurs va induire des pertes de substance carcinologiques multiformes.

#### 1.4.4.2. Classification des pertes de substance carcinologiques

Les tumeurs des voies aérodigestives supérieures, du fait de leur localisation et forme lésionnelle variées, nécessitent un bilan initial complet passant par un examen clinique et paraclinique.

L'interview (ou interrogatoire) du patient permet d'apprécier ses antécédents médico-chirurgicaux, ses habitudes hygiéno-diététiques, sa motivation voire son profil psychologique.

L'examen exobuccal mené par inspection, palpation et auscultation, est axé sur la symétrie ou non du visage, l'appréciation de la qualité des téguments et des aires ganglionnaires sous mentonnières, sous angulo-mandibulaires, jugulo-carotidiennes, à la recherche d'adénopathies cervico-faciales associées.

L'examen endobuccal apprécie la localisation tumorale, recherche l'existence d'éventuelles lésions précancéreuses ou de néo-localisation, évalue l'hygiène et l'état bucco-dentaires. Cet examen endobuccal est pratiqué de préférence « radiographie panoramique en main ».

Un examen général est effectué avec le médecin traitant ou l'équipe soignante afin de rechercher d'éventuels troubles de la crase sanguine, de l'appareil respiratoire, métabolique, hépatique, viscéral, révélés par des analyses biologiques anormales.

A la suite des examens cliniques, des examens paracliniques basés sur l'imagerie médicale sont demandés. En plus de l'orthopantomogramme évaluant le bilan dentaire et d'éventuelles lyses osseuses signant un envahissement de l'os, la tomodensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peuvent être demandées. La tomodensitométrie permet une appréciation plus précise des structures osseuses en 3D (plans sagittal, frontal, transversal) ainsi que des limites tumorales. L'IRM quant à elle, explore les tissus mous et les aires ganglionnaires

cervico-faciales. Une radiographie thoracique est souvent demandée dans le but d’apprécier l’intégrité du parenchyme pulmonaire et l’absence de métastases médiastinales.

Au terme de ces examens cliniques et paracliniques, une biopsie à visée anatomopathologique peut être effectuée (dans certains cas) afin de confirmer le diagnostic histologique. De même, des explorations complémentaires de type endoscopique de toute la sphère aérodigestive, peuvent être pratiquées. Elles permettent de préciser la localisation, les dimensions tumorales ainsi que son opérabilité et des indications thérapeutiques. Une classification ayant une valeur pronostique de la tumeur peut alors être établie.

#### 1.4.4.2.1. Classification TNM des carcinomes épidermoïdes des VADS

Il s’agit de la classification TNM avec T comme « tumor » (tumeur), N comme « node » (nodule ganglionnaire ou adénopathie), M comme « metastasis » (métastase). Cette classification repose sur les règles de l’Union Internationale Contre le Cancer (UICC) en 2002, comporte plusieurs aspects en fonction de la localisation tumorale. Nous présentons ici celle relative à la cavité buccale, largement utilisée pour les carcinomes épidermoïdes des VADS ; en précisant les extensions tumorales, elle indique la thérapeutique carcinologique, l’opérabilité ou non des tumeurs.

Tableau I : Classification TNM de l’UICC (2002)

<b>T :</b> <b>TUMEUR</b>	<b>T 0</b> : tumeur non détectable
	<b>T is</b> : tumeur in situ
	<b>T 1</b> : tumeur de moins de 2 cm
	<b>T 2</b> : tumeur comprise entre 2 - 4 cm
	<b>T 3</b> : tumeur supérieure à 4 cm
	<b>T 4</b> : tumeur dépassant la cavité buccale, avec des signes d’envahissement musculaire profond et osseux
<b>N :</b> <b>ADENOPATHIE (GANGLION)</b>	<b>N 0</b> : absence d’adénopathie palpable
	<b>N 1</b> : ganglion unique, homolatéral, inférieur à 3 cm
	<b>N 2a</b> : ganglion unique, homolatéral, compris entre 3 - 6 cm
	<b>N 2b</b> : ganglions multiples, homolatéraux, inférieurs à 6 cm
	<b>N 2c</b> : ganglions multiples, bilatéraux ou controlatéraux, inférieurs à 6 cm
	<b>N 3</b> : ganglions unique ou multiple, supérieurs à 6 cm
<b>M :</b>	<b>M 0</b> : absence de métastase

En tenant compte de cette classification TNM, nous distinguons les lésions opérables de celles non opérables.

- Lésions opérables :
  - T1-T2 : chirurgie ou curiethérapie ; curage ganglionnaire ; radiothérapie selon le résultat anatomopathologique ;
  - T3-T4 : chirurgie avec ou sans reconstruction ; curage ganglionnaire ; radiothérapie prophylactique et/ou curative.
- Lésions non opérables :
  - Tumeurs trop volumineuses (contre-indication topographique);
  - Contre-indication d'ordre général ou anesthésique ;
  - *Patient refusant la chirurgie.*

Après la classification TNM des tumeurs des VADS, nous présentons celle des pertes de substance d'origine carcinologique, aussi bien aux maxillaires et qu'à la mandibule.

#### 1.4.4.2.2. Classification des pertes de substance acquises maxillaires (PSAM)

Plusieurs classifications ont été proposées, tenant compte du polymorphisme des PSAM, intéressant essentiellement les tissus ostéo-muqueux, mais parfois aussi le revêtement cutané-musculaire. La première tentative de classification a été décrite par Ohngren en 1933 [16]. Nous distinguons la classification quantitative de Benoist des autres classifications qualitatives.

##### 1.4.4.2.2.1. *Classification quantitative*

Il est classique de distinguer depuis Benoist (1970) :

- Les pertes de substance mineures : il s'agit de pertuis palatin avec une communication bucco-nasale (CBN) ou une communication bucco-sinusienne (CBS) (par chute en avant avec un stylo en bouche), perforation des procès alvéolaires ou du vestibule supérieur (infection d'origine dentaire), tubérosité (extraction de dent de sagesse incluse entraînant fracture et nécrose osseuse) ;
- Les pertes de substance moyennes : intéresse environ  $\frac{1}{4}$  du palais osseux et des procès alvéolaires, avec une CBN et/ou sinusienne ;
- Les pertes de substance majeures : étendues à plus de la  $\frac{1}{2}$  du palais, et dont les conséquences esthétiques, fonctionnelles psychologiques et thérapeutiques sont plus importantes.

##### 1.4.4.2.2.2. *Classification qualitative*

Elle repose sur l'architecture osseuse et intègre progressivement les possibilités de réhabilitation chirurgicale (et/ou prothétique). Nous pouvons citer la classification de :

- Aramany (1978) : post-chirurgicale, orientation vers une réhabilitation prothétique (plus utilisées chez les anglo-saxons) ;
- Devauchelle (1993) : à visée essentiellement chirurgicale, peu utilisable en prothèse ;
- Spiro (1997) : caractérisation de différentes maxillectomies, à visée de reconstruction chirurgicale ;
- Cordeiro et Santamaria (2000) : reprennent celle de Spiro, en insistant sur l'intérêt de la reconstruction chirurgicale primaire ;
- Brown (2000) : c'est la plus utilisée, avec une composante verticale (classée de 1 à 4) et une composante horizontale (codée a, b, c). Elle fait l'objet de notre type de description ;
- Okay (2001) : c'est une variante de celle de Brown, divisant sa classe 1 en deux sous classes 1a et 1b ; elle est à visée chirurgicale et prothétique ;
- Boutault (2005) : renseigne sur le défaut osseux, l'état de la denture, le pronostic de la réhabilitation prothétique.

Le massif facial peut être subdivisé sur le plan vertical en trois zones [12] :

- ✓ Infrastructure : gencive, arcade, palais, voile ;
- ✓ Mésostructure : cavité nasale et partie centrale du visage ;
- ✓ Suprastructure : cadre orbitaire.

La classification de Brown (2000) [17, 22] est caractérisée par :

- ✓ Une composante verticale de la PSAM définie par les chiffres de 1 à 4 :
  - Classe 1 : maxillectomie basse sans communication bucco-anthrale (pas d'effraction de la muqueuse sinusienne) ;
  - Classe 2 : maxillectomie moyenne avec communication bucco-nasale et/ou sinusienne, mais sans atteinte du plancher orbitaire ;
  - Classe 3 : maxillectomie haute avec atteinte du plancher orbitaire mais sans atteinte du contenu orbitaire ;
  - Classe 4 : maxillectomie totale avec exentération complète.

- ✓ Une composante horizontale évaluant la largeur du défaut ostéo-muqueux pour les classes de 2 à 4 et codée par les lettres a, b et c :
  - a : maxillectomie alvéolaire unilatérale ;
  - b : maxillectomie alvéolaire bilatérale ;
  - c : maxillectomie alvéolaire totale.

Cette classification peut être synthétisée par un tableau.

Tableau II : classification de Brown (2000)

Composantes verticales (1-4)	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
	Maxillectomie basse sans communication bucco-sinusienne (CBS)	Maxillectomie moyenne avec CBS, mais sans atteinte du plancher orbitaire	Maxillectomie haute avec atteinte du plancher, mais sans atteinte du contenu orbitaire	Maxillectomie totale avec exentération complète
Composantes horizontales (a, b, c)	a	Maxillectomie alvéolaire unilatérale		
	b	Maxillectomie alvéolaire bilatérale		
	c	Maxillectomie alvéolaire totale		

#### 1.4.4.2.3. Classification des pertes de substance mandibulaires (PDSM)

La chirurgie d'exérèse carcinologique, associée ou non à un curage ganglionnaire fonctionnel ou radical, entraîne des pertes de substance acquises (PSA) mandibulaires. Nous distinguons les PSA non interromptrices (PSANI) et les PSA interromptrices (PSAI).

##### *1.4.4.2.3.1. Pertes de substance acquises non interromptrices (PSANI)*

Ce sont des pertes de substance partielles n'altérant pas la continuité de l'os mandibulaire et ne posant pas les mêmes problèmes prothétiques de réhabilitation. Selon la localisation tumorale, il peut s'agir de pelvimandibulectomie non interromptrice avec une voie d'abord par buccopharyngectomie transmandibulaire (BPTM). Ces PSANI concernent le plancher, le pharynx, le larynx et parfois une partie de la langue, occasionnant des brides cicatricielles. Ce qui aboutit à un arrimage de la langue au plancher et va nécessiter une libération chirurgicale. Il faudra préciser le siège de la lésion partielle. Des

autogreffes peuvent combler un défaut osseux important et favoriser quelquefois la réhabilitation prothétique.

#### 1.4.4.2.3.2. *Pertes de substance acquises interruptrices (PSAI)*

Il s'agit de buccopharyngectomie transmandibulaire (BPTM) avec sacrifice de la continuité de l'arc mandibulaire au niveau de la branche horizontale et/ou verticale avec ou sans condyle. C'est une pelvimandibulectomie interruptrice.

Plusieurs classifications des PSAI ont été proposées :

- La première par Pavlov en 1974 [19] ;
- Benoist (1974) ;
- Firtel et Curtis en 1982 ;
- David En 1988 ;
- Jewer et Boyd En1989 ;
- Peri en 1989 ;
- Société Française de Chirurgie Maxillo-Faciale (SFCMF) en 1989, c'est le type de description ;
- Urken en 1991 ;
- Boyd en 1993 propose une modification de celle de JEWER ;
- Cariou en 1994....

Nous présentons la classification de la Société Française de Chirurgie Maxillo-Faciale, la plus utilisée ; c'est une amélioration de celle de Péri, elle prend en compte uniquement les PSAI et comporte 4 classes :

- ✓ Type I : perte de substance interruptrice mandibulaire (PSIM) antérieure segmentaire, intéressant la région symphysaire. Cette PSIM, limitée au corpus, peut s'étendre latéralement sur la branche horizontale de façon symétrique ou non ;
- ✓ Type II : PSIM latérale segmentaire respectant la région articulaire. Elle emporte tout ou partie de la branche horizontale en arrière de la canine, de l'angle et de la branche montante mais sans désarticulation ;
- ✓ Type III : PSIM latéro-terminale. Elle comporte toujours une désarticulation. Elle emporte outre la région condylienne, la branche montante, l'angle et une partie de la branche horizontale en arrière de la

canine. Elle peut déborder sur la région symphysaire sans dépasser la ligne médiane, réalisant ainsi une hémi-mandibulectomie ;

- ✓ Type IV : PSIM de la région articulaire. Elle intéresse toujours la région condylienne et peut déborder sur la partie haute de la branche montante.

Toutes ces pertes de substance acquises résultent des thérapeutiques carcinologiques. Les indications des traitements des cancers des VADS sont essentiellement la chirurgie d'exérèse, la radiothérapie et la chimiothérapie.

## 1.5. Thérapeutiques médico-chirurgicales des cancers des VADS

### 1.5.1. La chirurgie

L'exérèse chirurgicale des tumeurs, dite carcinologique, est le traitement de référence (ou gold standard) dans la prise en charge des cancers des VADS. Elle consiste à enlever la tumeur de façon radicale ainsi que les tissus sains environnants. Elle peut être couplée ou non, selon le cas, à un curage ganglionnaire radical ou fonctionnel du drainage lymphatique associé. Cependant, l'exérèse chirurgicale est dite conservatrice, lorsque l'acte opératoire préserve en partie l'organe support ou la fonction. Dans tous les cas, la chirurgie s'inscrit dans un protocole pluridisciplinaire avec une chronologie thérapeutique bien définie. Elle peut avoir lieu en première intention (chirurgie primaire assurant la cytoréduction). La chirurgie peut être intercalée entre des cures de chimiothérapie, ou au contraire intervenir en fin de séquence thérapeutique à la suite d'une radiothérapie, d'une chimiothérapie voire même d'une radio-chimiothérapie concomitante.

### 1.5.2. La radiothérapie

C'est un traitement par rayonnements ionisants, les radiations émises étant capables de créer des excitations ou ionisations sur la matière qu'elles traversent, par « arrachement » d'électrons aux atomes des molécules du milieu. La radiothérapie peut être un traitement exclusif des cancers des VADS dans certaines localisations, un complément de la chirurgie d'exérèse (radiothérapie adjuvante), en concomitance ou en alternance à la chimiothérapie.

Son principe repose sur la délivrance de rayonnements à haut niveau d'énergie, de types X ou gamma, qui agissent sur le système génétique (ADN) des cellules cancéreuses, en induisant une altération de leurs chromosomes.

Deux grandes techniques de radiothérapie peuvent être utilisées pour délivrer le rayonnement ionisant, la radiothérapie externe et la curiethérapie ou radiothérapie interstitielle.

- La radiothérapie externe transcutanée (RTE) utilise une diversité d'appareils et de méthodes (cobalthérapie, photons X ou électrons à haute énergie, tomothérapie, hadronthérapie...). La source de rayonnements ionisants est située à distance des tissus à irradier. Cette technique consiste à délivrer une dose totale de 50 à 70 grays (Gy) dans un « volume cible » biologique comprenant la tumeur et les tissus voisins susceptibles d'être envahis. La dose est fractionnée en séances quotidiennes de 2 Gy, pendant environ 5 à 7 semaines.
- La radiothérapie interne ou curiethérapie interstitielle utilise des sources radioactives placées au sein ou au contact des tumeurs, le plus souvent par le biais d'iridium 192 ( $\text{Ir}^{192}$ ) mais aussi de césium 137 ( $\text{Cs}^{137}$ ) ou de radium. Elle permet la délivrance de doses totales cancérigènes par hyperfractionnement, pouvant aller jusqu'à 10 Gy par séance. Elle est indiquée pour des lésions tumorales de petite taille, bien circonscrites.

La radiothérapie peut être indiquée en traitement adjuvant à l'exérèse chirurgicale, exclusif ou concomitant à la chimiothérapie.

### **1.5.3. La chimiothérapie**

Elle désigne les traitements médicamenteux ayant pour but la destruction des cellules cancéreuses par des mécanismes non spécifiques. Elle agit sur les processus de mitose des cellules. La chimiothérapie peut être administrée par voie orale ou parentérale. Elle ne désigne pas un médicament mais plutôt un protocole thérapeutique regroupant un large éventail de médicaments. Les molécules les plus utilisées sont les sels de platine et le 5-fluoro-uracile, le docétaxel et le méthotrexate.

La chimiothérapie peut être néo-adjuvante (ou en induction afin de réduire le volume tumoral avant la chirurgie ou la radiothérapie) ; en concomitance avec la radiothérapie, ou bien en traitement palliatif chez un patient présentant une récurrence ou néo-localisation et/ou une métastase.

En marge de la chimiothérapie conventionnelle, nous avons la thérapie ciblée qui a pour but de détruire les cellules cancéreuses par des mécanismes plus spécifiques. Les thérapies ciblées agissent sur des récepteurs cellulaires et des pathways (ou voies de signalisation) impliqués dans le processus d'oncogenèse. Le cétuximab, anticorps monoclonal, est prescrit dans les thérapies ciblées. Dans la pratique, ces molécules antitumorales ciblées viennent en complément aux protocoles chirurgicaux et radiobiologiques, mais ne constituent pas des traitements curatifs exclusifs des cancers des VADS.

Certaines chimiothérapies sont peu toxiques par rapport à d'autres qui le sont beaucoup plus.

## 1.6. Conséquences des thérapeutiques médico-chirurgicales

Les traitements carcinologiques des tumeurs des VADS, bien qu'étant indispensables, induisent cependant des effets secondaires plus ou moins importants.

### 1.6.1. Conséquences de la chirurgie d'exérèse

L'exérèse chirurgicale carcinologique entraîne des pertes de substance acquises polymorphes, induisant des préjudices surtout fonctionnels, mais également esthétiques et psychologiques.

#### 1.6.1.1. Aux maxillaires

La conséquence majeure de la communication bucco-nasale et/ou sinusienne qui s'établit entre les cavités naturelles et chirurgicales, est une perte d'étanchéité. L'élocution et la phonation sont considérablement perturbées en raison de la déperdition de l'air expiré. Les voyelles sont nasalisées et certaines consonnes (explosives et constrictives) ne peuvent plus être prononcées correctement.

L'alimentation devient très pénible en raison des difficultés liées à la mastication (perte dentaire avec l'exérèse) et à la déglutition (reflux des aliments et surtout des liquides vers les fosses nasales et les sinus maxillaires). Ce qui impose une alimentation parentérale par gavage à l'aide de sonde nasogastrique. Les troubles respiratoires sont secondaires aux infections à répétition consécutives aux fausses routes alimentaires.

Les conséquences esthétiques, en rapport avec l'étendue et le volume de la PSAM, peuvent se manifester par des délabrements, un affaissement des tissus mous, à la suite des résections de l'os sous-jacent. On observe alors des dépressions des parties molles à l'origine d'asymétrie faciale, donnant l'aspect d'un faux prognathisme.

#### 1.6.1.2. A la mandibule

Les conséquences spécifiques des pertes de substance mandibulaires (PDSM) sont la latérodéviation, le trouble de l'articulé dentaire et l'asymétrie faciale. Les PDSM entraînent des déformations importantes qui vont se manifester par des rétractions fibreuses et des déplacements secondaires des fragments résiduels. Les brides cicatricielles interfragmentaires vont induire un rapprochement progressif des fragments osseux, une déformation importante de l'arc mandibulaire modifiant les contours faciaux, une perturbation de la phonation.

La gêne fonctionnelle peut être considérable dans les suites opératoires immédiates. Elle est consécutive à la latérodéviations de l'hémi-arcade saine (vers le côté réséqué) qui perd ses rapports d'articulé, à une disparition des éléments de soutien de plancher buccal (le mylo-hyoïdien, le digastrique, les muscles géniens, l'aponévrose cervicale moyenne), à la perte d'une partie des insertions de la langue et à une constriction des mâchoires. Il en résulte une gêne respiratoire (surtout dans les PSIM (pertes de substance interruptrices mandibulaires) symphysaires avec glossoptose ou chute de la langue en arrière), des troubles de la mastication et de la déglutition.

Le préjudice esthétique est surtout en rapport avec le siège de la PDSM. Dans les résections symphysaires, il se produit une conjonction sagittale des fragments ; l'aplatissement bilatéral de la mandibule provoque une déformation esthétique en « mâchoire de serpent » ou en « profil d'oiseau ». Dans les PSIM de types II et III, c'est la latérodéviations qui engendre une asymétrie faciale, une perte de dimension verticale (D.V.).

#### 1.6.1.3. Répercussions psychologiques

Les infirmités et déformations engendrées par les pertes de substance acquises sont très préjudiciables au moral du malade. Le visage est le siège de la mimique, des organes des sens, de l'origine des voies respiratoires et digestives. Ainsi, il est à la charnière de l'individu et du social, c'est l'image de soi dans le monde socioprofessionnel. Les séquelles de la chirurgie d'exérèse peuvent altérer le faciès et les fonctions manducatrices, aboutissant à un handicap psychologique et relationnel, une isolation de l'environnement social. Une prise en charge psycho-sociale du patient est essentielle pour son bien-être et sa réintégration sociale. D'où l'importance d'une réhabilitation immédiate de ces malades.

#### 1.6.2. Conséquences de la radiothérapie

Les rayonnements ionisants, utilisés à dose prophylactique (ou anti-inflammatoire, moins de 30 Gy) ou à dose curative (ou cancéricide, au-delà de 30 Gy), vont induire des dommages tissulaires. Les radiations vont interagir avec les molécules, induisant leur ionisation par modification des protéines cellulaires et de l'ADN. Cela inhibera la division cellulaire, entrainera leur apoptose lors de la mitose. Des manifestations biologiques allant des lésions moléculaires aux altérations d'organes peuvent être observées.

Les effets secondaires des rayons X varient selon différents paramètres notamment la région irradiée, la dose de rayonnement délivrée, la sensibilité intrinsèque et l'état général du patient. Ces conséquences peuvent être soit immédiates, aiguës ou précoces, survenant pendant le traitement et/ou les

semaines suivantes ; soit tardives, apparaissant plusieurs mois voire années après la radiothérapie. Tous les éléments de la sphère oro-faciale peuvent être le siège de complications post-radiques :

#### 1.6.2.1. La peau :

Les atteintes cutanées peuvent se manifester par un érythème avec congestion des vaisseaux du derme, une atrophie de la peau et de ses organes glandulaires, une diminution de la souplesse tégumentaire, une épilation et dyschromie, une radioépidermite exsudative et une radiodermite plus ou moins aiguë (4 grades) aux doses curatives, une télangiectasie (dilatation des petits vaisseaux) ;

#### 1.6.2.2. Le tissu nerveux :

Il est considéré comme radiorésistant : jusqu'à 50 Gy, on ne note pas de troubles majeurs ; entre 50 et 60 Gy : une névrite périphérique ; au-delà de 70 Gy, il y a une destruction du tissu nerveux ;

#### 1.6.2.3. Les vaisseaux :

L'atteinte des vaisseaux concerne toutes les structures vasculaires, des capillaires aux artères en passant par le réseau veineux [24]. L'irradiation affectera préférentiellement le réseau capillaire par l'intermédiaire des cellules endothéliales. Cette radiosensibilité s'expliquerait par leur cycle cellulaire rapide, entraînant aussi bien des déformations structurales qu'un détachement de leur membrane basale voire leur apoptose. L'altération des cellules endothéliales peut provoquer l'occlusion des parois vasculaires. Ce qui aboutit à la formation de télangiectasie, au risque de sous oxygénation de la tumeur la rendant moins radiosensible. Quelques fois, il est noté l'installation d'une artérite oblitérante, pouvant rendre précaire les possibilités de réparation et de cicatrisation.

#### 1.6.2.4. Les muscles manducateurs :

Les rayonnements induisent une atrophie et une dégénérescence des cellules musculaires lisses, une fibrose et une sclérose des muscles striés. On observe souvent une réduction de la masse musculaire, une diminution de l'amplitude des mouvements, une limitation de l'ouverture buccale (répercussion sur les ATM), un trismus gênant les soins buccaux. Les principaux muscles concernés sont ceux de la langue, les masséters, les ptérygoïdiens et les sterno-cléido-mastoïdiens.

#### 1.6.2.5. Les muqueuses :

La radiothérapie provoque un énanthème dès la première semaine d'irradiation ; une stomatite érythémateuse congestive ou ulcéreuse.

La radiomucite buccale aigue radio-induite s'explique par les 3H : hypocellularité, hypovascularisation et hypoxie. Elle se manifeste par une destruction des cellules germinatrices de la muqueuse, une desquamation de l'épithélium, l'apparition d'un exsudat blanchâtre ou jaunâtre recouvrant le chorion, une algie majorée par la sécheresse buccale ou xérostomie. La xérostomie est secondaire à l'atrophie des glandes salivaires. La radiomucite buccale a été classée par l'OMS en 1982 selon 5 grades [25] :

- Grade 0 : muqueuse buccale normale, sans stomatite ;
- Grade 1 : érythème léger, modérément douloureux, ulcérations indolores ;
- Grade 2 : érythèmes douloureux, présence d'œdèmes ou d'ulcérations ;
- Grade 3 : érythèmes, œdèmes et/ou ulcérations algiques, alimentation solide possible ;
- Grade 4 : déglutition impossible.

La survenue de radiomucite majore le risque d'infection et d'infestation, notamment candidosique. Le traitement est symptomatique, local et/ou systémique en cas de surinfection. La régénération de la muqueuse ne se fera qu'au bout de 6 mois à 1 an.

#### 1.6.2.6. Le goût :

La perturbation du goût apparaît dès la 2<sup>ème</sup> semaine d'irradiation, aux environs de 20 Gy. L'altération de la fonction gustative se manifeste sous forme d'agueusie, d'hypogueusie ou de dysgueusie (sensation de goût métallique). Le salé et l'amer sont plus affectés que le sucré et l'acide. L'altération de la fonction gustative et la dysphagie radio-induite entraînent une inappétence à l'origine de perte pondérale.

#### 1.6.2.7. Les glandes salivaires et la salive :

Deux à trois semaines après le début de la radiothérapie, les glandes salivaires du champ d'irradiation ne sont plus fonctionnelles. Les rayonnements ionisants provoquent une dégénérescence du parenchyme glandulaire aboutissant à une diminution de la sécrétion salivaire. Les cellules séreuses (parotides) sont plus radiosensibles. Mais à partir de 60 Gy, les acini glandulaires sont détruits de façon irréversible. La modification quantitative de la salive totale peut aller de l'hyposalie jusqu'à l'asalie. Au plan qualitatif, la modification salivaire se traduit par une salive épaisse, mousseuse, visqueuse, une réduction du taux des immunoglobulines A (IG<sub>A</sub>) salivaires. La diminution du pH salivaire (passant de 6,7 à 5,4) entraîne une acidité qui est le terrain de prédilection

des polycaries. La flore buccale est modifiée dans de grandes proportions, favorisant les candidoses et les infections bactériennes.

#### 1.6.2.8. Les dents :

Les irradiations induisent, sur la denture adulte, une endovascularite pulpaire limitée qui joue une action mineure dans le déclenchement des dégâts notés chez le patient irradié. L'odontoradionécrose résulte des conditions cariogènes créées par l'hyposialie consécutive à l'irradiation des glandes salivaires, de l'atteinte des éléments vasculo-nerveux de la région cervicale. L'action indirecte des rayonnements sur les dents apparaît dans un délai de 4 à 6 mois après le début de l'irradiation. Dans tous les cas, l'odontoradionécrose se manifeste de plusieurs manières notamment des lésions amélares (dents crayeuses, dents d'ébène), des caries serpigneuses (à bas bruit). L'odontoradionécrose est souvent pauci-symptomatique, elle commence par les dents antérieures pour s'étendre ensuite à toute la denture. L'érosion débute par les collets et les bords libres des dents, pour aboutir à la destruction coronaire totale par fracture, respectant la partie radiculaire endo-osseuse.

#### 1.6.2.9. Les os des mâchoires:

Après irradiation, les os présentent une hypocellularité, une hypovascularisation et une hypodensité. Les phénomènes d'endovascularite et d'endophlébite seront plus accrus à la mandibule qu'aux maxillaires (en raison des systèmes de vascularisation terminale et réticulaire). Les rayonnements provoquent des complications au niveau cellulaire, de la moelle et de la structure osseuse, aboutissant à une ostéoradionécrose (ORN). Cette ORN est une ostéite post-radique consécutive à l'altération des ostéoblastes, des ostéoclastes et des ostéocytes. La balance apposition/résorption est perturbée ainsi que la charge en calcium de l'hydroxyapatite ( $\text{Ca/P} \approx 1,7$ ). L'ORN se manifeste par une altération du potentiel de différenciation cellulaire ainsi qu'une réduction de l'activité enzymatique et mitotique. La structure des trabécules osseuses est désorganisée, l'épaisseur de la corticale osseuse est réduite, une déminéralisation est aussi observée. Le potentiel cicatriciel osseux et de régénération est fortement entamé voire inexistant en site hypotrophique (pertes de substance acquises mais aussi congénitales) ; d'où l'intérêt des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse. Par ailleurs, un ralentissement de la croissance peut être noté chez l'enfant, par atteinte des plaques de croissance condyliennes. L'apparition de l'ORN peut se faire 6 mois à 2ans après l'irradiation. Ce phénomène, plus fréquent à la mandibule qu'aux maxillaires dans les

cancers des VADS, n'est possible que lorsque l'os est mis à nu, en cas d'effraction muqueuse. En présence d'un os irradié, l'odontologiste devra se montrer très prudent lors de ses interventions même après plusieurs années.

### **1.6.3. Conséquences de la chimiothérapie**

Les effets secondaires de la chimiothérapie varient selon les molécules utilisées, la dose administrée et l'état général du patient. La chimiothérapie a des répercussions sur l'ensemble de l'organisme du fait de son action systémique. Au niveau muqueux, les molécules peuvent provoquer des mucites allant du grade 0 au grade 4 de l'OMS. Ces mucites peuvent se surinfecter et/ou se surinfester en raison de la perturbation de l'écosystème buccal, ainsi que par la xérostomie chimio-induite.

Sur le plan général, les effets secondaires de la chimiothérapie peuvent aller de l'asthénie, de l'inappétence, de l'alopecie à des complications cardio-circulatoires et métaboliques beaucoup plus graves : leucopénie, anémie, thrombopénie, risque hémorragique, aplasie, nausées, vomissements, diarrhées, troubles rénaux, auditifs, cutanés, etc...

Les pertes de substance maxillo-faciales, quelle que soit leur origine, congénitale ou acquise, engendrent des perturbations du schéma corporel. Ces altérations, aussi bien esthétiques que fonctionnelles, impactent lourdement le psychisme du patient. Aussi, en plus de l'approche thérapeutique proprement dite, une relation d'aide est importante. Elle consiste en une prise en charge de la souffrance psychique, physique et psychologique endurée par le malade suite à sa mutilation. [3, 26, 27].

## **1.7. Place de la PMF dans le traitement des pertes de substance congénitales et acquises**

### **1.7.1. Relation d'aide**

Les réhabilitations maxillo-faciales doivent être sous tendues par une relation d'aide aux patients. Celle-ci doit être envisagée tout au long de la prise en charge médicale, depuis la naissance (pour les malformations congénitales) ou l'annonce du diagnostic (pour les pertes de substance acquises) jusqu'à la réhabilitation chirurgicale et/ou prothétique maxillo-faciale. Ce qui suppose une période de latence relativement longue. La relation d'aide fait appel à l'équipe soignante (médicale et paramédicale), à l'entourage familial et amical, ainsi que professionnel du malade. Aussi, dans les fentes labio-maxillo-palatines, il est indispensable de rassurer les parents, de les déculpabiliser et de les inciter à

accueillir leur enfant, le chérir et l'éduquer sans stigmatisation de son handicap. En cas de chirurgie d'exérèse carcinologique, la réhabilitation chirurgicale et/ou prothétique doit être la plus précoce possible afin de camoufler la perte de substance stigmatisant le patient. Cette phase de prise en charge psychologique doit être l'œuvre d'une équipe multidisciplinaire ayant pour objectif majeur, la recherche du bien-être et de la meilleure qualité de vie pour ces patients.

### **1.7.2. Place de la PMF dans la prise en charge des pertes de substance congénitales**

La réhabilitation des fentes labio-alvéolo-palatines est essentiellement chirurgicale. Les dates d'interventions chirurgicales, leurs séquences et les techniques opératoires utilisées varient selon les centres, de même que le recours au traitement orthopédique pré-chirurgical, préconisé par certains et décrié par d'autres. La prise en charge des enfants présentant ces malformations est pluridisciplinaire et inclut de nombreuses spécialités (néonatalogie, chirurgie, prothèse maxillo-faciale, phoniatrie, ORL, orthophonie, odontologie, orthodontie, génétique...). La PMF peut s'intégrer dans un schéma thérapeutique bien codifié qui s'étale de la naissance à la fin de l'adolescence voire à l'âge adulte.

Dès la période néonatale, des plaques palatines sont indiquées et peuvent être portées jusqu'à la reconstruction chirurgicale. Le prothésiste maxillo-facial peut réaliser des plaques de différentes sortes : passives ou actives, amovibles ou fixées, combinées ou non à des dispositifs labio-nasaux. Ces plaques palatines permettent d'améliorer les fonctions orofaciales notamment en :

- évitant l'interposition linguale dans la fente par amélioration de ses appuis ;
- permettant une déglutition physiologique facilitant l'alimentation par diminution du jetage nasal ;
- contribuant à guider la croissance des maxillaires afin d'obtenir des arcades alvéolaires harmonieuses par correction des difformités maxillaires.

Les plaques servent aussi de soutien psychologique aux parents en les impliquant dans le traitement, contribuent à la facilitation du geste chirurgical par le rapprochement des fragments [15].

Chez l'adulte porteur de fentes séquellaires ou non opérées, la PMF intervient par la réalisation de plaques palatines et de prothèses vélo-palatines. Le rôle de ces appareillages consiste :

- d'une part à pallier les séquelles chirurgicales à la suite de staphylorraphies, de pharyngoplasties, de chéilorhinoplasties, et de reconstructions du palais primaire, de perforations

- résiduelles palatines et vélaires (uranoplasties), de voiles suturés trop courts, scléreux, paralysés ou inertes;
- d'autre part, à appareiller les fentes faciales non encore opérées ou négligées.

Destruhaut et al. (2014) ont proposé une nouvelle classification des FLAP à visée thérapeutique, incluant les critères de choix de la pièce intermédiaire et de l'obturateur vélo-palatin. Il s'agit d'une amélioration de la classification de Benoist indiquant la prothèse appropriée. Elle est illustrée par le tableau ci-après.

Tableau III : classification à visée thérapeutique des FLAP de Destruhaut [3]

Classes	Etat du voile	Pièces intermédiaires	Obturbateurs vélo-palatins
Classe 1	Voile divisé mais tonique	Tuteur métallique (section ronde)	Obturbateur de Suersen
Classe 2	Voile suturé, trop court mais contractile	Tuteur médian incurvé (section demi-jonc)	Obturbateur de Schiltsky
Classe 3	Voile absent	Tuteur métallique	Obturbateur analogue de Suersen
Classe 4	Voile inerte (scléreux ou paralysé)	Tuteur métallique légèrement compressif	Obturbateur de Mazaheri
Classe 5	Voile atypique (après pharyngoplastie)	Double tuteur (section ronde)	Obturbateur de Dichamp

Les obturbateurs vélo-palatins, dont le but est de diminuer la déperdition nasale, doivent aujourd'hui être d'indication exceptionnelle.

### 1.7.3. Place de la PMF dans le traitement des cancers des VADS

La PMF s'intègre dans le processus de prise en charge médico-chirurgicale pluridisciplinaire des cancers des VADS. Elle trouve également plusieurs indications dans la réhabilitation des défauts maxillo-faciaux d'origine tumorale. Le souci majeur est de prévenir ou de limiter les séquelles des thérapeutiques carcinologiques en situations pré-, per- et postopératoires. Ce qui passe par une mise en état préalable de la cavité buccale, à la suite d'un examen clinique et paraclinique, l'appréciation du degré de compliance et l'aspect psychologique du patient. L'attitude radicale consistant à extraire toutes les dents situées dans le futur champ d'irradiation est devenue caduque. L'odontologiste ou le spécialiste

en PMF conservera une denture solide et esthétique par des soins de qualité et une hygiène appropriée. Les dents délabrées, infectées ou en malposition feront l'objet d'extractions suivies de régularisation des crêtes et de sutures hermétiques. La fluorurothérapie à l'aide de gouttière porte gel fluorée et de fluor (Fluocaril bi-fluoré 2000) 10 à 15 minutes chaque soir et à vie sur la denture résiduelle, contribuera à la réduction des risques d'odontoradionécrose et d'ostéoradionécrose, par le renforcement de l'émail et une action anti-enzymatique sur les micro-organismes de la plaque. Les prises d'empreintes (modèles d'étude, confection de gouttière porte-gel fluorée) se feront à l'aide d'alginates ou d'élastomères de silicone, le plâtre est à proscrire afin d'éviter les blessures muqueuses. Les mucites post-radiques ou chimio-induites seront gérées par des antiseptiques locaux non alcoolisés, des cicatrisants, des antibiotiques et antifongiques en cas de surinfection. La xérostomie sera atténuée en lubrifiant localement les muqueuses (pulvérisation d'eau et/ou de salive artificielle), au plan général à l'aide de cholagogues, sialogogues, sympathomimétiques, mucorégulateurs. Il faudra lutter contre la dénutrition par des conseils diététiques, la prescription de régime alimentaire hyper-protidique, riche en acides gras essentiels et en oligo-éléments.

Dans les cas de chirurgie d'exérèse carcinologique aux maxillaires, la PMF contribue au rétablissement de l'étanchéité de la cavité buccale et à compenser les troubles fonctionnels (mastication, déglutition, alimentation, élocution, respiration), et esthétique des malades par la confection de prothèses obturatrices. L'appareillage des PSAM dépendra de leur topographie, de l'état de la denture résiduelle et du moment où le patient est adressé au prothésiste maxillo-facial. Une prothèse obturatrice immédiate, préparée en préopératoire, est posée et ajustée au bloc opératoire le jour l'exérèse, à l'aide d'élastomère de silicone ou de résine à prise retard. Elle permet au patient de retrouver au réveil, une certaine autonomie de vie, assure une protection et une cicatrisation muqueuse pendant les suites opératoires immédiates. La prothèse obturatrice peut être semi-immédiate (quelques jours après l'intervention) ou transitoire et mieux élaborée (environ 3 semaines postopératoires) tout en assurant les mêmes rôles fonctionnels esthétiques et psycho-sociaux. Au bout de 4 à 6 mois, après cicatrisation complète et ré-épithélialisation du défaut maxillo-facial, en l'absence de récurrence tumorale, une prothèse obturatrice d'usage ou de fonction est réalisée avec comme crédo « primum non nocere » [275].

Les pertes de substance mandibulaires (PDSM) résultent des résections chirurgicales interruptrices ou non, consécutives aux traumatismes, aux infections spécifiques chroniques, et le plus souvent aux pathologies tumorales. Le préjudice esthétique, la latérodéviation et l'altération des fonctions manducatrices constituent un handicap à l'insertion sociale de ces patients. La réhabilitation des

PDSM se fait essentiellement par des procédés chirurgicaux. Les greffes osseuses sont le « gold standard » dans le traitement des lésions interruptrices. Cependant, on fait appel à des moyens prothétiques de prévention ou de correction des déformations secondaires à la PDSM. Il s'agit d'appareils-guides ayant pour but, lorsqu'ils sont placés précocement, de prévenir l'apparition de latérodéviation vers le côté réséqué, de s'opposer aux rétractions fibreuses, d'assurer un articulé normal lors de l'occlusion.

D'autre part, pour éviter les troubles cinématiques mandibulaires après une PSAI, une rééducation fonctionnelle de la posture et de la cinématique mandibulaire doit être initiée précocement. Cette rééducation fonctionnelle associe des techniques de mécanothérapie et kinésithérapie maxillo-faciales. La mécanothérapie est une méthode thérapeutique consistant à faire exécuter aux articulations temporo-mandibulaires, des mouvements passifs ou actifs à l'aide d'appareils spéciaux appelés exercices. La mécanothérapie se fait par des appareils mobilisateurs ou exercices unidirectionnels ou pluridirectionnels, pour la mobilisation passive ou active des ATM. Une mise en condition de la musculature par un réchauffement préalable est indispensable, surtout lorsque les muscles manducateurs sont rétractés, sclérosés ou atrophés.

La masso-kinésithérapie est désignée comme « l'art de guérir utilisant toutes les techniques du mouvement ». Elle englobe plusieurs méthodes appelées physiothérapie (électrothérapie, ultrasons, thermothérapie...) qui se combinent et se complètent les techniques mobilisatrices et les massages. La PMF, par le biais de cette rééducation fonctionnelle, contribue à :

- Retrouver un degré d'ouverture buccale compatible avec une alimentation solide et à récupérer une force suffisante de contraction musculaire lors de la fermeture, donc pendant la mastication ;
- Rechercher le recentrage de la mandibule lors des mouvements d'ouverture-fermeture ;
- Faciliter le contrôle de la déviation controlatérale de correction de la mandibule ;
- Récupérer un mouvement de protraction-rétraction mandibulaire tout en limitant la déviation du menton vers le côté réséqué.

La PMF concourt également à la réhabilitation des pertes de substance extra-orales (amputation de la pyramide nasale, du pavillon de l'oreille, du globe oculaire) par la confection de prothèses faciales encore appelées épithèses. Ces dernières remplacent les organes perdus, présentent un aspect esthétique certain et tout en ayant si possible une valeur fonctionnelle.

L'avènement de l'implantologie permet d'envisager favorablement les indications de la PMF. La morphologie bucco-faciale fortement modifiée par les pertes de substance, rend compliquée la réhabilitation par des prothèses obturatrices et des épithèses conventionnelles. Le recours à des implants peut nettement améliorer le confort du port des constructions prothétiques pour les patients concernés. Cependant, ils nécessitent un suivi régulier et une maintenance rigoureuse ; ainsi, ils sont indiqués pour les patients les plus motivés.

Dans l'intérêt des patients, des contrôles réguliers au moins 2 à 3 fois par an doivent être effectués. Cela permet de vérifier l'hygiène et l'état bucco-dentaires, l'innocuité des prothèses et de déceler une éventuelle récurrence ou néo-localisation tumorale. Le spécialiste en PMF doit être associé à toutes les étapes de la prise en charge des patients dans la mesure où c'est lui qui devra contrôler, conseiller, motiver ces derniers même en l'absence de récurrence lésionnelle.

### 1.8. Problématique

La chirurgie demeure la méthode de référence dans la reconstruction des pertes de substance maxillo-faciales. Elle permet la restauration d'usage des défauts et assure une bonne étanchéité. Contrairement aux prothèses obturatrices et aux épithèses, la réhabilitation chirurgicale maxillo-faciale s'effectue avec du « tissu sain ou biologique » et non pas avec un matériau « inerte ». Dans le cadre de la symbiose chirurgico-prothétique, la prochaine phase dans l'évolution de la reconstruction des pertes de substance impliquerait une association des techniques de la distraction osseuse, de la chirurgie microvasculaire, de la prothèse et de l'implantologie. Cette alliance permettrait de surmonter les difficultés inhérentes à la pose de prothèse maxillo-faciale conventionnelle. Avec l'essor de nouveaux procédés de chirurgie reconstructrice, l'utilisation de greffons tissulaires vascularisés (greffons microvasculaires) associés à des implants dentaires, a notoirement contribué à la réhabilitation satisfaisante des défauts maxillo-faciaux complexes, aussi bien esthétique que fonctionnelle. La chirurgie a également bénéficié des récents progrès en anesthésie, en télé-médecine et vidéo-intervention, en imagerie médicale notamment les reconstructions 3D.

Malgré tout, la greffe osseuse autologue reste le « gold standard » et donne de bons résultats dans la réhabilitation des pertes de substances. Cependant, elle n'est pas sans inconvénients et présente certaines limites inhérentes à la faiblesse de la quantité prélevable, à la morbidité du site donneur, parfois à l'inefficacité en site hypotrophique (grandes pertes de substance acquises ou congénitales). Le but ultime est de pallier la chirurgie et la PMF par des substituts osseux. C'est ce qui motive les cliniciens et les chercheurs à envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces et sans innocuité en termes de régénération des pertes de

substance osseuses maxillo-faciales. Parmi ces techniques se trouve en pool position, l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO). C'est une discipline ayant pour objectif de développer des substituts biologiques capables de restaurer, de maintenir ou d'améliorer les fonctions des tissus lésés.

## 1.9. Rappels sur la structure et la physiologie du tissu osseux

L'os est un tissu dynamique, métaboliquement actif, multifonctionnel, en constants renouvellement et remodelage. L'os est une caractéristique propre aux vertébrés, un tissu conjonctif qui assure la protection et le soutien de l'organisme. Le tissu osseux joue également un rôle important dans l'hématopoïèse de la moelle osseuse, (développement de cellules sanguines), dans le maintien de l'homéostasie (stockage et relargage des ions minéraux : calcium, phosphate), dans la protection d'organes vitaux (cerveau, cœur, poumons,...), dans l'appareil locomoteur (squelette axial et appendiculaire, insertion des muscles).

### 1.9.1. Structure osseuse

La matrice extracellulaire (MEC) de l'os est très dense et hétérogène, essentiellement constituée de collagènes et de cristaux d'hydroxyapatite. La trame organique du tissu osseux est majoritairement composée de collagène de type I, représentant environ 90 % des protéines totales. La fraction organique restante est constituée de protéines non collagéniques comme les facteurs de croissance, les protéines sanguines, l'ostéonectine et l'ostéocalcine. La MEC contient également des protéoglycanes et des glycoprotéines (fibronectines, laminines). La phase minérale est principalement composée d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Du fait de sa consistance matérielle, l'os a un caractère relativement flexible ainsi qu'une certaine résistance à la compression [43,44]. Les propriétés mécaniques de l'os varient selon différents paramètres : la fonction anatomique, la localisation, l'âge, la présence de maladie, la sollicitation mécanique. Cependant, les propriétés mécaniques chez les mammifères sont restées similaires à travers les espèces. Les os longs sont des cylindres creux aux parois épaisses ; ce qui leur permet de rester forts et solides tout en minimisant leur poids. Une part importante de la force de l'os est assurée par le périoste, lui permettant de résister à la flexion et à la torsion. L'alignement et la réticulation des fibres de collagène influencent également la résistance mécanique. L'os mature est composé de deux types de structures différentes : corticale (ou compacte) et trabéculaire (ou spongieuse).

La structure externe, lisse, blanche et dure appelée os cortical, est responsable de la stabilité et de la solidité du squelette. La corticale contient des ostéons ou systèmes de Havers (unité fonctionnelle de base), qui sont composés d'un canal central (canal de Havers) entouré de lamelles de matrices osseuses. A l'intérieur des lamelles sont encastrés des ostéocytes dans des lacunes. Le fut haversien

englobe les vaisseaux sanguins et les cellules nerveuses dans l'ensemble de l'os et communique avec les ostéocytes par l'intermédiaire de canalicules. D'autre part, la corticale a une membrane externe très importante lors de prélèvement de greffons, le périoste. En effet, le périoste est constitué d'une couche externe fibreuse et d'une couche interne présentant un potentiel ostéogénique qui permet la croissance osseuse.

La structure interne de l'os est organisée en un réseau trabéculaire, abrite la moelle osseuse et le tissu conjonctif embryonnaire. Cet os trabéculaire ou spongieux assure l'élasticité du squelette et représente la principale partie du métabolisme osseux (environ 70 %) [59]. Chez les mammifères, le renouvellement et l'adaptation du tissu osseux se produisent au niveau de quatre surfaces : périoste, endocorticale, trabéculaire et haversienne (intracorticale). Le remodelage et la régénération de l'os se font de façon synergique afin de maintenir ces besoins physiologiques.

### **1.9.2. Remodelage osseux**

L'os possède une caractéristique spécifique, la régénération tissulaire « *ad integrum* ». Afin de maintenir sa stabilité et son intégrité, le tissu osseux est constamment en cours de remodelage, environ 10 % de sa structure se renouvelle chaque année [44]. La formation osseuse et le remodelage permettent de déterminer la morphologie appropriée du squelette, de maintenir les concentrations ioniques des minéraux et de réparer l'os endommagé. Ces phénomènes sont réalisés et régulés par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Le remodelage osseux se produit généralement pendant les phases de croissance chez l'enfant. Cette activité se réduit de façon significative une fois que la maturité du squelette est atteinte.

Le remodelage osseux est un processus complexe impliquant une résorption osseuse réalisée par les ostéoclastes suivie d'une formation assurée par les ostéoblastes, par le biais d'une cascade de signalisations complexes. Durant ce processus, les cellules provenant de différentes sources collaborent dans des unités multicellulaires de base (BMU : basic multicellular unit). Ce processus de remodelage joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du calcium. En effet, en cas d'hypocalcémie, l'activité des ostéoclastes est stimulée par la parathyroïde hormone (PTH) pour libérer des minéraux de la matrice osseuse. En revanche, lorsque le taux de calcium est au-dessus de la normale, l'activité des ostéoclastes est inhibée par la calcitonine sécrétée par la glande thyroïde. De nombreuses pathologies osseuses d'origine métabolique sont attribuées à des perturbations dans le fonctionnement normal des unités multicellulaires de base ; c'est le cas dans l'ostéoporose et l'arthrose [43, 60].

Les principales fonctions osseuses sont assurées par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont des cellules de la lignée mésenchymateuse sécrétant une matrice osseuse non minéralisée appelée ostéoïde ; celle-ci va se minéraliser ensuite pour donner de l'os mature. Des cellules souches mésenchymateuses (CSM) situées dans la moelle et dans le périoste peuvent être induites à se différencier en ostéoblastes par une interaction complexe de facteurs de croissance et de facteurs de transcription tels que RUNX2, MSX2 [60, 61, 62]. Une fois ces cellules engagées en lignée ostéoblastique et devenues des ostéoblastes matures, elles commencent à sécréter des protéines matricielles comme la sialoprotéine osseuse (BSP), le collagène de type I, l'ostéocalcine (OCN) et la phosphatase alcaline (ALP). Certains ostéoblastes ne deviennent pas complètement matures et commencent plutôt à former de longs processus cytoplasmiques à travers les ostéoïdes pour devenir des ostéocytes.

Quant aux ostéoclastes, ce sont des cellules de la lignée hématopoïétique qui résorbent le tissu osseux par le biais de sécrétions acides et de protéases. L'ostéoclastogénèse comprend la stimulation de cellules souches hématopoïétiques pour former des préostéoclastes mononucléaires. Ces cellules ainsi engagées en préostéoclastes vont passer dans le flux sanguin et migrer au niveau du site qui doit être résorbé. Les préostéoclastes mononucléaires vont fusionner pour former des ostéoclastes multinucléés. Cette fusion nécessite la présence du facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et du récepteur de l'activateur du facteur nucléaire Kappa B  $\kappa$ B-Ligand (RANK-L) [60]. Les ostéoclastes matures résorbent les os en sécrétant des ions  $H^+$  (protons) pour solubiliser le composant minéral et ensuite libérer des protéases pour dégrader la matrice organique.

La formation osseuse se fait par deux mécanismes, soit par ossification membraneuse, soit par ossification enchondrale. L'ossification membraneuse (ou membranaire) se produit lorsque les ostéoblastes se différencient à partir de cellules mésenchymateuses ou de tissus conjonctifs fibreux, sans formation d'ébauches cartilagineuses préalables. Ces ostéoblastes se regroupent en clusters et sécrètent une matrice organique qui sera minéralisée en os lamellaire. Les os plats tels que la mandibule, la clavicule, les os crâniens se forment normalement par ossification membraneuse. La mandibule présente la particularité de se développer autour d'un axe cartilagineux appelé cartilage de Meckel. L'ossification enchondrale survient lorsqu'une matrice cartilagineuse (cartilage hyalin) est minéralisée en tissu osseux. Ce processus commence par la différenciation de cellules progénitrices indifférenciées en chondrocytes qui synthétisent la matrice cartilagineuse (cartilage hyalin). Ensuite cette matrice se calcifie, les chondrocytes s'hypertrophient, des cellules ostéoprogénitrices et des vaisseaux sanguins envahissent la matrice. Les cellules progénitrices sont

différenciées en ostéoblastes et la formation osseuse se produit dans la matrice cartilagineuse calcifiée. La plupart des os longs comme l'humérus, l'ulna, le fémur, le tibia sont formés et réparés par ossification enchondrale.

### **1.9.3. Processus de cicatrisation osseuse**

A la suite d'une lésion, le tissu concerné essaie de recouvrer son état initial par différents mécanismes, en fonction de sa nature, de sa composition, de sa structure et de l'importance de la lésion. Parmi ces mécanismes, nous pouvons noter la réparation et la régénération.

1.9.3.1. La réparation est le mécanisme de restauration permettant à un tissu de retrouver sa fonction initiale mais pas son architecture spécifique. Au cours de ce processus de « cicatrisation », il y a souvent l'interposition d'un tissu fibreux ;

1.9.3.2. La régénération, quant à elle, est la faculté de restauration de la fonction et de l'architecture initiales du tissu lésé, de manière similaire à l'état natif.

L'os est l'un des rares tissus de l'organisme à maintenir sa capacité de régénération tout au long de la vie, même à l'âge adulte ; ce potentiel est nécessaire à la cicatrisation des fractures [63, 64]. Ce processus doit restaurer l'architecture initiale, la matrice biologique et les propriétés biomécaniques du tissu osseux endommagé. Pour ce faire, la guérison des lésions osseuses nécessite l'implication combinée du complexe angiogenèse et ostéogenèse, sous l'action de cellules ostéogéniques, de cytokines, de facteurs de croissance, d'hormones et de composants de la matrice extracellulaire (MEC).

La cicatrisation osseuse, après une fracture par exemple, commence par la phase de formation d'un caillot sanguin ou hématome au niveau de la zone fracturée. Cet hématome permet la libération de facteurs de croissance et de cytokines à partir de plaquettes, fournit un environnement fibreux au niveau du site endommagé afin de favoriser l'adhésion cellulaire et la fabrication de tissu osseux néoformé.

Les cellules du périoste migrent vers le site fracturaire pour former un cal externe (phase du cal mou). Ces cellules périostées produisent aussi des protéines morphogéniques osseuses ou BMP (bone morphogenetic protein), afin de recruter des cellules progénitrices qui vont rapidement proliférer et se différencier au niveau du site de fracture. L'expression endogène de BMP est essentielle dans la formation osseuse chez l'adulte.

Du cartilage se forme au centre de ce cal fibreux et les chondrocytes produisent des facteurs induisant l'ostéogenèse ; c'est la phase du cal solide (ou ostéo-cartilagineux). Des vaisseaux sanguins commencent à envahir le cal, les chondrocytes hypertrophiques et des cellules environnantes se différencient en ostéoblastes.

Ensuite se déroule la phase d'ossification via ces ostéoblastes qui sécrètent la matrice extracellulaire protéique ou ostéoïde, qui progressivement remplace le cartilage par de l'os immature (ou os tissé).

La phase de remodelage osseux se fait par les ostéoclastes et les ostéoblastes afin d'assurer l'intégration de l'os néoformé au tissu environnant. L'os immature tissé sera remplacé par un tissu osseux mature lamellaire.

Le processus de cicatrisation osseuse est par ailleurs fonction de plusieurs facteurs parmi lesquels, la vascularisation du site. L'interdépendance entre angiogenèse, régénération vasculaire et néoformation osseuse est reconnue depuis longtemps et établie par de nombreux auteurs [65, 66, 68]. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF : vascular endothelial growth factor) et la BMP ont montré des effets synergiques lors de la cicatrisation de fractures et de régénération osseuse en général [67, 68]. D'autre part, dans les défauts maxillo-faciaux de taille critique (pertes de substance acquises et congénitales), la capacité d'auto-régénération de l'os est dépassée. Il faut alors adjoindre des substituts osseux afin de restaurer ces défauts de grande taille.

#### **1.9.4. La greffe osseuse**

La greffe osseuse autologue (GOA) représente le traitement de référence dans la prise en charge des lésions non auto-régénératrices de l'os. La GOA correspond au prélèvement et à l'implantation de tissu osseux chez un même patient [69-75]. C'est le « gold standard » parce que le patient ne présente pas de réponse immunitaire à ses propres cellules (pas de phénomène de rejet du greffon) d'une part ; et d'autre part, le greffon possède des propriétés d'ostéogénicité (capacité intrinsèque à former de l'os), d'ostéoinduction (capacité à induire la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules ostéoprogénitrices : ostéoblastes) et d'ostéoconduction (capacité à supporter la néoformation osseuse). Depuis une quarantaine d'années, Burwell et al ont montré l'amélioration des guérisons de fracture lorsque des autogreffes d'os spongieux ont été implantées en raison de la présence de cellules ostéoprogénitrices dans le greffon. Il existe plusieurs types de greffe : spongieuse, corticale, cortico-spongieuse, corticale vascularisée (similaire à une greffe d'organe [76]). Ces GOA peuvent être prélevées au niveau de différents sites donneurs notamment la crête iliaque, les côtes, la symphyse mandibulaire, le tibia, le péroné, la calvaria...). Le site de prélèvement le plus fréquent est la crête iliaque qui permet d'obtenir les différents

greffons possibles. L'intégration de la greffe au niveau du site receveur s'effectue en trois étapes : d'abord une invasion du greffon par des néovaisseaux et des cellules ostéoprogénitrices provenant de l'hôte ; ensuite une différenciation ostéoblastique de ces dernières et une synthèse de matrice osseuse au sein du greffon servant d'ostéoconducteur ; enfin un remodelage de l'os néoformé par l'action des ostéoclastes.

Cependant, l'utilisation de greffe osseuse autologue est limitée par la disponibilité de la quantité prélevable. En effet, le prélèvement important de substance peut entraîner une morbidité du site donneur liée à la douleur, au risque infectieux, à la fragilisation mécanique. D'autre part, le temps opératoire est augmenté et la chirurgie est invasive du fait du prélèvement du greffon, majorant les risques anesthésiques, le coût de l'intervention et la durée d'hospitalisation.

C'est ainsi que des allogreffes sont proposées dans le traitement des pertes de substance et défauts de taille critique. Ces allogreffes sont obtenues à partir de prélèvements d'os cortical de cadavres et dévitalisées afin d'assurer leur stérilité, leur faible réponse immune et prévenir les risques de transmission de maladies. Le greffon ainsi traité est vidé de sa substance biologique et des facteurs bioactifs initialement contenus dans la matrice osseuse. Les allogreffes servent essentiellement d'ostéoconducteurs au niveau du site d'implantation. Elles ont montré un certain succès dans la restauration de fractures ; cependant, elles sont beaucoup moins efficaces que les GOA. Les allogreffes présentent encore des problèmes associés aux risques infectieux en dépit des techniques approfondies de dépistage et de décellularisation, ainsi qu'une faible ostéointégration au tissu hôte [77, 78]. L'efficacité limitée des allogreffes, principalement due à la faible ostéogénicité et à la faible porosité (laissant peu de possibilité de revascularisation, de microcirculation et de revitalisation), conduit à un remodelage insuffisant voire un échec du greffon.

Dans ce contexte, les cliniciens et les chercheurs développent des stratégies thérapeutiques et dispositifs médicaux permettant de régénérer les pertes de substance tout en étant d'une innocuité pour les patients. L'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) pourrait se présenter comme une solution alternative aux greffes.

#### 1.10. Ingénierie tissulaire osseuse

Dans l'optique de pallier les risques et inconvénients des greffes osseuses, des interventions chirurgicales invasives ainsi que le préjudice psycho-social lié aux prothèses obturatrices amovibles, les cliniciens, les scientifiques et les ingénieurs développent depuis une trentaine d'années, la médecine régénératrice ou la médecine translationnelle. Il s'agit de concilier les sciences médicales, biologiques, des matériaux et de l'ingénierie au service des populations, d'autant

plus qu'avec le vieillissement de ces dernières, les pathologies osseuses iront crescendo. L'ingénierie tissulaire osseuse est un des aspects de ces techniques de thérapies innovantes.

### **1.10.1. Définition de l'ingénierie tissulaire**

Selon Langer et Vacanti (1993), l'ingénierie tissulaire se définit comme un domaine de recherche médicale interdisciplinaire ayant pour but de développer des substituts biologiques dont la finalité est de restaurer, maintenir ou améliorer la fonction d'un tissu ou l'intégrité d'un organe grâce à l'association de matrices synthétiques et de médiateurs biologiques actifs. Ces derniers peuvent être des facteurs de croissance et/ou des cellules souches soit implantées avec la matrice, soit recrutées au niveau du site d'implantation. Ce domaine se trouve à la croisée des sciences de la vie et des principes de l'ingénierie [79].

### **1.10.2. Principe de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO)**

Quel que soit le terme utilisé (bio-ingénierie tissulaire, ingénierie tissulaire, génie tissulaire), l'ITO applique les principes des sciences médicales, biologiques, de la chimie des matériaux et des sciences de l'ingénieur pour le développement de substituts osseux fonctionnels visant au remplacement ou à la régénération du tissu osseux endommagé. Le « trépied » de l'ITO est donc formé d'un biomatériau (ou matrice) support de la formation osseuse, de cellules ostéogéniques et/ou de facteurs de croissance bioactifs (ou morphogènes). La procédure d'ITO peut être faite selon deux concepts :

- in vitro : par le prélèvement, l'amplification de cellules, l'agencement histologique et fonctionnel du tissu ;
- in vivo : directement, par régénération in situ, en utilisation de facteurs de croissance (BMP ou moelle osseuse totale par exemple); c'est ce deuxième concept qui a fait l'objet de nos travaux en tant que cliniciens.

### **1.10.3. Preuve de concept**

Des études cliniques utilisant des produits d'ITO ont montré une cicatrisation améliorée de fusions vertébrales et de pertes de substance osseuses [81, 82]. Wouter et al. (2011) ont rapporté des résultats prometteurs lors de régénérations osseuses de fentes alvéolaires comparant l'utilisation de BMP 2 et d'autogreffes osseuses. Cependant, les produits d'ingénierie tissulaire font face à de nombreux défis en tant que solutions thérapeutiques cliniques. En effet, ces challenges de l'ITO incluent la variabilité de la performance des produits utilisés, la validation des essais cliniques et l'évolutivité de la fabrication [83, 84, 85]. L'ITO reste encore une industrie «en développement» avec de nombreux produits n'ayant pas encore l'approbation de l'agence américaine de l'alimentation et du médicament FDA (Food and Drug Administration) [86, 87]. Par conséquent, les procédures de

greffes rentent encore le traitement de référence pour pas mal de problèmes de tissus et d'organes, y compris la régénération des défauts osseux.

#### **1.10.4. Les biomatériaux**

##### 1.10.4.1. Définition

Selon le petit Larousse, un biomatériau est une substance ou une matière destinée à être implantée dans un organisme vivant pour remplacer un tissu ou un organe ; (les prothèses, des plus simples [dentaires] aux plus complexes [trachée artificielle], sont faites avec des biomatériaux). Au plan scientifique, l'Institut National de la Santé des Etats-Unis (NIH : National Institute for Health), à l'issue de la conférence de consensus de 1982, définit un biomatériau comme « un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou associé à un principe actif, comme faisant partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou d'organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant la durée de son service in vivo »[88].

##### 1.10.4.2. Classification

Une classification des dispositifs médicaux dont font partie les biomatériaux, a été établie selon la directive européenne CE 93 42 ; elle distingue différentes classes:

- classe I : dispositifs médicaux non invasifs, ou invasifs mais à usage temporaire ;
- classe IIa : dispositifs médicaux invasifs à court terme et ceux à long terme de la sphère oro-pharyngée ;
- classe IIb : dispositifs médicaux invasifs à long terme, à usage autre que la sphère oro-pharyngée ;
- classe III : dispositifs médicaux invasifs à long terme, en contact avec le cœur, le système circulatoire et nerveux.

Pour l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM), les biomatériaux utilisés comme substituts osseux, qu'ils soient naturels ou synthétiques, sont classés dans la catégorie III et doivent comporter le marquage CE. Aussi, les biomatériaux doivent répondre à un cahier des charges imposé par les besoins cliniques et présenter certaines caractéristiques.

##### 1.10.4.3. Propriétés requises des biomatériaux utilisés en ITO

- Biocompatibilité : le biomatériau ne doit pas déclencher de réaction toxique ni inflammatoire sévère après son implantation, in situ ou à l'échelle de

l'organisme. Il doit être toléré sans risques cytotoxique, immunogène, cancérigène, tératogène, de libération de produits de dégradation toxiques pour l'organisme ;

- Ostéoconduction : le biomatériau doit servir de support structural à la formation osseuse de par sa porosité, par son envahissement vasculaire et cellulaire au contact de l'os natif receveur [89-95] ;
- Bioactivité : après implantation, des échanges s'établissent entre l'hôte et le matériau, l'interface os-biomatériau se fait directement sans interposition fibreuse ; favorisant la colonisation du biomatériau par l'os néoformé. C'est le cas des céramiques phosphocalciques. Par opposition, les céramiques dentaires sont bio-inertes ; ce qui leur permet de conserver leur translucidité et leur teinte sur les couronnes, mimant ainsi l'émail dentaire.
- Biorésorbabilité : elle correspond à la cinétique de dégradation du biomatériau in vivo. Idéalement, la résorption du matériau doit être contrôlée et inversement proportionnelle à la néoformation osseuse [96-102]. La biodégradabilité du matériau permet en outre d'éviter un second temps opératoire pour son dépôt après plusieurs années ; comme cela peut-être le cas pour certaines plaques d'ostéosynthèse. La dégradation des biomatériaux peut se faire par des phénomènes de dissolution physico-chimique, d'hydrolyse, de phagocytose, de résorption ostéoclastique [94, 103-106]. La dissolution physico-chimique dépend de l'environnement et implique une hydrolyse par les fluides extracellulaires ; la phagocytose est une réponse inflammatoire en réaction à l'implantation du biomatériau et est assurée par les macrophages ; la résorption ostéoclastique est médiée par des cellules.
- Porosité : les substituts osseux doivent posséder des tailles de pores propices à l'apport des nutriments (glucose par exemple), à l'évacuation des déchets, à la formation osseuse au sein du biomatériau. Des macropores de diamètre supérieur à 100µm favorisent la néovascularisation et la néoformation osseuse tout en limitant l'accumulation de tissus nécrotiques et/ou infectés [69, 90, 94, 99, 107-113]. La microporosité (diamètre inférieur à 10µm) quant à elle, favorise l'apport de fluides biologiques, la rugosité de surface, l'adhésion et la différenciation cellulaires. Ces pores doivent être interconnectés formant un réseau tridimensionnel, assurant l'envahissement osseux par ce labyrinthe jusqu'au cœur du substitut [112, 114, 115, 116].
- Stérilisabilité : les substituts osseux doivent pouvoir être stérilisés comme tout dispositif médical à usage clinique, sans entraîner une altération de leurs propriétés et caractéristiques physico-chimiques. Ce qui potentialise leur chance d'innocuité et de sécurité après implantation.

- Disponibilité clinique dans un grand volume : le biomatériau doit être facile d'utilisation en conditions opératoires et disponible en quantité suffisante pour une application clinique [91, 95, 107]. Ce qui suppose une malléabilité et une adaptation aisées lors de l'implantation dans le défaut à régénérer.
- Résistance mécanique : les biomatériaux doivent avoir une solidité suffisante assurant leur résistance lors de leur implantation, de leur mise en charge, ou plus tard lors des sollicitations mécaniques. En effet, les substituts osseux peuvent être soumis à des charges identiques à celles supportées par l'os en fonction. Cependant, la résistance mécanique ne doit pas altérer la bioactivité par une diminution trop importante des pores interconnectés.

#### 1.10.4.4. Différentes familles de biomatériaux utilisées en ITO

Les substituts osseux peuvent être soit naturels (d'origine humaine, animale ou végétale) soit synthétiques. Quelle que soit leur nature, les biomatériaux utilisés en ITO peuvent être répartis en quatre catégories selon Garcia-Gareta et al. 2015) : les polymères, les céramiques, les métaux et les matériaux composites. Dans le cadre de ce travail, nous mettons l'accent sur les produits les plus utilisés afin de pallier les substituts osseux d'origine humaine.

##### 1.10.4.4.1. Les polymères

Parmi les polymères, nous avons ceux d'origine naturelle notamment les protéines (collagène, fibrine, gélatine, fibroïne), les polysaccharides (cellulose, acide hyaluronique, chondroïtine sulfate, amidon, chitosan, pullulan, alginate, agarose, ...) ; les polymères synthétiques sont essentiellement l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), le polyméthylméthacrylique (PMMA), la poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), ...

##### ○ Les collagènes :

Ils représentent 90 % des protéines de la trame organique osseuse. Les collagènes ont connu un regain d'intérêt et une attention toute particulière ces dernières années à cause de leur excellente biocompatibilité, de leur dégradation en produits finaux physiologiques, de leur interaction appropriée avec les cellules et autres macromolécules [118]. Leur principal intérêt est leur forte affinité pour certains facteurs de croissance dont la BMP-2, ainsi que pour les cellules ostéoprogénitrices ; ce qui leur confère des propriétés ostéoinductrices. Ils peuvent se présenter sous formes d'éponges, de gels, de gélatines, de fibres, de poudres. Cependant, leurs inconvénients majeurs résident dans leurs faibles propriétés mécaniques, leurs risques de transmission d'agents pathogènes du fait de leur origine xénogénique.

○ La cellulose :

La cellulose, polysaccharide des membranes végétales, est le polymère naturel biodégradable le plus abondant sur la terre. Elle est utilisée depuis longtemps dans le domaine industriel, pharmaceutique et alimentaire, du fait de sa nature non toxique, de son écoulement contrôlé et de son caractère émulsifiant [38]. D'autre part, la cellulose présente des propriétés biologiques appropriées qui leur confèrent des applications médicales (éponges hémostatiques Surgicel®) [119].

L'hydroxypropyle-méthylecellulose (HPMC) est un éther de cellulose très utilisé dans la pharmacopée pour réaliser des comprimés ou des solutions visqueuses. L'unité INSERM, RMeS UMRS 1229 (ex-LIOAD UMRS 791), a dès les années 90, fonctionnalisé l'HPMC avec un silane afin de réaliser des hydrogels auto-réticulants pour éviter l'écoulement de l'HPMC, associé à des granules de phosphate de calcium, injecté dans l'organisme pour de la régénération osseuse [38, 39, 53, 54, 56-58, 120]. L'HPMC silanisé (HPMC-Si), soluble à pH >12,4, est un hydrogel auto-réticulant à température ambiante ou corporelle, par adjonction d'un tampon acide, pour avoir un pH final de 7,4. Le principe de l'auto-réticulation est basé sur le greffage du silane par une fonction époxy, le long de la chaîne de HPMC. L'HPMC-Si est un polysaccharide utilisé dans des applications biomédicales précliniques comme support matriciel, substitut injectable seul ou composite, associé à d'autres matériaux (polymères, céramiques phosphocalciques) [38, 39, 53, 58]. Ce biopolymère sera développé dans la partie expérimentale de notre travail de recherche.

○ Le chitosan :

C'est le deuxième biopolymère, biodégradable et biocompatible, le plus abondant de la nature après la cellulose. Le chitosan est obtenu par désacétylation (chimique ou enzymatique) de la chitine, coproduit de l'exosquelette (tête et carapace) des crustacées. En effet, la chitine est un polysaccharide d'origine marine ; c'est l'un des biopolymères les plus abondants au monde. La frontière entre le chitosan et la chitine dépend du degré de désacétylation : au-dessus de 60 – 70 %, le composé obtenu est le chitosan ; en-deçà, c'est la chitine. En milieu acide (pH < 6,5), le chitosan est soluble, chargé positivement. Ce qui lui permet de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement, et lui confère des propriétés adhésives [121]. Le chitosan trouve des applications dans le domaine agro-alimentaire, en médecine régénératrice du tissu osseux et cartilagineux, ainsi que dans le domaine biomédical, cosmétique, pharmaceutique... [121, 122, 123].

- Les polymères synthétiques :

Ce sont des substances macromoléculaires qui résultent de l'enchaînement répétitif d'unités identiques ou différentes les unes des autres. Ces polymères synthétiques sont biocompatibles, souvent chimiquement stables, moins immunogènes que les biopolymères. Ils présentent une faible densité permettant la fabrication de substituts légers dans des formes complexes, une structure similaire aux tissus biologiques. Leur production peut être reproductible et en très grande quantité. Leurs inconvénients en qualité de substituts osseux résident dans leur processus de dégradation et la réaction inflammatoire qui s'en suit [124].

Les polymères peuvent se présenter sous les formulations galéniques suivantes : gels, membranes, pâtes, mousses.

#### 1.10.4.4.2. Les céramiques

Les céramiques phosphocalciques représentent environ 60 % des substituts osseux de synthèse [125]. Elles sont obtenues par synthèse chimique à partir de poudre d'apatite déficiente en calcium (CDA : calcium deficient apatite). Les céramiques sont fabriquées par frittage à partir de poudre de CDA par compaction sous pression, densification, associée à un processus thermique. Le matériau ainsi obtenu a une composition inorganique proche de la trame minérale de l'os ; ce qui lui confère une biocompatibilité importante et quasiment pas de réponse immunitaire après implantation. La libération d'ions phosphate et calcium par ces céramiques semble impliquée dans la formation osseuse aussi bien dans le processus d'ostéoconduction en site orthotopique que dans l'ostéointégration selon Barradas et al. 2011 [28], et donc *in fine* dans l'ostéointégration [126]. Leur structure poreuse, avec une porosité interconnectée, leur confère une bioactivité excellente en termes de propriétés biologiques, même si cela inclut des propriétés mécaniques moindres. Les céramiques phosphocalciques présentent différentes formulations galéniques : pâtes, blocs, granules [35, 36].

- L'hydroxyapatite (HA) :

C'est le phosphate de calcium synthétique le plus proche de la trame minérale de l'os. En effet, la matrice osseuse inorganique est essentiellement composée de cristaux d'hydroxyapatite de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Le rapport Ca/P de ce composé phosphocalcique cristallin est de 1,67 ; il est très soluble en milieu aqueux, et sa résorption est très lente. De nombreuses études ont montré que l'HA ne se dégradait presque pas après implantation dans des pertes de substance osseuses, environ 1 à 2 % par an, ce qui ne permet pas la pénétration osseuse néoformée [94, 98, 105, 108, 127, 128, 129, 130, 131, 132].

L'HA est souvent utilisé en pratique humaine comme revêtement des implants orthopédiques et/ou dentaires.

○ Le phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) :

Cette céramique phosphocalcique de formule  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , avec un rapport Ca/P de 1,5 est un matériau dont la composition chimique est proche de celle de l'os. Le  $\beta$ -TCP est une céramique poreuse, biocompatible, totalement biodégradable *in vivo*, à l'opposé de l'hydroxyapatite. Le  $\beta$ -TCP présente une résorbabilité élevée de l'ordre de 10 % par mois, et est totalement dégradé au bout de 6 à 18 mois (3 mois selon certaines études) [94, 108, 117, 133]. Sa dégradation trop rapide ne pouvant être compensée immédiatement par la repousse osseuse, compromet son utilisation seule dans les grandes pertes de substance [134]. En pratique, le  $\beta$ -TCP est souvent associé à l'HA afin de contrebalancer les propriétés de dissolution de celui-ci.

○ Les phosphates de calcium biphasiques (BCP) :

Les BCP sont formés d'un mélange de HA et de  $\beta$ -TCP, permettant de potentialiser les propriétés de l'un et l'autre des composants. En fonction des rapports HA/ $\beta$ -TCP, la bioactivité des BCP peut être contrôlée par l'intermédiaire de la vitesse de résorption/formation osseuse. Les céramiques de BCP les plus utilisées ont un rapport HA/ $\beta$ -TCP de 20/80 devant le rapport 60/40 [134, 135, 136]. Plus le rapport HA/ $\beta$ -TCP est faible et plus la cinétique de dissolution est rapide [135, 136, 137]. La dégradation du  $\beta$ -TCP libère rapidement des ions phosphate et calcium stimulant la calcification. D'autre part, la lente dégradation de l'HA constitue une matrice stable propice à la repousse osseuse après la calcification. Fellah et al. (2008) et Lobo et al. (2010) ont rapporté dans leurs études utilisant des BCP, des résultats équivalents voire supérieurs à l'autogreffe [138, 139].

○ Les bioverres :

Les verres bioactifs ont été introduits comme substituts osseux par HENCH en 1937 [140]. Ils sont biocompatibles, ostéoconducteurs et permettent d'établir une interface os-biomatériaux directe sans interposition de tissu fibro-épithélial. La résistance mécanique des verres bioactifs est meilleure que celle des céramiques phosphocalciques ; cependant, elle est insuffisante pour assurer une mise en charge importante. Le principal inconvénient des verres bioactifs réside dans leur coût et leur usinage.

#### 1.10.4.4.3. Les métaux

Les métaux les plus utilisés sont le titane et les alliages base titane, le tantale, l'acier inox, le vanadium. Ils sont souvent indiqués comme implants orthopédiques ou dentaires, endoprothèses ou éléments d'ostéosynthèse. Le titane et ses alliages présentent une bonne biocompatibilité, une résistance à la corrosion grâce à la couche d'oxyde de passivation qui se forme spontanément à leur surface, au contact de l'oxygène de l'air ou présent dans les fluides biologiques. L'interface os-métal, parfois fibreuse, compromettant l'ostéointégration du matériau, est améliorée grâce au revêtement d'hydroxyapatite. Cependant, la technologie de la projection par plasma permettant le revêtement d'HA est très complexe [141]. Les métaux se présentent sous forme de broches, de grilles, de plaques, de vis.

#### 1.10.4.4.4. Les matériaux composites

Il s'agit de la combinaison de matériaux de natures différentes. Généralement, les matériaux composites sont constitués d'une phase inorganique (phosphate de calcium) et d'une phase organique (polymères synthétique ou naturel), afin de mieux mimer les fonctions naturelles de l'os [39, 53, 54, 57, 58, 120, 138]. La bioactivité ainsi que les propriétés mécaniques de ces matériaux sont améliorées par la modulation de leur cinétique de résorption-dégradation, leur potentiel de libération progressive de facteurs de croissance *in situ*, leur interaction avec le système immunitaire du receveur et la réaction inflammatoire suivant l'implantation. Malgré leur développement récent, les matériaux composites ont montré des résultats prometteurs *in vivo* et dans des essais précliniques [39, 51, 52, 53, 58].

Actuellement, de nouvelles techniques de fabrication permettent d'envisager des biomatériaux spécialement conçus pour des formes et applications personnalisées [143]. Ces nouveaux procédés sont le prototypage rapide, la bioimpression 3D [107, 136, 144, 145]. Ils ont pour but de créer un biomatériau résorbable, parfaitement adapté à la morphologie de la perte de substance osseuse du patient ; c'est du domaine de la médecine personnalisée.

### **1.10.5. Les facteurs de croissance**

A la suite d'une perte de substance, la néoformation osseuse nécessite, en dehors des facteurs inflammatoires (interleukines : IL et TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), la présence de facteurs de croissance. Ces derniers proviennent de la matrice osseuse et des tissus environnants ; ils agissent sur le recrutement des cellules souches mésenchymateuses vers le site lésionnel, leur prolifération et leur différenciation en cellules chondrogéniques ou ostéoblastiques. Ils agissent aussi

dans la néoangiogenèse. Ces facteurs de croissance sont généralement des protéines (TGF- $\beta$ , BMP, FGF, VEGF, EGF, IGF,...) dont les BMP sont les plus étudiées en ITO, ostéoinductrices, actuellement utilisées en clinique [89, 92, 108, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152]. A ce titre, dans le cadre de la recherche translationnelle, la BMP-2 a été choisie dans ce travail, pour ses propriétés ostéoinductrices connues [153, 154, 155, 156].

#### 1.10.5.1. Les protéines morphogéniques osseuses ou BMP (Bone Morphogenetic Proteins)

Les BMP sont les protéines morphogéniques de l'os les plus connues. Elles ont été découvertes par Marshall Urist en 1965 qui a démontré l'ostéoinduction d'une matrice osseuse déminéralisée (DBM Demineralized Bone Matrix), dépourvue de toutes cellules vivantes, après implantation en site ectopique. Ce sont des glycoprotéines représentant 0,1 % des protéines totales de l'os [92, 148, 149, 157, 158, 159]. Les BMP sont une quarantaine et appartiennent à la super famille des facteurs de croissance TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factors) à l'exception de la BMP-1 qui est une métalloprotéine [160, 161]. Plusieurs BMP sont impliquées dans le métabolisme osseux (BMP-2, 3, 3b, 4, 7, 8a, 13, 14, 16, 17) ; mais seules les BMP-2 et 7, du fait de leur fort potentiel ostéoinducteur, ont bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une utilisation en clinique.

Les BMP sont excrétées naturellement par les cellules de la moelle hématopoïétique, les plaquettes, les myocytes, les ostéoclastes, les cellules du périoste et de l'endoste, sous forme de longues chaînes polypeptidiques. Le traitement acide et enzymatique de déminéralisation et de purification de ces protéines naturelles d'origine humaine ou bovine réduit considérablement leur rendement (1 à 2  $\mu$ g/kg de matrice osseuse déminéralisée) [148]. Actuellement, les BMP synthétiques utilisées sont fabriquées par génie génétique. Les produits obtenus (par ex : rhBMP2 : recombinant human BMP2) sont actifs, purs, stables, stériles, conservables un an à température ambiante, commercialisés avec un support assurant leur libération au niveau du site d'implantation.

##### 1.10.5.1.1. Mécanisme d'action

Les BMP sont des médiateurs extracellulaires ; elles vont se lier à des récepteurs membranaires afin de transduire le signal au noyau. Les récepteurs des BMP sont de la même famille que ceux des TGF- $\beta$ . Ils sont impliqués dans la voie de signalisation TGF- $\beta$ /SMAD ; les SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) sont des protéines qui vont activer les gènes responsables de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse [148, 159, 160, 162, 163, 164, 165]. L'action des BMP sur les cellules progénitrices indifférenciées peut être modulée par des facteurs environnementaux comme la tension en oxygène ; l'hypoxie induirait une

différenciation vers la voie chondrogénique [166]. La voie ostéogénique dépend des autres signaux transmis aux cellules.

Les activités des BMP sont multiples. Les BMP-2 et 7 sont impliquées dans l'ostéogenèse et la chondrogenèse. Elles sont impliquées de façon notoire dans les processus d'ossification membranaire, enchondrale ou les deux à la fois [148, 151, 159, 160, 167, 168, 169, 170, 171]. Les BMP activent le recrutement, la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que les processus de synthèse de matrice minéralisée et de maturation osseuse par le biais des ostéoblastes et des ostéocytes [146, 168, 169]. Au cours de la cicatrisation osseuse, les BMP-2 agissent précocement, pendant la phase inflammatoire, sur la différenciation ostéoblastique (et/ou chondrocytaire) ; alors que la BMP-7 agit de façon plus tardive sur la maturation et le remodelage osseux [151, 160, 170, 172, 173]. L'activité de la BMP-2 est prépondérante et cruciale dans la mesure où elle stimule la cascade et l'activation des autres BMP et TGF- $\beta$  [160, 171].

D'autre part, les BMP stimulent directement ou indirectement la néoangiogenèse au cours de la régénération osseuse, particulièrement au stade du cal solide ou ostéo-cartilagineux [151, 159, 162, 169, 171, 174]. L'ostéogenèse est couplée à l'angiogenèse du fait de l'affinité et des anastomoses existant entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales ; ce qui favorise la néoformation osseuse [151, 159]. Cependant, les mécanismes impliqués restent encore non élucidés.

De même, l'activité des BMP au cours de l'ostéoclastogenèse peut être directe ou indirecte. Le recrutement et la différenciation ostéoclastiques sont stimulés indirectement par les BMP-2 [151, 165, 175, 176], tandis que leur action est directe sur le recrutement des ostéoclastes matures [148, 177]. Des cellules TRAP-positives (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) notamment ostéoclastes et précurseurs, intervenant dans le nettoyage post-lésionnel des débris osseux, sont recrutées dans les phases initiales de la régénération osseuse [151].

#### 1.10.5.1.2. Caractéristiques pharmacocinétiques

Les données pharmacocinétiques des BMP restent encore mal connues. La demi-vie des BMP varie selon les sources et les modèles utilisés [178]. Selon l'Agence Européenne des Médicaments (EMA : [ema.europa.eu](http://ema.europa.eu)), une étude réalisée sur des rats avec de la rhBMP-2 (Dibotermine- $\alpha$ ) indique une demi-vie de 16 minutes après injection intraveineuse. La protéine est active au site d'implantation ; associée à une éponge de collagène, elle a persisté 4 à 8 jours au niveau du site d'implantation grâce à un suivi par marquage radioactif. Les effets systémiques décrits sont très faibles ; un taux circulant maximal de 0,1 % de la dose implantée de Dibotermine- $\alpha$  a été observé 6 heures après l'implantation. L'élimination de la BMP se fait essentiellement par voie urinaire [178].

Le support matriciel ou système de délivrance ou véhicule joue un rôle important dans la libération des protéines morphogéniques de l'os. Ce transporteur doit idéalement pouvoir protéger les BMP afin d'éviter la dénaturation des protéines, assurer un profil de libération progressive et limiter la diffusion du produit actif en dehors du site d'implantation [127, 148, 159, 161, 169, 178, 179, 180, 181]. Le support doit avoir des propriétés rétentives et d'adsorption importantes, une capacité à libérer progressivement la protéine. Le collagène, biocompatible, est souvent utilisé mais présente une libération flash des BMP au niveau du site d'implantation [148, 152, 180, 182, 183]. Il en est de même avec la matrice osseuse déminéralisée, les céramiques phosphocalciques et le corail malgré leur bonne affinité avec les BMP liée à la présence de calcium [159, 178, 181, 183, 184, 185]. Pour pallier la libération rapide de BMP, souvent des doses largement supérieures à la sécrétion endogène sont appliquées [161, 186]. Le développement des substituts composites pourrait être une alternative grâce à l'encapsulation des protéines osseuses dans les réseaux des polymères [39].

L'efficacité des BMP-2 et BMP-7 dans le traitement de défauts osseux de taille critique a été montrée par de nombreuses expérimentations animales et des études cliniques [159, 169, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193]. La FDA (Food and Drug Administration) a accordé des autorisations limitées de BMP-2 et de BMP-7 en chirurgie orthopédique et traumatologique. La BMP-2 a pour dénomination commune internationale (DCI) Dibotermine- $\alpha$ , et pour nom commercial Inductos<sup>®</sup> (rhBMP2 : Infuse Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, TN, USA). Elle est présentée sous la forme d'une poudre lyophilisée, associée à une éponge de collagène de type I d'origine bovine. Son AMM couvre la fusion vertébrale et le traitement des pseudarthroses tibiales chez l'adulte, en complément de la thérapeutique standard ou comme alternative à la GOA.

La BMP-7 de DCI Eptotermine- $\alpha$  est commercialisée sous le nom d'Osigraft<sup>®</sup> (rhBMP-7, OP-1, Putty Stryker, Kalamazoo, MI, USA). Sa forme galénique est une poudre lyophilisée pour suspension, associée à une matrice de collagène de type I d'origine bovine sous forme de granules. Elle est indiquée selon son AMM pour les fractures tibiales non consolidées de plus de 9 mois, post-traumatiques chez l'adulte ; comme alternative à l'autogreffe secondaire (une première GOA ayant échoué).

Des résultats cliniques ont montré l'efficacité et l'innocuité relative des BMP comparées à l'autogreffe selon Govender et al. (2002). Une cicatrisation osseuse de 40 à 100 % a été observée avec un taux moyen d'union osseuse de 80 % dans le traitement de fractures ouvertes tibiales et fémorales [159, 169, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193]. Cependant, la Haute Autorité de la Santé (HAS) a qualifié le Service Médical Rendu (SMR) par cette technique « faible » en 2015, alors qu'il était considéré comme « important » en 2003 et « modéré » en 2006.

Dans le domaine maxillo-facial, peu d'études sont disponibles quant à l'utilisation des BMP [194]. En effet, selon les recommandations des fabricants, les BMP sont contre-indiquées à la mandibule, en zone irradiée ou d'antécédent tumoral et sur le squelette immature. Néanmoins, des cas cliniques de régénération osseuse utilisant des BMP ont été publiés dans le domaine cranio-maxillo-facial : en chirurgie pré-implantaire par comblement alvéolaire et élévation sinusienne [194, 195] ; reconstructions de fentes alvéolaires [196, 197, 198, 199] ; reconstructions crâniennes, maxillo-faciales, mandibulaires [200, 201, 202].

Les traitements à base de BMP-2, considérés pendant longtemps comme onéreux, sont dans certaines situations plus abordables que la greffe osseuse autologue. Des économies conséquentes ont été notées en comparant le traitement de fractures tibiales par éponge de collagène imprégnée de BMP et la GOA ; ceci en minorant les risques infectieux et un deuxième site opératoire [203, 204]. Malgré leur efficacité prouvée, les BMP présentent des effets indésirables qui limitent encore leur utilisation à grande échelle en clinique [180, 205, 206]. Ces effets sont en rapport avec des doses supra-physiologiques et/ou libération de quantités importantes de BMP aux sites d'implantation, du fait de l'inadéquation de supports matriciels [180]. Ces complications, parfois sévères, se manifestent par une inflammation locale au site d'implantation, une formation d'os ectopique, de kyste ossifiant, une résorption osseuse et/ou du substitut [159, 161, 169, 174, 175, 180, 203, 207, 208, 209, 210]. Hughes, 2013 ; Kelly, 2014 ont rapporté des interactions probables entre les facteurs de croissance et les cellules tumorales, quelle que soit leur nature, même si le risque est jugé minime. Ce qui expliquerait la contre-indication des BMP dans les suites de cancers.

#### 1.10.5.2. Autres Facteurs De Croissance

En plus des BMP, d'autres facteurs de croissance ont été identifiés comme stimulant les cellules indifférenciées en pré-ostéoblastes, ou comme potentiellement ostéoinducteurs. Il s'agit essentiellement de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [213]. Des concentrés plasmatiques riches en plaquettes (PRP : plasma riche en plaquettes), riches en fibrine (PRF : plasma riche en fibrine), obtenus après centrifugation de sang total, auraient également un potentiel ostéoinducteur selon Arpornmaeklong, 2004 [214].

#### 1.10.6. Les cellules ostéogéniques

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, les travaux de l'allemand Julius Cohnheim (1839-1884) montrent la possibilité de migration de cellules issues de la moelle osseuse de la lignée non hématopoïétique vers des sites lésés, et de contribuer à leur régénération (cicatrisation de la peau, formation de cal osseux). C'est le début de

la recherche sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées de la moelle osseuse et la thérapie cellulaire appliquée à la reconstruction de l'os [215, 216, 217, 218]. Ce sont des cellules multipotentes, capables de proliférer, de s'auto-renouveler et de se différencier vers tous les types cellulaires de leur feuillet embryonnaire d'origine (ectoderme, endoderme, mésoderme) [219]. Le chercheur soviétique Alexander Friedenstein (1924-1998) découvre en 1968, des cellules capables d'adhérer au plastique, de former des colonies clonogéniques (cellules issues de mitose parfaitement identique à la cellule d'origine) *in vitro*, de produire *in vivo* de l'os, du cartilage, du tissu adipeux et du tissu fibreux. C'est dans les années 1990 que seront isolées pour la première fois, des cellules souches embryonnaires humaines d'où le caractère récent de ce domaine de la biologie. Ces dernières sont encore interdites d'utilisation dans de nombreux pays dont la France (les Etats-Unis entre 2003-2008) pour des raisons bioéthiques [220].

Les applications cliniques des CSM sont diverses, variées et en plein essor. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, les CSM présentent un grand intérêt en tant que précurseurs des pré-ostéoblastes et donc des ostéoblastes et ostéocytes. Les CSM issues de la moelle osseuse constituent la première source cellulaire utilisée dans la reconstruction osseuse devant les CSM d'origine adipeuse (Trojani, 2008). Cependant, leur utilisation de façon isolée dans les pertes de substance osseuses est très rare, et des études cliniques ont montré que la formation osseuse obtenue n'était pas liée aux seules CSM implantées [221, 222]. Mélangées à un matériau ostéoconducteur, les CSM ont contribué à la réparation osseuse chez quelques patients [223, 224]. Leurs combinaisons avec des biomatériaux posent cependant des problèmes de probables modifications de leurs propriétés biologiques par ces derniers [225].



## 2. ETUDE EXPERIMENTALE

### 2.1. Problématique

Les pertes de substance osseuses cranio-maxillo-faciales, qu'elles soient d'origine congénitale ou acquise, suite à un traumatisme, une infection ou une chirurgie d'exérèse carcinologique, nécessitent une réhabilitation. Celle-ci permet de rétablir les fonctions manducatrices et de restaurer l'aspect esthétique et le psychisme des malades concernés. Dans cette optique, la greffe osseuse autologue (GOA) reste le « gold standard ». Cependant, le prélèvement de greffon osseux, nécessitant un second temps opératoire, peut-être plus ou moins associé à une morbidité du site donneur [226, 227, 228]. Les alternatives à la GOA que sont les allogreffes et les xélogreffes, présentent elles aussi, les restrictions liées aux risques de rejet tissulaire, de contamination croisée, ou d'épizootie [229, 230] ; d'où la nécessité de mettre en place des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse. Cependant, l'utilisation de produits d'ITO demeure actuellement un challenge pour les cliniciens et les chercheurs. En effet, de nombreuses combinaisons de supports matriciels, de facteurs de croissance et/ou de cellules ostéogéniques sont possibles [70, 108, 186, 231]. Les associations de céramiques phosphocalciques et de CSM ou d'autres ostéoprogéniteurs tels que la moelle osseuse, ont montré des résultats encourageants. En effet, des CSM ensemencées sur des granules de BCP ont présenté un potentiel ostéogénique *in vivo*, et en application orthopédique [221, 224, 232-236]. Depuis plusieurs années, des chercheurs de notre unité RMeS, INSERM U-1229 ont pu élaborer des stratégies d'ITO associant des ostéoprogéniteurs (moelle osseuse totale : MOT ou CSM) à des granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) [53, 54, 58, 237, 238, 239]. Ils ont pu montrer en site ectopique murin, la supériorité de la condition MOT + BCP par rapport à CSM + BCP. En site orthotopique, le substitut osseux associant BMP2 + BCP a induit une néoformation osseuse supérieure aux conditions MOT + BCP et CSM + BCP.

Le succès des thérapies d'ingénierie tissulaire dépend essentiellement de l'interaction et de la synergie d'ensemble entre le biomatériau support, les cellules et/ou les morphogènes utilisés pour restaurer les tissus endommagés [240]. Ainsi, la recherche s'est axée sur la détermination de méthodes permettant la délivrance efficace de facteurs de croissance, de cellules et autres agents bioactifs au niveau des sites d'implantation. Un des aspects de stratégies d'ingénierie tissulaire consiste à administrer des facteurs de croissance afin d'induire le recrutement et la différenciation cellulaire, leur migration, leur prolifération et/ou la production de matrice. C'est le cas des techniques d'ITO médiées par la BMP2. Cependant, ces stratégies peuvent être limitées par la stabilité de la protéine, sa localisation et son efficacité thérapeutique au site d'implantation, entraînant quelquefois l'utilisation de fortes doses ou des administrations fréquentes. Pour remédier à ces

limites, différents systèmes de délivrance des protéines sont à l'étude ou testés, afin d'assurer leur stabilité au site d'implantation, un relargage contrôlé et le maintien d'une concentration thérapeutique physiologique. Parmi ces méthodes de libération, il y a l'encapsulation des morphogènes dans des polymères, l'adsorption sur des supports matriciels basée sur l'affinité. Les BMP2 sont souvent utilisées avec des supports collagéniques ou des matrices osseuses déminéralisées [35, 241, 242, 244]. Actuellement, le collagène est le seul support approuvé pour la BMP2 par la FDA aux Etats-Unis. Les recherches ont montré une faible liaison de la BMP2 au collagène, aboutissant à son élimination rapide du support et à une diminution rapide de sa concentration locale. En outre, la BMP2 soluble ou libre perd rapidement sa bioactivité en raison de la dégradation protéolytique et de la dénaturation possible provoquée par les conditions physiologiques (pH, température...). Par conséquent, des efforts accrus sont faits dans l'optique soit d'encapsuler la BMP2 afin de la protéger de la dégradation, soit d'améliorer l'affinité de la liaison entre la BMP2 et son support [244, 245, 246, 247, 248].

## 2.2. Objectifs

L'objectif général de notre travail de thèse est de contribuer au développement d'un substitut osseux auto-réticulant, améliorant l'efficacité et la libération locale de BMP2 au site d'implantation et donc la régénération osseuse de grande perte de substance.

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé un biomatériau composite constitué par des particules de phosphate de calcium biphasé (BCP ostéoconducteur) en suspension dans un hydrogel auto-réticulant à base d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisée (HPMC-Si permettant l'encapsulation de la BMP2). L'hypothèse de ce travail est que le relargage contrôlé de BMP2 induirait la régénération osseuse *in vivo* en site orthotopique sans engendrer d'effets indésirables.

De façon plus spécifique, nous allons déterminer le profil de libération de molécules encapsulées dans les mailles de l'hydrogel d'HPMC-Si *in vitro*. L'hypothèse est qu'une libération progressive d'une molécule permet de conserver une concentration constante dans la matrice support.

Ensuite, nous évaluerons le potentiel ostéoinducteur ainsi que le rôle ostéogénique du substitut osseux auto-réticulant (BCP + HPMC-Si) chargé en BMP2 dans un défaut osseux de taille critique *in vivo*. L'hypothèse est que le relargage contrôlé de la BMP2 induira la néoformation osseuse ainsi que le recrutement et la différenciation de cellules indifférenciées de l'hôte en cellules ostéoprogénitrices. A la suite de cette étude, nous allons évaluer la capacité ostéoinductrice d'un

substitut osseux auto-réticulant combinant des hydrogels à base de chitosan silanisé (CHI-Si) et d'HPMC-Si, associé à la BMP2 à induire la formation osseuse dans un défaut de calvaria de taille critique. Le chitosan est un polymère biocompatible, biodégradable, bactériostatique et fongistatique. L'hypothèse est que l'utilisation de CHI-Si + HPMC-Si associé à un relargage progressif de BMP2 améliorera la dégradabilité du matériau et la repousse osseuse.

Du fait de notre formation de clinicien, les travaux effectués au cours de cette thèse sont volontiers orientés dans un contexte préclinique. Ils ont été conçus en vue d'aboutir à l'élaboration de produits d'ITO dont la préparation est compatible avec une application clinique aisée.

### 2.3. Etude in vivo

L'objectif général de cette étude est la contribution au développement d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR), améliorant l'efficacité et la libération prolongée de facteurs de croissance au niveau du site d'implantation, et par conséquent la régénération osseuse de grandes pertes de substance.

De façon plus spécifique, nous évaluerons le potentiel ostéoinducteur d'un substitut osseux auto-réticulant. Il s'agit d'un matériau composite, constitué d'un mélange d'hydrogel (HPMC-Si) et de granules de phosphate de calcium biphasés (BCP) chargé en BMP2.

#### **2.3.1. Evaluation de SOAR+BMP2 sur un défaut segmentaire de taille critique d'ulna de chien**

Cette étude expérimentale avait pour but de déterminer si le mélange HPMC-Si / BCP, chargé d'une dose physiologique en clinique vétérinaire de BMP2, induirait la cicatrisation osseuse d'un défaut segmentaire in vivo.

L'hypothèse est que l'encapsulation de BMP2 dans les mailles de l'hydrogel permettrait un relargage contrôlé du morphogène ainsi que le recrutement et la différenciation de cellules indifférenciées en cellules ostéoprogénitrices au site d'implantation.

##### 2.3.1.1. Introduction

Les recherches en ingénierie tissulaire osseuse se focalisent sur le décryptage et l'optimisation des rôles des différents composants impliqués dans la régénération de l'os. L'une des alternatives à l'autogreffe, à l'allogreffe ou à la xélogreffe est le développement de substituts osseux biomimétiques capables de soutenir l'invasion cellulaire et la néoformation tissulaire. De telles matrices constituent

des éléments clés dans le concept des matériaux ostéoinducteurs [28]. Ces biomatériaux ostéoinducteurs ont la capacité de contribuer à la réparation des grandes pertes de substance [29]. Cependant, ces substituts seuls ne suffisent pas à induire la cicatrisation osseuse de ces grands défauts de taille critique. Dans cette optique, nous avons développé un matériau composite associant une matrice minérale à base de granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) et un polymère organo-minéral à base d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé (HPMC-Si). Ce substitut osseux auto-réticulant permet l'encapsulation et la libération progressive de molécules des mailles de l'hydrogel d'HPMC-Si. Ceci permettrait de contourner la libération rapide de morphogènes des matrices collagéniques souvent indiquées ou l'application de doses importantes et/ou fréquentes de facteurs de croissance.

Les stratégies d'ingénierie tissulaire incluant des agents bioactifs tels que la BMP2, constituent une alternative prometteuse à la greffe osseuse. Les protéines morphogénétiques osseuses ont été décrites comme ostéoinductrices, du fait de leur habilité à induire la formation de tissu minéralisé en site ectopique. Les essais murins d'implantation sous-cutanée ou intramusculaire pour induire la formation osseuse ectopique constituent le modèle standard in vivo. [30, 249,250]

Cependant, le test ectopique ne représente pas un modèle cliniquement pertinent pour la réparation des pertes de substance en site orthotopique. Aussi, un défaut segmentaire de taille critique sera utilisé dans cette étude expérimentale pour évaluer le potentiel de la BMP2 encapsulée dans un substitut osseux auto-réticulant à induire et à maintenir le processus de régénération osseuse. [31, 32, 33, 34]

L'objectif de cette étude était de déterminer le potentiel ostéoinducteur du substitut osseux auto-réticulant chargé en BMP2 à favoriser la cicatrisation d'un défaut segmentaire d'ulna de chien ; en comparaison au même matériau composite (HPMC-Si / BCP) dépourvu de BMP2. Une greffe autologue d'os spongieux (sur une autre étude) a été utilisée comme contrôle positif.

### 2.3.1.2. Matériel et méthode

#### 2.3.1.2.1. Substituts osseux auto-réticulant

Le SOAR composé d'un mixte de granules de BCP et d'hydrogel d'HPMC-Si était préparé immédiatement avant la chirurgie, dans des conditions d'hygiène et d'asepsie opératoires. La trame minérale est constituée de granules de phosphate de calcium biphasé (BCP), macro- microporeux de 0.5 à 1 mm de diamètre (Graftys, Aix-en-Provence, Marseille). Le rapport hydroxyapatite – phosphate tricalcique  $\beta$  (HA/ $\beta$ -TCP) est de 60/40 en poids, après analyse par spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX : Energy Dispersive X spectroscopy).

L'hydroxyapatite, beaucoup moins soluble que le  $\beta$ -TCP, favorise l'ostéoconduction ; alors que la dissolution du  $\beta$ -TCP, en relarguant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ , permet la re-précipitation en surface d'apatites biologiques bioactifs [35]. Ainsi, les BCP sont largement utilisés comme matrice de comblement en orthopédie, en chirurgie crânio-maxillo-faciale et dentaire [36], mais aussi en chirurgie vétérinaire dans une moindre mesure [37].

La trame organo-minérale du SOAR est constituée d'un hydrogel à base d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé (HPMC-Si). L'HPMC (hydroxypropyle-méthylecellulose) est un éther cellulosique hydrosoluble qui a été fonctionnalisé au sein du laboratoire RMeS, INSERM UMRS 1229, avec un silane pour former des hydrogels auto-durcissant afin d'éviter l'écoulement de l'HPMC lors d'applications cliniques. Le principe de l'auto-réticulation de l'hydrogel d'HPMC-Si repose sur le pontage du silane sur les fonctions époxy le long des chaînes de HPMC. Le silane utilisé dans cette étude est le 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS). La dissolution de l'HPMC-Si a lieu en milieu basique fort (solution de NaOH à pH 13.2), conduisant à l'ionisation du silane en silanolate de sodium ( $\text{SiO}^- \text{Na}^+$ ). Le pH limite de stabilisation du silanolate de sodium est d'environ 12.1 à 12.2 ; en deçà, ces derniers se transforment en silanols ( $-\text{SiOH}$ ) [38]. Les silanols peuvent subir des réactions de condensation, formant un réseau tridimensionnel au niveau des chaînes d'HPMC-Si.

La préparation de solutions aqueuses d'HPMC-Si peut se faire à différentes concentrations. Ces solutions de polymères à pH 12.9 sont obtenues par dissolution de poudre d'HPMC-Si dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 0.2 M) à 25° pendant 48H sous agitation constante. Elles sont ensuite dialysées dans des membranes avec des pores de 6000-8000 Daltons en milieu basique (3.8L de NaOH 0.09M pendant 16H ; puis 4L de NaOH 0.09 M durant 2H). Les solutions d'HPMC-Si sont ensuite aliquotées dans des flacons sertis avant d'être stérilisées à l'autoclave pendant une demi-heure à 121°.

La réticulation de l'hydrogel d'HPMC-Si visqueux et basique est obtenue en ajoutant un tampon acide de pH 3.6 à base de 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). Celui-ci est préparé en mixant 3.2 g de HEPES avec du chlorure de sodium (NaCl 1.4 g) et de l'acide chlorhydrique (30 mL de HCl 0.1 M). Une proportion de 2 volumes de gel d'HPMC-Si pour un volume de tampon acide (2/1 v/v) permet d'aboutir à la réticulation de l'hydrogel avec une pression osmotique et un pH physiologiques (7.4) à température ambiante suivant une réaction de polycondensation non exothermique.

#### 2.3.1.2.2. Facteur de croissance BMP2

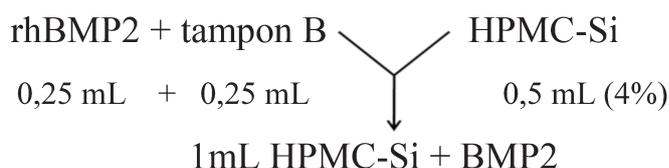
L'agent bioactif utilisé est la rhBMP2 (recombinant humain de la BMP2) (TruScient kit de 0.66 mg ; implant pour chien de chez Pfizer). C'est de la Dibotermine alpha (protéine ostéogénique humaine recombinante-2 : la rhBMP2) ; c'est une protéine humaine dérivée d'une lignée cellulaire recombinante d'Ovaire de Hamster Chinois (CHO).

Le kit TruScient se présente sous forme de lyophilisat de 0.66 mg avec un flacon de solvant de 3.2 mL, permettant l'obtention après reconstitution, d'une solution de Dibotermine alpha à 0.2 mg/mL de rhBMP2. L'agent bioactif ainsi préparé (rhBMP2) doit être utilisé au moins 15 minutes avant l'opération, et au maximum 2 heures après sa reconstitution.

#### 2.3.1.2.3. Préparation du SOAR

Le substitut osseux auto-réticulant (SOAR) chargé en BMP2 est préparé extemporanément en peropératoire par encapsulation du morphogène dans les mailles du réseau tridimensionnel de l'HPMC-Si, et en suspendant les granules de BCP dans l'hydrogel.

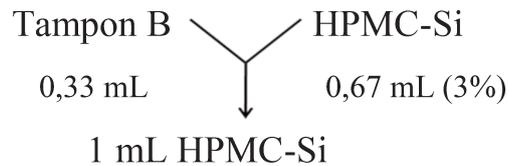
Afin de respecter les recommandations du fabricant pour obtenir une concentration finale de Dibotermine alpha de 0.2 mg/mL (à utiliser avec deux éponges de collagène), nous avons mixé le lyophilisat (0.66 mg) avec 1.6 mL de solvant (au lieu de 3.2 mL). 0.25 mL de cette solution est ajoutée à 0.25 mL de tampon acide (HEPES B) et mélangée à 0.5 mL de HPMC-Si (4 %). Ce qui donne au final 1mL d'hydrogel HPMC-Si (à 2 % w/v), chargé de BMP2 (à 0.2 mg/mL). 600 mg de granules de BCP y sont suspendus afin d'obtenir un SOAR chargé en BMP2 moulable, dans un rapport 50/50 (w/v).



1mL (HPMC-Si + BMP2) + 600mg BCP = SOAR + BMP2 (50/50 w/v)

(HMPC-Si / BCP + BMP2 : SOAR chargé en BMP2).

Le contrôle négatif est un mixte de: 1 mL HPMC-Si + 600mg BCP, dépourvu de BMP2.



1 mL HPMC-Si + 600 mg BCP = SOAR sans BMP2. (50/50 w/v).

(HPMC-Si / BCP : SOAR sans BMP2) = contrôle négatif ;

Une greffe osseuse autologue (GOA) réalisée sur 5 autres chiens (étude antérieure), avec un prélèvement d'os spongieux au niveau de l'humérus ipsilatéral, nous a servi de contrôle positif à la régénération d'un défaut segmentaire de 2 cm d'ulna.

Le délai de l'étude avant l'euthanasie des animaux était de 20 semaines.

#### 2.3.1.2.4. Animaux

Cette étude a été menée sur 5 chiens beagles adultes après l'approbation du comité d'éthique et d'expérimentation animale des Pays de la Loire (CEEA Pays de la Loire N° 2012.120) et avec l'aval du Comité local pour le bien-être des animaux de l'ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Ces animaux ne présentaient pas de pathologies ostéo-articulaires à l'issue des examens cliniques et paracliniques effectués.

#### 2.3.1.2.5. Anesthésie et procédure chirurgicale

Chaque animal a bénéficié d'une injection de morphine une demi-heure avant l'induction de l'anesthésie générale. Celle-ci était à base de propofol (6mg/kg en IV) avec un maintien à l'isoflurane dans un circuit de ventilation spontanée à 100 % d'oxygène sans ré-inspiration. Une antibioprophylaxie a été effectuée en même temps que l'anesthésie générale avec 30 mg/kg de cefalexine en IV.

Sur les animaux en décubitus latéral, une incision cutanée et une réclinaison des tissus mous découvre le tiers médian de chaque ulna. Des repères radiographiques, situés entre les articulations sus et sous jacentes, sont appliqués en peropératoire afin de s'assurer de la situation précise et de la reproductibilité du défaut au niveau du site opératoire.

Des défauts segmentaires de 2 cm de long sont réalisés sur chaque ulna, droit et gauche par une ostéotomie englobant le périoste, à l'aide d'un oscillostome rotatif sous irrigation constante de sérum salé. Les membres ont été immobilisés avec

des plaques d'ostéosynthèse LCP 8-hole 2.4 fixées au moyen de 5 vis dont 3 proximales et 2 distales.

Les défauts ont été comblés avec le SOAR chargé en BMP2 pour l'ulna gauche, et le SOAR seul à droite. A la fin de l'intervention, les sites opératoires ont été fermés par des sutures hermétiques, plan par plan.

Les soins postopératoires ont consisté en l'administration orale d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS : Meloxicam 0,1mg/kg) pendant 5 jours et de pansements locaux quotidiens pendant 3 jours. Les animaux étaient gardés dans des cages individuelles afin de s'assurer des bonnes suites opératoires pendant 3 jours avant d'être libérés des niches.

#### 2.3.1.2.6. Contrôles radiographiques

Des clichés radiographiques de face et de profil ont été réalisés sur chaque animal, immédiatement après la chirurgie afin de contrôler la position et la moulabilité du SOAR au niveau du défaut osseux segmentaire. Un suivi radiologique à différents temps : 8, 12 et 20 semaines postopératoires, a été effectué. Il a permis d'apprécier qualitativement, la minéralisation ou non au sein de la perte de substance ulnaire notamment aux jonctions proximale et distale, entre le SOAR et l'os natif ; mais aussi la résorption du matériau.

#### 2.3.1.2.7. Analyses microscanner

Au bout de 20 semaines d'implantation, les animaux ont été sacrifiés par surdosage de barbiturique. Les explants ont été prélevés avec précaution, 2 cm de part et d'autre du défaut, en préservant les interfaces proximale et distale avec l'os natif. Les acquisitions d'images 2D ont été réalisées d'abord en utilisant un dispositif Inveon (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, Tennessee). Les images scanner ou tomodensitométrie (TDM) 3D ont été acquises avec une source de rayons X réglée à la tension de 80 keV et un courant continu non alternatif de 500µA. Le temps d'exposition a été fixé à 320 ms avec une rotation continue de 200 projections (1.8° par pas). L'épaisseur des slices était de 110 µm et chaque acquisition a généré 512 images de 110 µm de taille de pixel. La reconstruction des images a été effectuée en utilisant un algorithme à filtre de rétroprojection du logiciel COBRA (Siemens).

D'autre part, pour l'analyse de la quantification osseuse et de la résorption des granules de BCP dans les échantillons, nous avons pu utiliser le tout dernier microscanner de la société Bruker, le Skyscan 1272 (Skyscan, Bruker, Belgique), qui a une chambre de 7cm sur 7, permettant d'analyser des échantillons volumineux. Il possède une source et une caméra dernière génération, 3 champs de caméras ainsi qu'une résolution minimale de 0.8 µm. Les temps d'acquisition sont certes augmentés, mais les images et résultats obtenus sont de très bonne qualité. Une source de tension 100 keV et de courant 91 µA a été utilisée. Pour

effectuer les mesures, les échantillons sont positionnés sur un plateau tournant et pouvant s'auto-régler dans le sens axial. Les images scannées ont été transformées à l'aide du logiciel NRecon (Skyscan, Bruker, Belgique), et les reconstitutions 2D ont permis une évaluation quantitative. La taille de pixel était de 19.4  $\mu\text{m}$ .

#### 2.3.1.2.8. Analyses MEB et microanalyse X (EDX)

Pour les observations au microscope électronique à balayage (MEB: Leo 1450VP, Zeiss, Allemagne), les surfaces des échantillons ont été polies et métallisées à l'orpalladium (Denton Vacuum Desk III, Moorestown, Etats-Unis), et les images enregistrées au grossissement x 50. L'acquisition d'images a été réalisée en utilisant le mode d'électrons rétrodiffusés (BSE : back-scattered electron). Une analyse micro-architecturale 2D a été réalisée et a concerné la quantité d'os néoformé et de granules de BCP résiduels par analyse d'images (Quantimètre 500, Leica, Cambridge, Grande Bretagne) sur des surfaces d'échantillons obtenues par mode BSE à partir d'observations MEB.

La microanalyse a été réalisée à l'aide de spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX : Energy Dispersive X spectroscopy) (Link Isis, Oxford Instruments, Grande Bretagne) ; celle-ci est couplée au microscope électronique à balayage avec une tension d'accélération à 100 kV. Le rapport calcium/phosphore (Ca/P) a été comparé dans l'os néoformé observé sur des échantillons traités ou non par BMP2 après explantation ; ainsi qu'avec le rapport Ca/P de l'os natif adjacent. Le ratio Ca/P est exprimé en moyenne  $\pm$  écart-type obtenue à partir de 30 mesures sur chaque échantillon.

#### 2.3.1.2.9. Analyses histologiques

L'analyse en microscopie optique a été réalisée sur des échantillons non décalcifiés, inclus en résine GMMA (glycol méthyle méthacrylate). Des séries de coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées parallèlement à l'axe longitudinal de chaque ulna de chien, à l'aide d'un microtome pour tissu dur (Reichert-Jung Supercut 2050, Autriche). Les lames ont été observées avec un microscope à lumière polarisée (Axioplan2, Zeiss, Allemagne) après coloration au pentachrome de Movat. Ces colorations spécifiques aux os sont particulièrement indiquées pour distinguer le tissu minéralisé respectivement en vert et jaune, l'ostéoïde en rouge et les granules de BCP en bleu.

Pour étudier les composantes cellulaires et tissulaires de façon plus spécifique, une coloration à l'hématoxyline-éosine (HES : hematoxylin-eosin staining) a également été réalisée.

Les évaluations radiographiques et histologiques ont été effectuées à l'aveugle.

#### 2.3.1.2.10. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées par la moyenne  $\pm$  écart-type, sauf. Une analyse de variance (ANOVA) avec comparaison de moyennes (PLSD Fischer) a été utilisée afin de comparer la néoformation osseuse et les granules de BCP résiduels en fonction de l'adjonction ou non de BMP2. Le niveau de significativité retenu était de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.1.3. Résultats

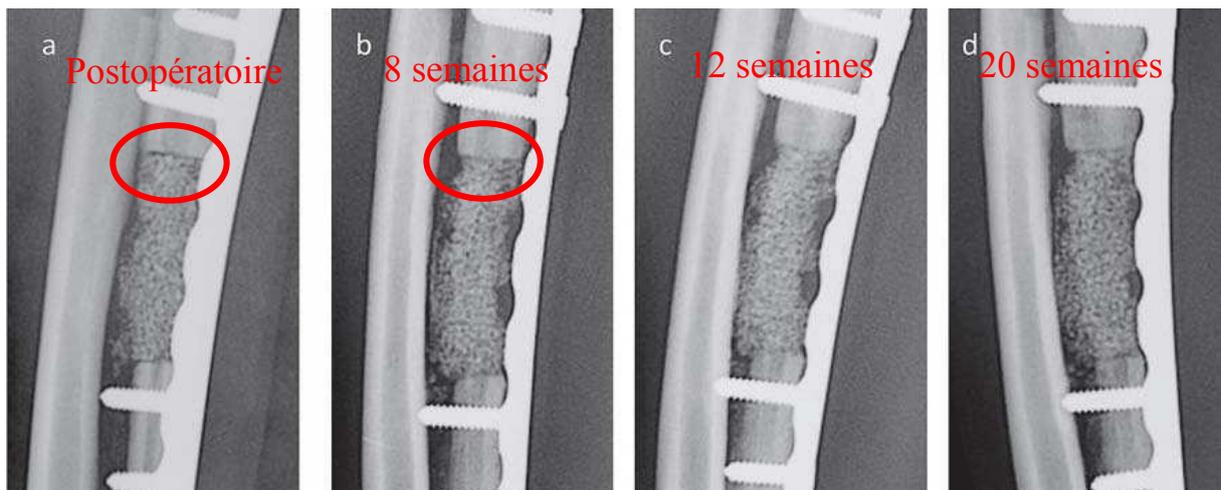
#### 2.3.1.3.1. Clinique

Les suites opératoires peuvent être qualifiées d'excellentes. En effet, aucune complication d'ordre douloureux, détresse, altération de l'état général n'a été notée. La notion d'œdème des tissus mous évoquée lors d'usage de BMP2 n'a été observée chez aucun animal. Le SOAR n'a engendré ni infection, ni irritation cutanée au site d'implantation. Le poids normal habituel des animaux a été recouvré au bout de 48 heures postopératoires.

#### 2.3.1.3.2. Radiographie

Des images radiographiques en 2D ont été réalisées à différents temps d'implantation pour l'évaluation qualitative du processus de régénération osseuse dans les défauts. Les résultats radiographiques montrent et confirment la localisation, la reproductibilité et la moulabilité correctes du SOAR dans les défauts segmentaires. D'autre part, les plaques et vis d'ostéosynthèse sont bien restées en place au site opératoire, sans signe de mobilité pathologique.

#### SOAR SANS BMP2



*Figure 1: Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien comblés avec SOAR sans BMP2: a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.*

Nous observons sur ces radios : le SOAR est bien en place dans les défauts ; l'absence de repousse osseuse visible à l'interface os/biomatériau (encerclé), ni au centre des défauts. Pas de fusion proximale hôte / SOAR (à 8 semaines) ; une densité des granules de BCP au sein des défauts.

Les SOAR seuls dépourvus de BMP2 ont montré une faible repousse osseuse à l'interface hôte / biomatériau. Une seule jonction proximale (1/5) a été notée, contre aucune jonction distale (0/5) à 8 semaines postopératoires.

En revanche, SOAR chargé en BMP2 présente une fusion proximale avec l'os natif dans les 5 cas (5/5) et une fusion distale dans 4 cas (4/5).

#### SOAR AVEC BMP2

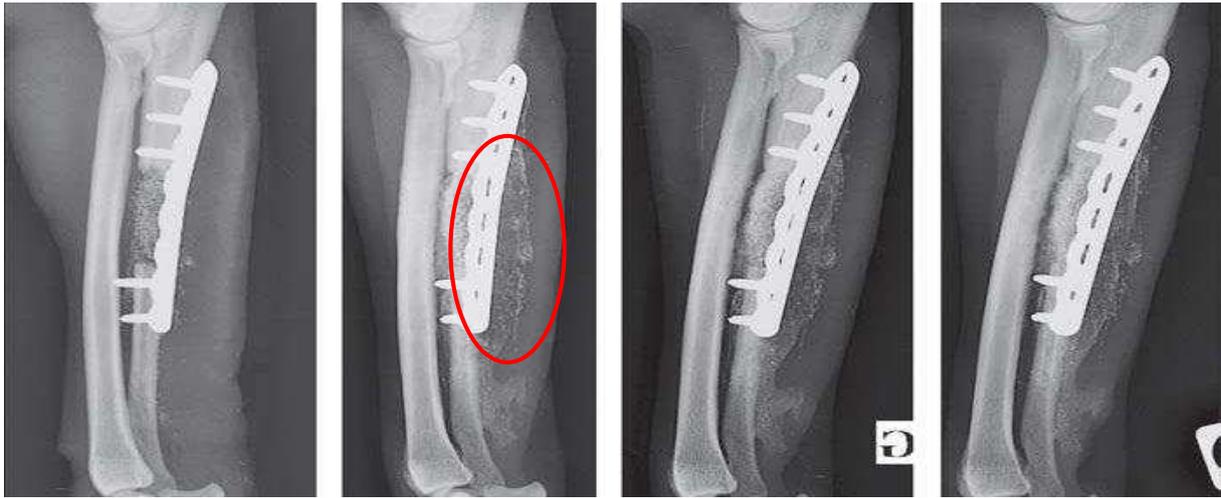


Figure 2: Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien implantés avec le mélange SOAR chargé en BMP2 (0,2 mg/mL): a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.

Nous observons sur ces clichés: de l'os néoformé à 8 semaines avec fusion proximale entre os natif / SOAR (encadré), ainsi qu'au centre des défauts; pas de modification majeure jusqu'à 20 semaines ; une impression de remaniement des granules de BCP à 8, 12 et 20 semaines.

La réparation osseuse paraît progressive avec les substituts supplémentés en BMP2, parallèlement à une réduction de la quantité de granules de BCP. Cependant, ni l'ostéointégration, ni la résorption des granules n'ont pu être évaluées avec précision sur les clichés radiographiques. Néanmoins, la radiodensité au sein du défaut a considérablement augmenté au cours des huit premières semaines postopératoires, avant de sembler quasi stationnaire de la 8<sup>ème</sup> à la 20<sup>ème</sup> semaine.

D'autre part, chez un animal, l'hydrogel chargé en BMP2 n'avait pas suffisamment réticulé au moment de l'implantation. Ce qui a occasionné une fusée du SOAR en dehors du défaut comme confirmé par la radiographie postopératoire figure (3). Malgré la réparation de la perte de substance observée à S8 et se traduisant par une néoformation osseuse, de l'os ectopique a été observé au sein des tissus mous entourant l'extrémité distale de l'ulna.



*Figure 3: Radiographie de profil de défauts d'ulna de chien comblés avec le mélange IBS2 + BMP2 (0,2 mg/mL) ; IBS2 : 40% BCP / 60% HPMC-Si [selon Trojani, 2006] sur le chien avec IBS2 non réticulé lors de l'implantation : a) postopératoire immédiat, b) 8 semaines, c) 12 semaines, d) 20 semaines après implantation.*

Nous observons sur ce cliché : l'IBS2 en place au sein du défaut juste après l'implantation ; à partir de 8 semaines, une néoformation osseuse dans les défauts et une ossification extensive ectopique péri-implantaire (encerclé) le long de l'ulna gauche.

#### 2.3.1.3.3. Explantation

Lors de l'explantation des échantillons, les résultats bruts constatés étaient en adéquation avec les observations radiographiques. Dans les défauts comblés avec SOAR chargé en BMP2, les systèmes d'ostéosynthèse étaient recouverts d'une importante quantité d'os lamellaire, dense. Les implants métalliques ont pu être déposés aisément. Lors du retrait des plaques d'ostéosynthèse, tous les défauts obturés avec le SOAR supplémenté avec de la BMP2 présentaient un comblement de la perte de substance avec de l'os ayant une consistance ferme et dur (identique à la greffe osseuse autologue). Ce qui confirmait les observations radiographiques montrant une jonction de SOAR + BMP2 avec l'os natif. A l'opposé, les défauts ulnaires traités avec SOAR seul étaient comblés par du tissu conjonctif fibreux ayant une consistance molle.

#### 2.3.1.3.4. Résultats micro CT

Les analyses  $\mu$ CT ont été réalisées post mortem sur les explants à 20 semaines.

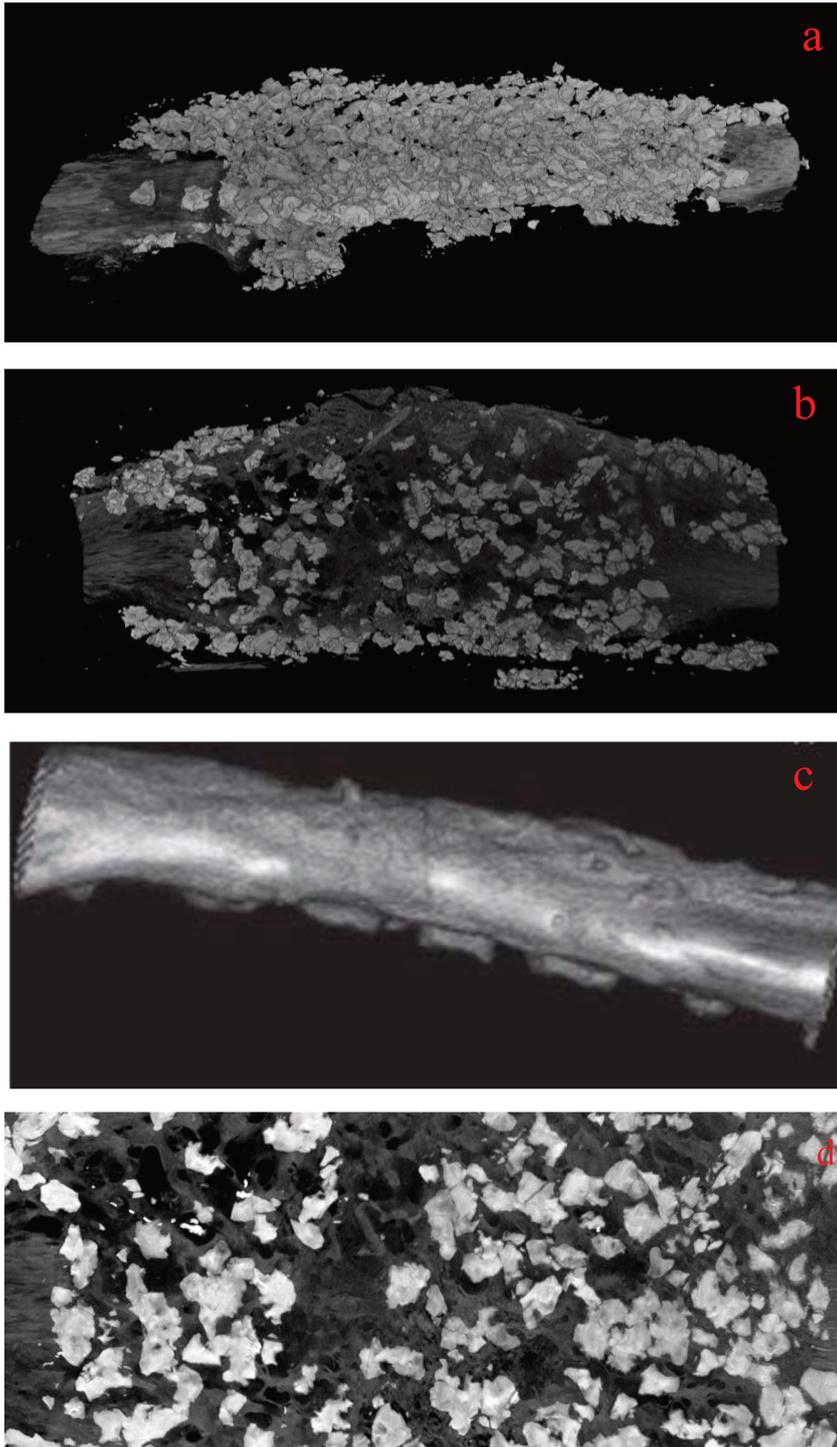


Figure 4: images  $\mu$ CT en 3D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-implantation. Acquisition d'images à 100 keV de tension et 91  $\mu$ A d'intensité, taille de pixel de 19.4  $\mu$ m. Les défauts ont été comblés avec : a) SOAR sans BMP2, b) SOAR avec BMP2, c) GOA (contrôle positif, sur une autre étude), d) SOAR avec BMP2.

Nous observons : a) SOAR sans BMP2 bien en place au site d'implantation, moulable, une densité de granules de BCP sans repousse osseuse ; b) SOAR avec BMP2 : moulable au site d'implantation ; néoformation osseuse dense au contact de l'hôte et des granules de BCP, comblement de toute la perte de substance, réduction importante de la quantité de BCP, remaniement en rapport avec la régénération osseuse ; c) cicatrisation osseuse complète du défaut ulnaire, comme avec le substitut composite SOAR + BMP2 ; d) répartition homogène et dense de l'os néoformé au contact de l'os natif et des granules de BCP.

Les images scanners montrent une densité des granules de BCP résiduels dans les défauts traités avec SOAR seul. La néoformation osseuse de faible quantité se distinguait de l'os natif, uniquement à l'interface hôte / biomatériau.

Le SOAR chargé en BMP2 a quant à lui induit une formation osseuse abondante et dense. Le volume de tissu minéralisé avait une densité de connectivité de type osseux lamellaire mature. La microarchitecture de l'os néoformé était similaire à celle induite par la greffe autologue ainsi qu'à l'os cortical natif (Fig. 4-d). Le volume osseux néoformé a entièrement comblé le défaut segmentaire au plan tridimensionnel. L'analyse qualitative des images  $\mu$ CT a montré également une répartition homogène de la néoformation osseuse dense et organisée aussi bien à l'interface os natif / SOAR + BMP2, qu'au contact direct avec les granules de BCP et dans les lacunes intergranulaires (Fig. 4-b). Cette intimité de contact constatée entre les granules de BCP et l'os néoformé, sans interférence, traduit l'ostéointégration du SOAR. Des phénomènes de biodégradation des céramiques phosphocalciques ont été observés plus dans le SOAR chargé en BMP2 que dans le substitut seul.

#### 2.3.1.3.5. Résultats MEB

Les analyses d'images 2D au MEB post-mortem confirment, et de façon plus précise, les observations faites à la radiographie et au microscanner.

SOAR SANS BMP2 :

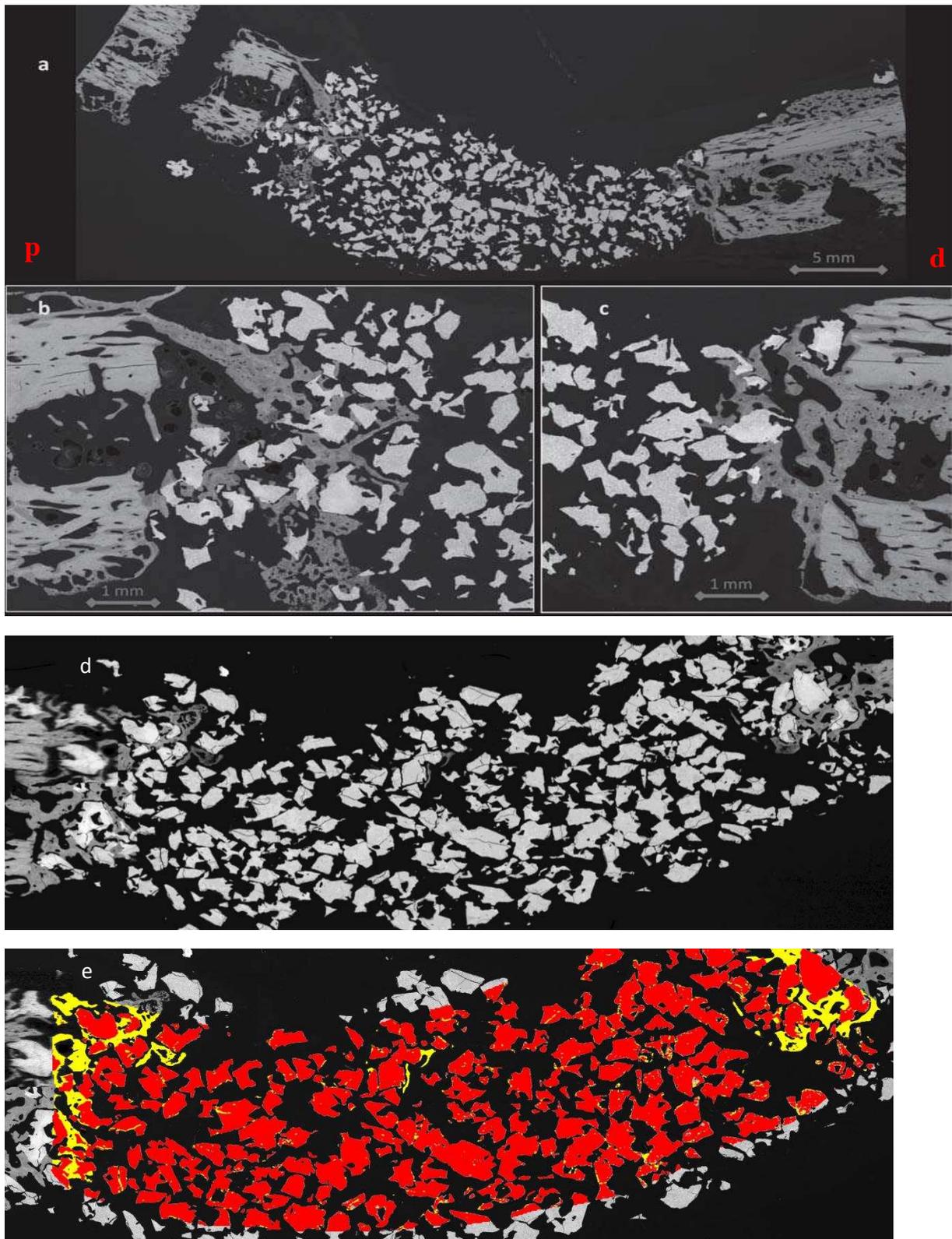


Figure 5: images MEB en 2D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-mortem sur échantillon métallisé Au-Pd de SOAR SANS BMP2. Acquisition d'images par mode d'électron rétrodiffusé à 15keV. Seuillage de gris des composants dans la région d'intérêt : a, b, c, d) os en gris, biomatériau en blanc,

*tissu mou en noir ; e) os en jaune, biomatériau en rouge, tissu environnant en noir. p) proximal, d) distal.*

Les observations suivantes sont faites : a) pas d'os néoformé au sein du défaut;

b) ostéoconduction avec néoformation osseuse à la jonction proximale; c) légère ostéoconduction distale ; d) importante quantité de granules de BCP résiduels ; e) phénomènes plus objectivables dans la région d'intérêt en couleur.

Les défauts ulnaires droits comblés avec le SOAR seul ont présenté une seule fusion proximale à leur interface avec l'hôte (1chien/5) et trois fusions distales (3 chiens/5) cette fois-ci. Au centre du défaut, aucune néoformation osseuse n'est notée ; il persiste une quantité importante de granules de BCP denses. A l'interface avec l'os natif, une faible interaction avec le périoste est observée.

SOAR AVEC BMP2 :

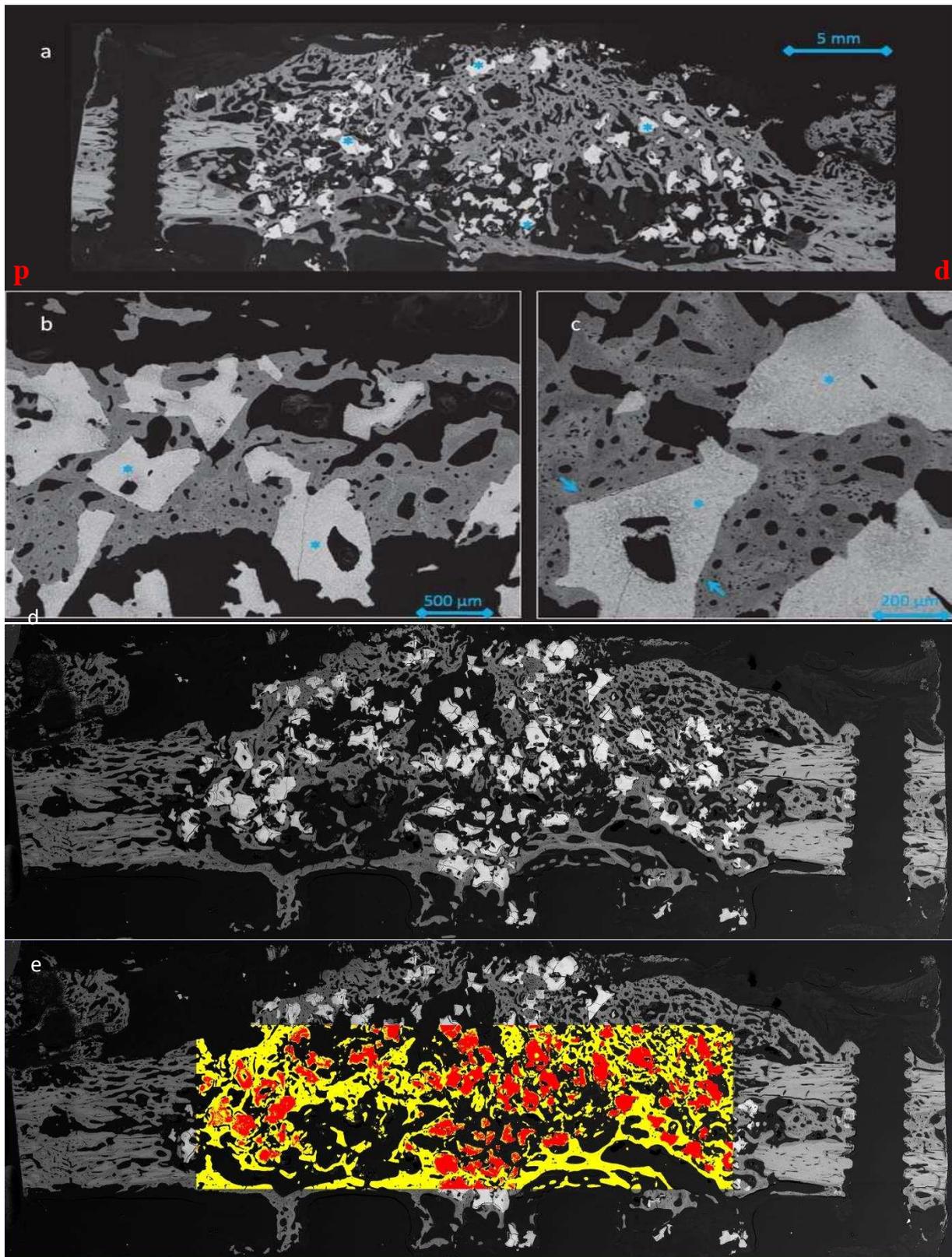


Figure 6: images MEB en 2D de défauts d'ulna de chien à 20 semaines post-mortem sur échantillon métallisé Au-Pd de SOAR AVEC BMP2. Acquisition d'images par mode d'électron rétrodiffusé à 15keV. Seuillage de gris des

composants dans la région d'intérêt : a, b, c, d) os en gris, biomatériau en blanc, tissu mou en noir ; e) os en jaune, biomatériau en rouge, tissu mou en noir. **p)** proximal, **d)** distal.

Nous observons sur ces images : a) néoformation osseuse dense et importante; b) os néoformé au contact direct de l'hôte et des BCP; c) os haversien avec des lacunes ostéocytaires ; d) comblement total du défaut segmentaire avec de l'os lamellaire, bonne ostéointégration du SOAR ; e) néoformation osseuse dense, réduction importante de la quantité de granules de BCP dans le defect, plus objectivable dans la zone d'intérêt.

Le SOAR chargé avec 0,2 mg/mL de BMP2 révèle une cicatrisation complète des défauts par une abondante formation de repousse osseuse d'aspect lamellaire et une résorption considérable des granules de BCP (Fig. 6-a). L'os néoformé s'est développé aussi bien aux jonctions proximale et distale, qu'au contact des céramiques phosphocalciques et des lacunes intergranulaires (Fig. 6-a, d, e). Sa configuration révèle une structure haversienne avec un réseau de lacunes ostéocytaires (Fig. 6-b, c).

Au plan quantitatif, la détermination d'une région d'intérêt de 2 cm, correspondant à la distance longitudinale du défaut segmentaire a permis l'évaluation de la repousse osseuse et des céramiques phosphocalciques résiduelles.

Tableau IV: quantification de la surface occupée par les différents composants au MEB (mm<sup>2</sup>) selon le substitut osseux utilisé

SOAR SANS BMP2	Os néoformé (mm <sup>2</sup> )	Biomatériau résiduel (mm <sup>2</sup> )	Tissu mou (mm <sup>2</sup> )	Surface totale (mm <sup>2</sup> )
Moyenne	6,4494	39,4014	74,6798	120,5304
Ecart-type	1,96702219	3,80498716	3,09189605	1,53541649
SOAR AVEC BMP2	Os néoformé (mm <sup>2</sup> )	Biomatériau résiduel (mm <sup>2</sup> )	Tissu mou (mm <sup>2</sup> )	Surface totale (mm <sup>2</sup> )
Moyenne	42,5326	12,7994	64,5094	119,838
Ecart-type	4,1396	4,951	7,5368	0,0279

Valeurs indiquant le caractère inconstant du remaniement dans le défaut.

Tableau V: synthèse de la quantification des tissus dans les défauts ulnaires selon SOAR +/- BMP2

Pourcentage (%)	SOAR SANS BMP2			SOAR + BMP2		
	Os néoformé	Biomatériau	Tissu mou	Os néoformé	Biomatériau	Tissu mou
Moyenne ± écart-type	6.45 ±1.97	39.4 ± 3.8	74.68 ±3.09	42.53 ±4.14	12.8 ± 4.95	64.51 ±7.54

Les analyses quantitatives montrent la potentialité de la BMP à induire une néoformation osseuse, mais aussi une activité de résorption des granules de BCP dans le SOAR. La résorption des particules de BCP résiduels est plus importante avec les SOAR supplémentés en BMP par rapport à SOAR sans BMP. Ces interactions entre la BMP et les biomatériaux sont confirmées par les tests statistiques qui montrent qu'il y a un effet significatif du facteur de croissance.

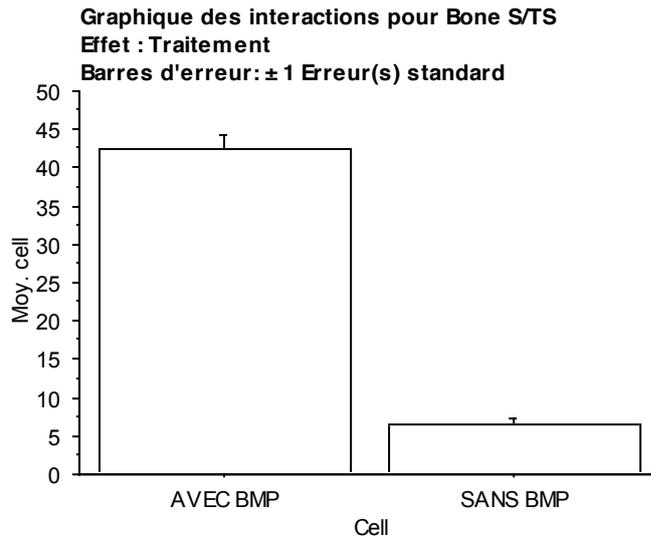
Pour la repousse osseuse, la valeur de  $p < 0.0001$  ; il en est de même pour les granules de BCP résiduels dans les défauts.

Tableau VI: test statistique de la BMP sur la repousse osseuse

Tableau ANOVA pour Bone S/TS

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Traitement	1	3255,13764	3255,13764	310,09226	<,0001	310,09226	1
Résidu	8	83,97856	10,49732				

Test significatif avec  $p < 0,0001$ .



*Figure 7: effet de la BMP sur le potentiel du SOAR à induire la néoformation osseuse.*

La différence est significative.

L'interaction de la BMP sur la résorption du SOAR et la quantité de BCP résiduelle est également significative.

Tableau VII: test statistique de l'action de la BMP sur le biomatériau

**Tableau ANOVA pour Biomat S/TS**

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Traitement	1	1769,43204	1769,43204	90,82737	<,0001	90,82737	1
Résidu	8	155,85012	19,48126				

Test significatif avec  $p < 0,0001$ .

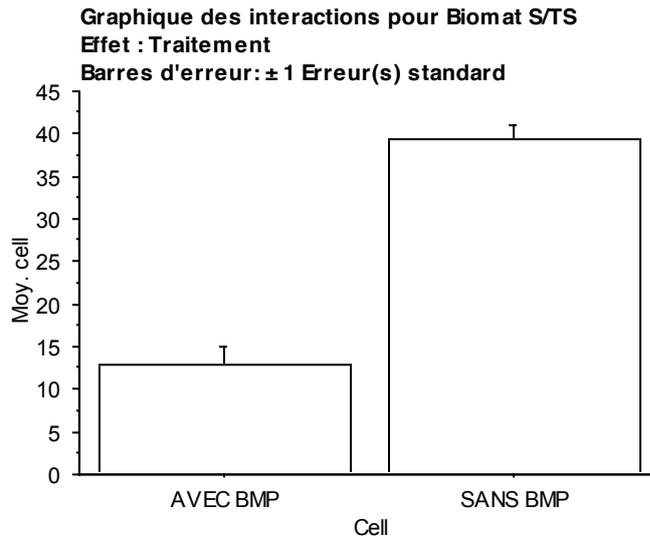


Figure 8: effet de la BMP sur la résorption des granules de BCP dans les défauts ulnaires.

La différence est significative.

La structure d'os lamellaire mature observée sur les scanners et images MEB a été confirmée par la microanalyse X par énergie dispersive. Le SOAR chargé en BMP2 a montré des spectres quasi identiques à l'os mature, minéralisé, avec cependant un ratio calcium / phosphore (Ca/P) inférieur à celui de la néoformation osseuse induite par le SOAR sans BMP2 et par l'os natif.

Tableau VIII: rapport Ca/P comparatif entre os néoformé et os natif

	Os néoformé par <b>SOAR sans BMP</b>	Os néoformé par <b>SOAR + BMP</b>	<b>Os natif</b>
Calcium Ca	15.87 ( $\pm 2.33$ )	20.03 ( $\pm 1.88$ )	32.77 ( $\pm .016$ )
Phosphore P	8.55 ( $\pm 0.88$ )	12.98 ( $\pm 0.77$ )	15.92 ( $\pm .16$ )
Rapport Ca/P	<b>1.86</b>	<b>1.54</b>	<b>2.06</b>

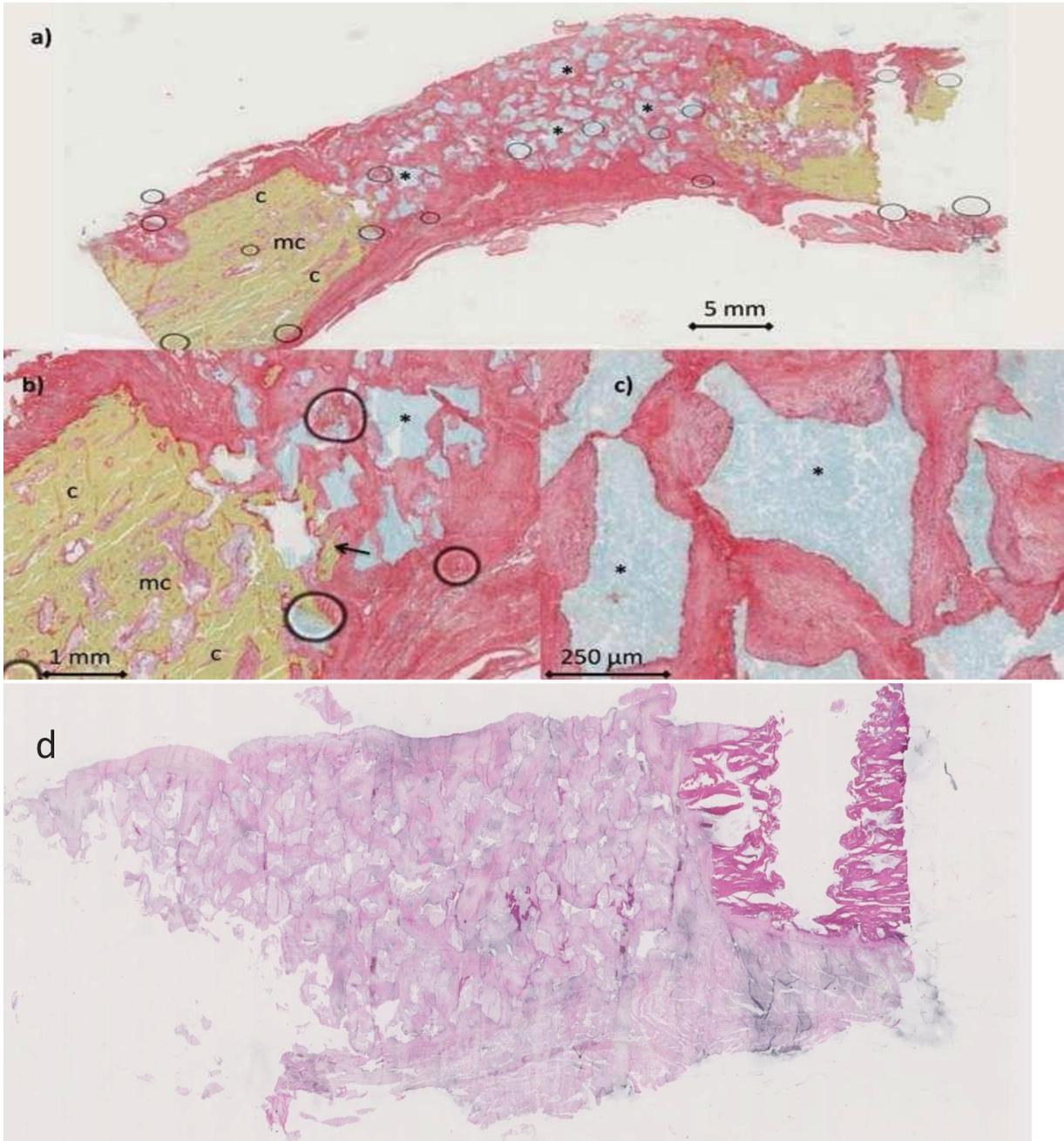
La néoformation osseuse induite par la BMP2 présente un taux de calcium et de phosphore (comme l'os natif) supérieur à celle de SOAR sans BMP2. Cependant, le ratio Ca/P de SOAR dépourvu de BMP (1.86) est supérieur à celui de SOAR avec BMP2 (1.54).

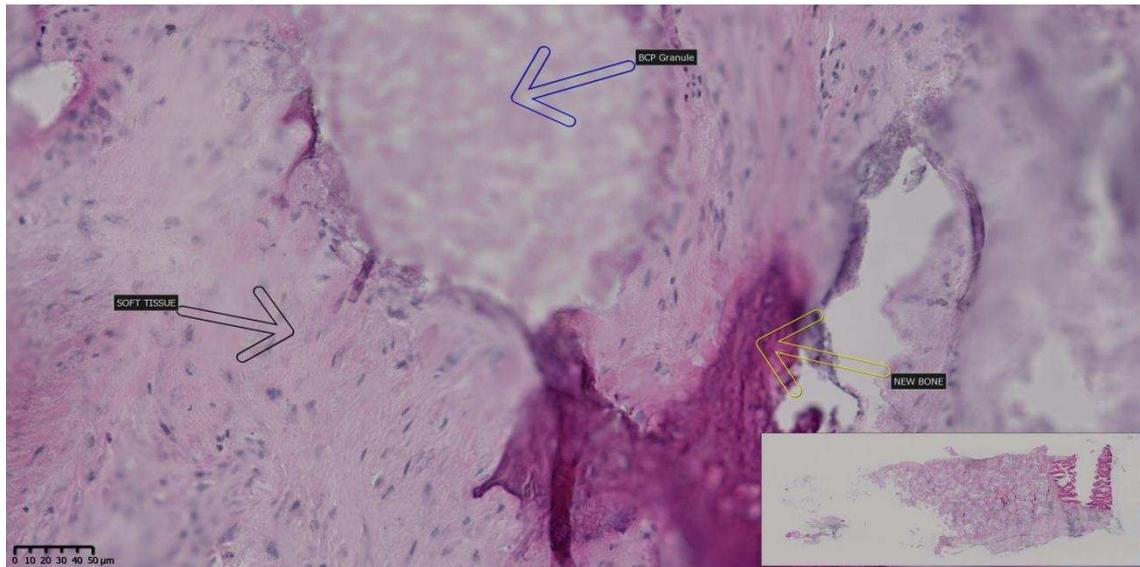
Après les analyses radiographiques, microscanner et MEB, nous abordons l'étude histologique.

### 2.3.1.3.6. Résultats histologiques

Les coupes histologiques présentées ici ont été colorées au pentachrome de Movat et à l'éosine hématoxyline (HES : hematoxylin-eosine staining).

SOAR sans BMP :

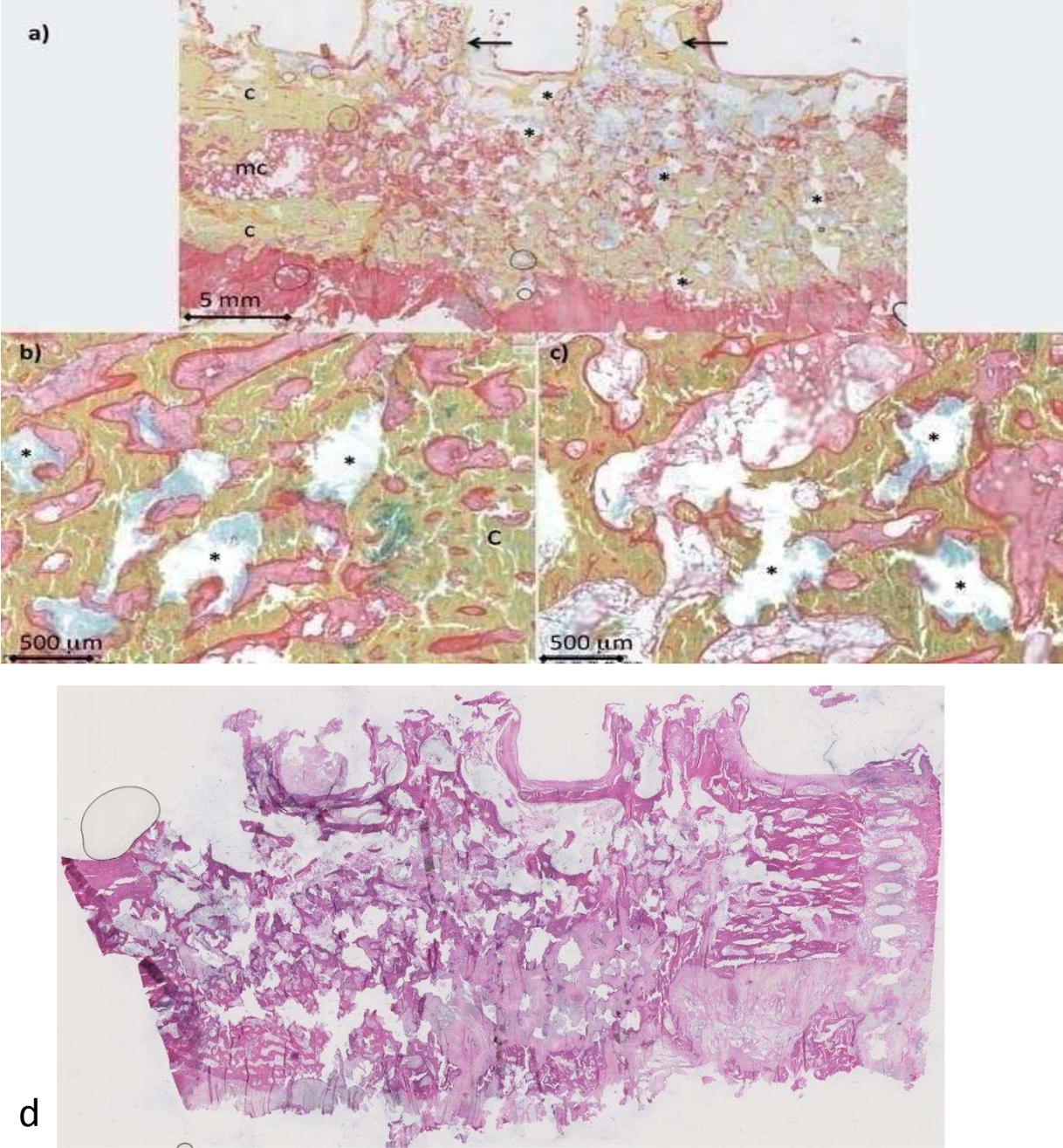


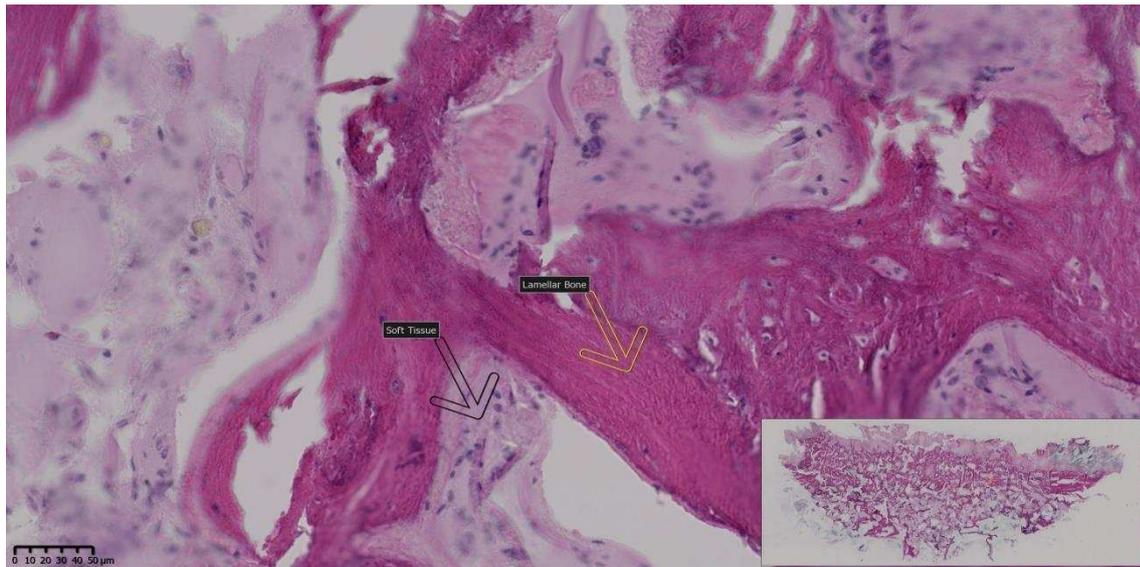


*Figure 9: coloration de MOVAT et HES à 20 semaines sur des échantillons comblés avec SOAR sans BMP2. MOVAT : a, b, c) os en jaune/vert ; BCP (\*) en bleu ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical; HES : d) grossissement X 200 : BCP en gris, collagène en rose pâle.*

Les observations en microscopie optique confirment les résultats obtenus aussi au MEB qu'au  $\mu$ CT. Aucune repousse osseuse n'est observée au sein des défauts comblés par le SOAR seul. Les granules de BCP sont entourés de tissu de granulation fait de conjonctif riche en fibroblastes.

SOAR AVEC BMP2 :

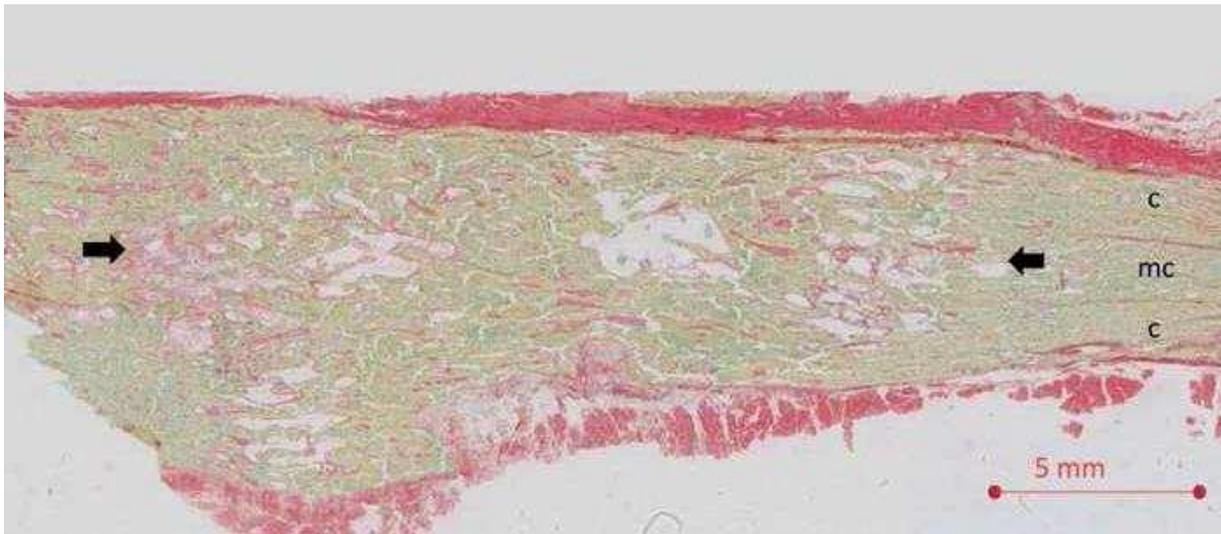




*Figure 10: coloration de MOVAT et HES à 20 semaines sur des échantillons comblés avec SOAR avec BMP2. MOVAT : a, b, c) os en jaune/vert ; BCP (\*) en bleu/blanc ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical; HES : d) grossissement X 200 : os et tissu ostéoïde en rose foncé/mauve, BCP en gris, tissu mou en rose pâle.*

Les défauts traités par SOAR + BMP2 ont été entièrement comblés avec de l'os lamellaire, mature, dense présentant de nombreux ostéocytes. Des ostéoblastes formaient une bordure en palissade à la surface des travées osseuses. Les travées d'os néoformé étaient abondantes, et s'étaient organisées au contact de la corticale, du périoste de l'espace médullaire ainsi qu'au contact et dans l'environnement contigus aux céramiques phosphocalciques. Ces travées étaient séparées par du tissu ostéoïde riche et abondant. D'autre part, au fort grossissement, de nombreux vaisseaux néoformés étaient visibles. Cette organisation osseuse mature, interconnectée était similaire à celle induite par les greffes autologues chez les contrôles positifs. Les phénomènes de dégradation des granules de BCP des SOAR, constatés au  $\mu$ CT et au MEB, devaient être en rapport avec les cellules multinucléées observées en microscopie optique.

GOA :



*Figure 11: coloration de MOVAT à 20 semaines sur des échantillons de contrôle GOA. Os en jaune/vert ; tissu mou et ostéoïde en rouge, mc = cavité médullaire ; c = os cortical.*

La lame montre une repousse osseuse complète du défaut de la jonction proximale à la distale, une restauration de l'os cortical (c) et de la cavité médullaire (mc)

#### 2.3.1.4. Discussion

Cette étude consistait à évaluer le potentiel d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR), associé à la rhBMP2, à contribuer à la régénération de perte de substance osseuse de taille critique. De façon plus pratique, ce travail a étudié le potentiel de la combinaison de l'hydrogel d'HPMC-Si auto-réticulant à des granules de BCP, à délivrer localement en site implantaire, la BMP2 afin de régénérer un défaut osseux segmentaire d'ulna de chien. L'intérêt d'un tel procédé d'ingénierie tissulaire réside dans son efficacité, sa sécurité et sa simplicité en vue d'un transfert en clinique humaine pour la reconstitution des pertes de substance osseuses crânio-maxillo-faciales mais aussi orthopédiques et traumatologiques. Il pourrait constituer une alternative à la greffe osseuse autologue en évitant un second temps opératoire, une chirurgie invasive, un prélèvement de greffon plus ou moins mutilant, une morbidité du site donneur.

Le SOAR seul, dépourvu de facteur bioactif, a montré des propriétés ostéoconductrices à l'interface os natif / biomatériau, avec une fusion proximale et distale dans 2 cas sur 5. Ce substitut osseux à lui seul est insuffisant à réparer une perte de substance de taille critique dans la mesure où aucune repousse osseuse induite n'a été notée au centre du défaut ; c'est le cas avec la plupart des matrices utilisées seules (notamment la matrice osseuse déminéralisée, le corail, l'hydroxyapatite, le  $\beta$ -TCP, les hydrogels, la fibrine, la gélatine, les polymères naturels, les matériaux composites etc...) [40, 41, 42].

Le SOAR chargé en BMP2 a induit une néoformation osseuse abondante, entraînant une cicatrisation complète des défauts ulnaires. Le tissu osseux nouvellement formé au sein du site d'implantation était lamellaire, dense, interconnecté, minéralisé et bien différencié, en contact intime avec les céramiques phosphocalciques comme observé à la fois au MEB, au  $\mu$ CT et sur les coupes histologiques. Ces observations qualitatives étaient similaires à la structure ostéoinduite générée par la greffe autologue (utilisée comme contrôle positif lors d'une autre expérience animale), traduisant ainsi l'ostéointégration du biomatériau au sein du défaut. Quant aux analyses quantitatives, elles ont montré de façon significative ( $p < 0.0001$ ), le potentiel de la BMP2 à induire une néoformation osseuse, mais également son influence sur l'importante résorption des granules phosphocalciques dans le mélange HPMC-Si / BCP. Le facteur de croissance permettrait une synergie de l'ensemble du processus de résorption-substitution osseuse avec un relargage local de BMP au site d'implantation.

L'analyse du rapport Ca/P de l'os néoformé (SOAR sans BMP : 1.86 et SOAR + BMP : 1.54) milite en faveur d'un processus de remodelage et de maturation en cours avec la repousse osseuse induite par la BMP2. Malgré un taux de calcium (20.03) et de phosphore (12.98) supérieur avec la BMP par rapport à SOAR sans BMP, le ratio Ca/P est plus faible avec la condition SOAR + BMP par rapport à

SOAR sans BMP et à l'os natif. La BMP stimulerait-elle la formation osseuse, mais celle d'un os qui poursuit son processus de minéralisation même 4 mois après implantation ? La matrice extracellulaire (MEC) osseuse, du fait de sa composition (cristaux d'hydroxyapatite, fibres de collagène, protéines...) est organisée en os tissé ou immature et en os lamellaire [43]. Pendant le processus de remodelage, l'os tissé est remplacé par l'os lamellaire mieux organisé, de façon concentrique en système haversien [44]. Boerckel JD, et al. (2012) ont montré que la néoformation osseuse induite par la BMP2 avait des propriétés mécaniques substantiellement inférieures à celles de l'os natif ; cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative. Leur étude portait la régénération de défauts segmentaires de fémur de rats implantés avec des mèches de nanofibres d'alginate contenant 5 µg de rhBMP2, au bout de 12 semaines de délai [45].

La stratégie de régénération d'un défaut osseux peut être tributaire de la capacité de libération contrôlée d'agents bioactifs appropriés, incorporés dans un support matriciel biodégradable. Selon Giannoudis et al. 2007 [46], une bonne ostéo-régénération nécessite des cellules ostéogéniques, des facteurs de croissance ostéoinducteurs associés à un support ou système de relargage approprié, et une stabilité mécanique au niveau du défaut, résumé sous l'appellation de « Concept du Diamant ». L'idéal serait que la dégradation de la matrice soit inversement proportionnelle à la formation du nouveau tissu [48]. Le biomatériau doit permettre un relargage progressif, à une concentration appropriée et pendant un temps suffisamment long, des morphogènes encapsulés au niveau du site lésionnel afin de favoriser le recrutement in situ de progéniteurs et la stimulation des processus cicatriciels des tissus ou organes concernés [43, 60]. Le relargage progressif de BMP2 est donc important dans le processus de réparation osseuse. Il est suggéré et admis que l'efficacité clinique des formes recombinantes humaines (rh) de BMP dépendra du support matriciel choisi pour assurer une libération efficace à des concentrations adéquates de la protéine au site d'implantation [41, 47]. Plusieurs matériaux ont été développés pour la libération de BMP2 [42, 49]. De nombreuses études montrent que le collagène, bénéficiant de l'approbation de la FDA comme support en pratique clinique, présente une faible liaison avec la BMP2, malgré leur affinité [41, 42]. Des éponges de collagène adsorbables, approuvées par la FDA ont été utilisées comme support de rhBMP2 ; mais la libération flash des protéines (de l'ordre de 80 % dans les premiers jours) n'a pas été bénéfique pour la cicatrisation osseuse [42]. De plus, grâce à l'utilisation de la technologie de l'ADN recombinante, la BMP2 a été homologuée pour l'usage clinique depuis 2002 [251]. Selon Geiger et al. (2003) [118], le relargage rapide de la BMP2 des éponges de collagène serait dû à leur différence isoélectrique, entraînant leur faible liaison. Le collagène aurait un point isoélectrique à pH neutre à acide ; et la rhBMP2 a le sien à pH 9 [118, 252]. La

liaison rhBMP2-éponge de collagène serait négligeable à pH 3-4, et augmenterait à 0.1 - 0.2 ng rhBMP2 / ng collagène à pH 5.2 – 6.5 [118, 253].

La libération rapide d'agents bioactifs des supports collagéniques explique l'usage de doses supra-physiologiques, ou l'administration renouvelée de facteurs de croissance. La dose moyenne recommandée chez l'homme est de 1.5 mg/mL (sans dépasser par exemple 12 mg pour une fusion antérieure des corps vertébraux, ou 20 mg de chaque côté pour une arthrodèse vertébrale) [50]. Les effets tissulaires résultants sont quelquefois spectaculaires cliniquement. Il a été signalé des complications à type d'œdème des tissus mous environnants, d'érythème, d'inflammation locale, d'ossification ectopique voire hétérotopique, d'infection in situ, de réaction immunitaire, quoique rarement signalés [42, 205, 206, 254].

Des procédés d'amélioration de la liaison collagène-rhBMP2 ont été décrits ; il s'agit entre autres d'une combinaison de collagène de type I et de rhBMP2 avec un complexe d'héparine et/ou de chitosan dans une formulation de gel, pour une implantation dans un modèle murin [42, 255]. Des BMP modifiées chimiquement avec une affinité améliorée pour leur support matriciel, montrant une stabilité, une solubilité, une liaison de surface, une bioactivité et une biospécificité altérées, ont été rapportées [256].

Plusieurs catégories de matériaux supports ont été développées pour le relargage de morphogènes. Il s'agit principalement de polymères d'origine naturelle (hyaluronates, hydroxyalcanoates, les dérivés du soja et des algues) ; les matériaux inorganiques tels que les céramiques et les ciments (hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP, bioverres), les métaux ; les polymères synthétiques biodégradables et leurs copolymères ; ainsi que les matériaux composites (combinaisons tirant partie de chaque catégorie de matériaux) [51, 251]. Les biomatériaux composites se développent de plus en plus ; en effet, ils potentialisent les avantages de leurs composants tout en limitant leurs inconvénients mutuels. Par exemple, l'hydroxyapatite est un bon ostéoconducteur du fait de sa structure proche de celle de l'os (HA : ratio Ca/P = 1.67, contre 1.71 pour l'os) ; cependant, sa résorption est très lente du fait de la cristallographie de son substrat. Ainsi, il est souvent couplé au  $\beta$ -TCP afin d'améliorer sa résorbabilité. Du fait de son manque de résorbabilité, l'HA a souvent été combiné avec des  $\beta$ -TCP, du collagène, d'autres polymères naturels ou synthétiques pour former un support de BMP plus rigide, résorbable et poreux. LIU et al. (2013) ont développé un substitut osseux injectable biomimétique constitué de nanohydroxyapatite et de collagène [52]. Avec les polymères synthétiques biodégradables (polylactique acide : PLA, poly glycolique acide : PGLA), le relargage de BMP se fait par gonflement du polymère suivi d'une libération contrôlée par diffusion rapide et d'une érosion du polymère [255]. Dans l'étude de Zellin et Linde, 1997, des billes de PLA/PLGA

résorbables utilisées pour l'administration de rhBMP2 dans des défauts transosseux mandibulaires de rat s'étaient avérées supérieures au collagène [257]. Le PLGA a également été testé avec succès dans plusieurs défauts de modèles canins notamment pour la régénération parodontale induite par la BMP2, la réparation de fente alvéolo-palatine et des défauts segmentaires ulnaires [256, 258, 259, 260]. Néanmoins, leur principale limite représente leurs produits de dégradation acides et le risque de réaction inflammatoire associé s'ils ne sont pas éliminés rapidement. Ce qui nuit à la stabilité des facteurs de croissance encapsulés et au résultat thérapeutique global [261]. Selon Schliephake et al. (2008), un apport continu de protéines ostéoinductrices serait indispensable pour compenser la dégradation du polymère [262].

Dans notre étude, les deux matrices inorganique (granules de BCP) et organominérale (hydrogel d'HPMC-Si) se sont révélées être des biomatériaux sûrs, biocompatibles, avec des propriétés rhéologiques et biologiques favorables, comme décrit dans des travaux antérieurs [53, 54]. Le biomatériau composite SOAR (HPMC-Si / BCP) chargé en BMP2 a entraîné la cicatrisation complète des défauts d'ulna au bout de huit semaines post-implantation. Les protéines ostéogéniques encapsulées dans le polymère ont été libérées progressivement des mailles tridimensionnelles de l'hydrogel auto-réticulant. La suspension des granules de BCP dans l'HPMC-Si a produit un substitut osseux moulable, facilement manipulable, stable et ostéointégré au site lésionnel ; les particules phosphocalciques servant de support ostéoconducteur. Cependant, dans un des cas (1/5 de SOAR + BMP2) l'hydrogel d'HPMC-Si n'avait pas suffisamment réticulé au moment de son implantation. Cela a entraîné une fusée du mélange de granules de BCP et d'HPMC-Si dans les tissus mous sertissant l'extrémité distale du défaut, et une formation osseuse ectopique. Cette ossification hétérotopique le long de l'extrémité distale diaphysaire de l'ulna, souligne que le relargage in situ contrôlé de BMP2 représente le point critique de ce processus. Ceci montre que notre matériau composite possède cette faculté. D'ailleurs, un tel substitut composite auto-réticulant a déjà montré des propriétés potentielles d'ostéointégration dans des applications parodontales [54]. Concernant le retard de réticulation, il s'agissait du premier implant de SOAR réalisé dans notre étude, selon un rapport 40/60 en poids par volume de BCP dans l'HPMC-Si (40/60 w/v BCP/HPMC-Si). Ce rapport était la proportion indiquée dans une étude antérieure (Trojani et al. 2006 [243]) pour former un substitut osseux injectable auto-réticulant. Celui-ci était associé à des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse murine, en vue d'évaluer leur potentiel ostéogénique après implantation en site ectopique sous cutanée dorso-lombaire. Ce retard de réticulation en peropératoire, au moment de la suture des plans musculo-cutanés, nous a conduit à ajuster la composition du SOAR selon le rapport 50/50 (w/v) de

BCP/HPMC-Si pour la suite de l'étude. La suspension des granules phosphocalciques dans l'hydrogel d'HPMC-Si réticulé assure une cohésion intergranulaire et améliore la stabilité du SOAR au sein des défauts lésionnels. L'encapsulation des facteurs de croissance dans l'HPMC-Si et leur relargage progressif constitue un atout notoire dans le contrôle des doses de morphogènes administrées. Dans notre étude, la dose de 0.2 mg/mL de rhBMP2, correspondant aux recommandations du fabricant, a été respectée. La Dibotermine alpha du kit TruScient de Pfizer contient 0.2 mg/mL de rhBMP2, représentant une dose physiologique chez le chien, approuvée par les vétérinaires [39]. Elle est 7 fois plus petite que la même dose moyenne chez l'homme (1.5 mg/mL). De plus, une seule administration par le SOAR a suffi à recruter des ostéoprogéniteurs au niveau du site défectueux ulnaire et à favoriser la cicatrisation osseuse. Ce qui constitue un intérêt par rapport aux matrices collagéniques où la libération flash du morphogène nécessite l'application des concentrations supra-physiologiques ou des administrations répétées et des doses coûteuses pour une cicatrisation osseuse satisfaisante [42, 254]. Ces problèmes peuvent être minorés voire maîtrisés à l'aide des biomatériaux composites. Des études in vivo réalisées avec des substituts osseux composites chargés en BMP2 ont montré que l'implant possédait des propriétés ostéoinductrices, le facteur de croissance avait conservé sa bioactivité et une régénération des défauts osseux majorée par rapport aux éponges de collagène adsorbables avec ou sans rhBMP2 après 8 semaines [55]. Grâce à la technique de l'électrospinning, Nie et al. [263] ont fabriqué un substitut osseux composite constitué de fibres polymères de PLGA et de nanoparticules d'hydroxyapatite et ont étudié les caractéristiques biologiques et physiques. Ils ont affirmé que la rhBMP2 encapsulée dans cette matrice conservait son intégrité et sa conformation structurale in vitro. De plus, la nanohydroxyapatite, du fait de son hydrophilie, isole la BMP2 du contact avec le solvant organique pendant le processus d'électrospinning. La protéine protégée de la dénaturation par le solvant organique, conserve son intégrité. Différents types de biomatériaux composites permettant d'y inclure les facteurs de croissance par encapsulation, par adsorption sont en cours d'évaluation.

Des efforts supplémentaires seront nécessaires et des challenges relevés afin d'optimiser la rétention et la cinétique de relargage des facteurs de croissance afin de produire des substituts osseux appropriés pouvant être utilisés efficacement et de façon sécurisée dans de futures applications cliniques. Le SOAR chargé en BMP2 a induit une néoformation osseuse dense, mature, lamellaire comparable à celle de l'autogreffe. Cependant, des investigations sont encore nécessaires afin d'évaluer le profil et la cinétique de libération de la BMP2 à partir du mélange BCP / HPMC-Si ainsi que la résorption (complète ou non des granules de BCP) au-delà de 20 semaines, la dose minimale efficace de BMP2, les propriétés

biomécaniques de l'os néoformé. Le substitut osseux idéal doit avoir des potentiels ostéogéniques, ostéoinducteurs, ostéoconducteurs similaires au greffon autologue, mais aussi être biocompatible et biodégradable et sans effets secondaires.

#### 2.3.1.5. Conclusion

Les stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse impliquant des facteurs de croissance ont démontré un important potentiel à induire diverses fonctions cellulaires indispensables à la régénération osseuse. La présente étude expérimentale a montré que la combinaison de protéine ostéoinductrice (rhBMP2) avec un substitut osseux auto-réticulant (composé d'un mixte de céramiques phosphocalciques et d'hydrogel d'HPMC-Si) pouvait régénérer un défaut osseux de taille critique. Un tel substitut osseux enrichi en agent bioactif pourrait être une alternative prometteuse à la greffe osseuse autologue et à l'allogreffe dans la prise en charge de grandes pertes de substance osseuses. Les matrices composites représentent d'excellents candidats en raison de la combinaison de deux ou plusieurs matériaux, améliorant leur stabilité, leur facilité de manipulation, leur porosité, leur biocompatibilité, leur résorption et surtout leur ostéoconductivité. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux maîtriser les propriétés intrinsèques des SOAR.

ARTICLE 1 :

**BMP2 delivered from a self-crosslinkable CaP/hydrogel construct promotes bone regeneration in a critical-size segmental defect model of non-union in dogs**

Minier K<sup>1,3</sup>, **Touré A**<sup>2</sup>, Fusellier M<sup>1,2</sup>, Fellah B<sup>1</sup>, Bouvy B<sup>3</sup>, Weiss P<sup>2</sup>, Gauthier O<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Small Animal Surgery, Oniris College of Veterinary Medicine, Nantes, France

<sup>2</sup> University of Nantes, INSERM, UMR 791, LIOAD, Nantes, France

<sup>3</sup> Centre Hospitalier Veterinaire Fregis, Arcueil, France

*Vet Comp Orthop Traumatol 2014; 27: 411-421*

ARTICLE 2 : soumis

**BMP2 delivered from a CaP/hydrogel construct enhances bone regeneration and calcium phosphate biomaterial resorption in a dog segmental bone defect.**

**Touré A**<sup>1,4</sup>, Veziers J<sup>1</sup>, Sourice S<sup>1</sup>, Minier K<sup>3</sup>, Fellah B<sup>3</sup>, Geoffroy V<sup>1</sup>, Giumelli B<sup>1,2</sup>, Gauthier O<sup>1,3\*</sup>, Weiss P<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> University of Nantes, INSERM, Oniris, UMR 1229 RMeS, Nantes, France

<sup>2</sup> Nantes University Hospital, OTONN, Nantes, France

<sup>3</sup> Center for Preclinical Research and Investigation, Oniris College of Veterinary Medicine Food, Science and Engineering, Nantes, France

<sup>4</sup> Department of Odontology, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, University Cheikh Anta DIOP, Dakar, Senegal

*Soumis : Journal of Orthopaedic Research : ID JOR – 18 - 0721*

### **2.3.2. Evaluation de l'ostéoinduction de SOAR+BMP in vivo en site calvaria chez le rat**

Dans cette étude expérimentale, nous allons évaluer l'efficacité d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR) combinant des hydrogels à base de chitosan silanisé (CHI-Si) et d'HPMC-Si, associé à la BMP2, à induire la formation osseuse dans un défaut de calvaria de taille critique.

L'hypothèse est que l'utilisation du complexe CHI-Si + HPMC-Si associé à un relargage progressif de BMP2 améliorera la dégradabilité du matériau et la repousse osseuse. De plus, dans d'autres travaux, nous avons observé une adhésion cellulaire en 3D sur des zones riches en chitosan.

#### **2.3.2.1. Introduction**

Les grandes pertes de substance maxillo-faciales, à l'instar de celles du reste de l'économie, sont considérées comme des défauts osseux de taille critique. Ce sont des défauts ayant une dimension minimale qui ne peut consolider spontanément s'ils ne sont pas traités ; ils devraient entraîner la formation de tissu conjonctif fibreux intralésionnel plutôt que de l'os [264]. Leur prise en charge représente un challenge pour les équipes chirurgicales car les traitements actuels reposent essentiellement sur des procédures de greffe. L'autogreffe est considérée comme la procédure de référence ou « gold standard ». Cependant, la greffe osseuse autologue nécessite un second temps opératoire pour le prélèvement du greffon ; ce qui constitue un risque de morbidité lié à la douleur postopératoire, à la quantité prélevable insuffisante, à l'inefficacité de la prise de la greffe à 100 %. Les allogreffes et les xélogreffes quant à elles comportent un risque de transmission d'agents pathogènes et de rejet immunitaire. Depuis quelques années, chercheurs et cliniciens essaient de trouver une solution alternative aux greffes osseuses. Ainsi, différents substituts osseux à base de matrice organique, minérale ou composite ont été développés. Des résultats encourageants ont été obtenus dans certains contextes notamment en site receveur de petite taille, présentant des conditions favorables de cicatrisation [198]. En revanche, dans des conditions hypotrophiques représentées par un site receveur peu vascularisé, irradié ou fibrosé, les substituts osseux seuls ne suffisent pas à régénérer les pertes de substance de taille critique. Il est donc indispensable de leur associer des molécules ostéoinductrices et/ou des cellules ostéogéniques afin de potentialiser leur capacité de guérison. C'est ainsi que des techniques d'ingénierie tissulaire sont élaborées et proposées en préclinique comme en clinique humaine et vétérinaire. L'ingénierie tissulaire est une stratégie d'implantation de supports bioactifs (mimant la matrice extracellulaire : MEC) supplémentés de morphogènes (facteurs de croissance) et/ou d'ostéoprogéniteurs (cellules souches

mésenchymateuses, moelle osseuse totale...) afin de réparer des pertes de substance majeures.

Notre travail de thèse contribue au développement d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR) composite, constitué d'une matrice organo-minérale (hydrogel d'hydroxypropyle-méthylcellulose silanisé : HMPC-Si) et d'une trame minérale de phosphate de calcium biphasé (BCP). Ce substitut biomimétique chargé d'une dose physiologique de BMP2 a donné des résultats encourageants après implantation en site orthotopique dans notre première étude chez le chien [39]. Cependant, la dégradation du biomatériau n'était pas complète au bout de 20 semaines postopératoires dans des défauts segmentaires d'ulna de chien. L'obtention d'un gradient proportionnel entre la résorption de la matrice et la néoformation osseuse dans la régénération d'une perte de substance semble être un élément essentiel [96, 98, 100, 112, 266, 267]. L'amélioration des produits d'ingénierie tissulaire pour les thérapies innovantes vise plusieurs axes notamment la fonctionnalisation des supports, l'amélioration de leur dégradation, la cinétique de relargage des morphogènes, l'aisance de l'implantation, la reproductibilité de la technique et des résultats obtenus, la sécurité, un moindre coût en terme d'économie de santé.

Des progrès en ingénierie tissulaire osseuse (ITO) ont été axés aussi sur la délivrance de substituts bioactifs par une procédure mini-invasive. Dans cette optique, nous avons voulu améliorer l'injectabilité du substitut osseux auto-réticulant en remplaçant les granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) par un biopolymère injectable prometteur : le chitosan [268, 269, 270, 271]. Dans cette étude expérimentale, nous avons utilisé un chitosan silanisé (CHI-Si) développé dans notre laboratoire. L'hypothèse était que l'injection du complexe CHI-Si + HPMC-Si associé à la BMP2 améliorerait la dégradabilité du support parallèlement à la formation osseuse.

### 2.3.2.2. Matériel et méthode

#### 2.3.2.2.1. Biomatériaux

La matrice minérale était composée de granules de phosphate de calcium biphasé (BCP : biphasic calcium phosphate). Ce sont des céramiques sphériques bioactives macro- microporeuses (MBCP<sup>+</sup>®, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). Les granules ont un diamètre compris entre 0.5 et 1 mm ; ils sont composés de 20% d'hydroxyapatite et de 80% de phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP). Le produit est livré dans des emballages stériles de 1g, prêts à l'emploi.

En prélude à l'expérience, les granules ont été conditionnés dans des tubes « eppendorf » par lots de 20 mg et stérilisés à l'autoclave. Cette masse correspond à la quantité de biomatériau pouvant être déposée dans les défauts de calvaria.

Avant implantation, les particules de BCP sont humidifiées avec du sérum physiologique sous la hotte de culture de la salle expérimentale de l'unité de thérapeutique expérimentale (UTE).

La trame organo-minérale était composée d'hydrogels d'HMPC-Si et de chitosan silanisé (CHI-Si). L'HMPC-Si est le même polymère que celui utilisé pour l'étude in vitro et in vivo dans la restauration des défauts osseux segmentaires d'ulna de chien. Afin d'améliorer l'injectabilité et la dégradabilité du substitut osseux auto-réticulant (SOAR), les granules de BCP ont été remplacés dans certaines conditions par du chitosan silanisé.

- Chitosan silanisé (CHI-Si)

La contribution des scientifiques français à la connaissance de la chitine et du chitosan a été considérable depuis l'isolement initial de la molécule par Henri Braconnot en 1811 [121]. Le nom de chitosan a été introduit pour la première fois en 1894 par Hoppe-Seyler ; mais la découverte du chitosan est néanmoins attribuée à C. Rouget [121]. Cependant, c'est au début des années 1980 que l'effort de recherche consacré à la chitine et au chitosan s'est accru de manière exponentielle.

Le chitosan est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Il est obtenu par désacétylation (chimique ou enzymatique) de la chitine, coproduit de l'exosquelette des crustacées. En milieu acide, le chitosan est soluble, chargé positivement. Ce qui lui permet de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement; et lui confère des propriétés adhésives vis-à-vis des cellules [121]. La valeur de sa masse moléculaire dépend intimement du procédé de fabrication, du degré de désacétylation, mais aussi de l'application désirée [121]. Elle varie de 100 à 1500 KDa ; dans le domaine médical, elle est de l'ordre de 100 à 500 KDa [121].

La silanisation du chitosan permet, comme l'HPMC-Si, d'avoir un hydrogel auto-réticulant. Pour ce procédé, nous utilisons du chitosan à bas poids moléculaire (448869, Sigma Aldrich) et comme réactif, du (3-Isocyanatopropyl)triéthoxysilane (SiNCO, 413364, Sigma Aldrich).

La synthèse se fait selon le protocole suivant : une solution mère de chitosan à 3% (poids / volume ; pH 3) est préparée et stockée au laboratoire. Dans un ballon contenant 33 mL de cette solution mère de chitosan sont ajoutés 67 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à pH 3. La solution finale de 1% (poids / volume) est à pH3.

Sous agitation, 1.55 mL du réactif (3-Isocyanatopropyl)triéthoxysilane (SiNCO) y sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité durant 3h à la température ambiante. La solution de chitosan silanisé (CHI-Si) ainsi obtenue est à pH 5-5.5 ; elle est congelée et lyophilisée.

La solubilisation du CHI-Si et la préparation du gel CHI-Si + HPMC-Si s'effectuent selon le protocole suivant : dans un flacon muni de barreau aimanté, le CHI-Si (600 mg, 20 mL, 3% poids/volume) est dissout avec une solution de soude (NaOH, 0.2M) après quelques heures d'agitation à température ambiante. Un volume identique d'HPMC-Si (20 mL, 3% poids/volume) est ajouté à la solution de CHI-Si. Une agitation de 48h à 72h est nécessaire pour la préparation de la solution finale CHI-Si à 3% (poids/volume) + HPMC-Si à 3% (poids/volume). Une 1<sup>ère</sup> dialyse de 15-18h est réalisée dans un bain de soude (3.8L NaOH, 0.09M) à travers une membrane de porosité de 7000 Da. Une 2<sup>ème</sup> dialyse est effectuée toujours en milieu basique (4L NaOH, 0.09M) pendant 2-3h. Le gel de CHI-Si + HPMC-Si à pH 12 ainsi obtenu est aliquoté dans des flacons de 10 mL sertis avant d'être stérilisé à l'autoclave à 121° pendant 30 minutes.

La réticulation est obtenue par adjonction d'un tampon acide (HEPES) à pH 3 afin d'obtenir un hydrogel injectable à pH neutre (pH 7).

#### 2.3.2.2.2. Facteur de croissance BMP2

Le facteur bioactif utilisé est la rhBMP2 (recombinant humain de la BMP2) (TruScient kit de 0.66 mg ; implant pour chien de chez Pfizer). C'est de la Dibotermine alpha, protéine ostéogénique humaine recombinante-2. C'est le même morphogène que celui utilisé lors de l'étude sur le chien.

Le TruScient reconstitué selon les recommandations du fabricant a une concentration de 200 µg/mL. La dose physiologique de BMP2 en calvaria chez le rat est de 30µg/mL (soit 30 µg/cm<sup>3</sup> ; 7 fois moins que chez le chien). Pour l'HPMC-Si seul et le CHI-Si + HPMC-Si, la solution de BMP2 de départ doit être 4 fois plus concentrée ; en effet pour la préparation de l'hydrogel, il faut 2 volumes de gel à 4% pour 1 volume de tampon B + 1 volume de BMP2 à 120 µg/mL. (100 µL gel 4% / 50 µL tampon B + 50 µL BMP2 à 120 µg/mL) ; ce qui donne 200 µL d'hydrogel auto-réticulant chargé en BMP2 à 30 µg/mL.

Pour les conditions CHI-Si + HPMC-Si + BMP2 : 60 µL d'hydrogel sont utilisés pour 2 défauts. Pour les conditions HPMC-Si + BCP + BMP2 : 60 µL d'hydrogel + 40 mg de granules sont nécessaires pour 2 défauts.

#### 2.3.2.2.3. Animaux

Cette étude a été menée sur une souche consanguine de rats Lewis issus du laboratoire d'élevage Janvier Labs. (Le Genest St Isle, France). Le rat Lewis est une souche plus sensible que la plupart des autres souches consanguines à l'induction de maladies auto-immunes comme l'arthrite induite, la myocardite expérimentale mais également à l'induction de maladies métaboliques (obésité induite et diabète). 18 femelles âgées 8 semaines et pesant 250 à 300 grammes ont été incluses dans l'étude. Elles ont été hébergées à l'animalerie de l'unité de

thérapeutique expérimentale de la Faculté de Médecine de Nantes, dans 6 cages en raison de 3 rats par cage. Une période d'acclimatation d'une dizaine de jours a été observée avant le début des manipulations. Le protocole expérimental a été appliqué après l'approbation du comité d'éthique et d'expérimentation animale des Pays de la Loire (saisine CEEA Pays de la Loire N° 2012.142) et avec l'aval du Comité local pour le bien-être des animaux de l'ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Sur chaque animal, deux défauts de calvaria de taille critique ont été réalisés afin d'évaluer la néoformation osseuse après implantation du SOAR, associé ou non à la BMP2.

#### 2.3.2.2.4. Conditions expérimentales

Dans cette étude, il y avait 6 conditions expérimentales à tester : (N = 6). Au niveau de chaque calvaria, 2 conditions étaient implantées, (2 conditions / rat). Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL ; (contrôle positif, testé sur le chien)

CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL ; (amélioration d'injectabilité du SOAR)

HPMC-Si + BMP 30µg/mL ;

HPMC-Si + BCP ;

CHI-Si + HPMC-Si ;

HPMC-Si.

Les conditions expérimentales relatives au défaut vide, au BCP seul et BCP + GOA, déjà testées dans des études antérieures, n'ont pas été reprises ici afin de ne pas sacrifier davantage d'animaux.

La répartition des conditions expérimentales au sein des défauts de calvaria est rapportée dans le tableau IX ci-après :

Tableau IX: répartition des conditions d'implantation dans les défauts de calvaria

Rat (identification)	Condition G	Condition D
1 (rien)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
2 (oreille G)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
3 (oreille D)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
4 (rien)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
5 (OG)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
6 (OD)	HPMC-Si + BCP + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si + BMP 30µg/mL
7 (rien)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
8 (OG)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
9 (OD)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
10 (rien)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
11 OG)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
12 (OD)	HPMC-Si + BMP 30µg/mL	CHI-Si + HPMC-Si
13 (rien)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
14 (OG)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
15 (OD)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
16 (rien)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
17 (OG)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
18 (OD)	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si

Le comblement des défauts a été effectué à l'animalerie de l'UTE de la Faculté de Médecine de Nantes.

#### 2.3.2.2.5. Anesthésie et procédure chirurgicale

Les rats ont été opérés sous anesthésie générale suivant le protocole ci-après :

Sur des animaux en décubitus ventral, l'induction anesthésique a été faite par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane à 3 L/min dans une chambre à induction close. L'anesthésie est maintenue par inhalation à l'aide d'un masque, à une concentration de 1.5 L/min. Après désinfection à la polividone iodée du site opératoire, une incision cutanée est faite sur la ligne médiane dans le sens cranio-caudal selon les conditions d'asepsie chirurgicales. Après réclinaison des tissus mous, une rugination du périoste est réalisée de part et d'autre de la suture sagittale jusqu'à la crête temporale latéralement.

Le repérage du site de trépanation est objectivé entre les crêtes coronales en avant, occipitales en arrière, la suture sagittale médialement et les crêtes temporales latéralement.

Au niveau de chaque calvaria, 2 défauts osseux circulaires de 5 mm de circonférence sont réalisés à l'aide d'une tréphine de 5 mm de diamètre externe (Komet Medical, Lemgo, Allemagne). La tréphine est montée sur une pièce à mains (Stryker, TPS U2 Drill 5100 -10 -20, Komet, Allemagne) et la trépanation

se fait sous irrigation continue de sérum physiologique. Après l'ablation de la pièce osseuse, les berges corticales du défaut sont régularisées à l'aide d'une curette dentaire, et l'absence de perforation du sinus veineux sagittal ou de la dure mère est contrôlée.

Ensuite, les défauts osseux de taille critique de calvaria sont comblés avec les différentes conditions expérimentales selon le tableau (IX) d'implantation. Après le comblement, les défauts sont recouverts d'une membrane de péricarde bovine (Edwards Lifesciences, Irvine, Etats-Unis d'Amérique), afin de prévenir la migration secondaire postopératoire des substituts osseux auto-réticulants. La voie d'abord est fermée par des points de suture simples à l'aide de fils résorbables (Vicryl 4/0, Ethicon, France). Enfin, l'identification des rats est effectuée par marquage sur les pavillons d'oreille suivant le code de marquage international des animaux.

L'analgésie postopératoire est effectuée immédiatement par injection intramusculaire de chlorhydrate de buprénorphine (Buprécare® 0.3 ml/mg à 10 µg/kg, Animal care, Dunnington, Royaume Uni). La stabulation a eu lieu à l'UTE avec nourriture et boisson à profusion dans un local à température et hygrométrie conventionnelles (24°C et un cycle lumière / obscurité de 12h/12), jusqu'au sacrifice.

#### 2.3.2.2.6. Explantation

Les rats ont été sacrifiés après une période d'implantation de 8 semaines, par inhalation d'une surdose de CO<sub>2</sub>, dans une chambre d'induction close.

Le retrait des explants s'est fait dans les mêmes conditions chirurgicales que l'implantation, à l'aide d'un disque diamanté monté sur pièce à mains (Komet Medical, Lemgo, Allemagne), sous irrigation continue, et à distance des sites d'implantation, afin de préserver l'interface substituts osseux / os natif. Les explants sont immédiatement immergés dans un milieu de fixation à base de paraformaldéhyde (PFA) à 4% en vue de leur analyse.

#### 2.3.2.2.7. Etudes de la repousse osseuse

Les prélèvements issus de la calvaria ont fait l'objet d'études au microscanner, en microscopie électronique à balayage et en histologie.

##### *2.3.2.2.7.1. Analyses au microscanner*

Les explants ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 24 heures, puis dans une solution de PBS pendant 7 jours. Après fixation, les échantillons sont placés dans de l'alcool 70° et analysés au microscanner au moyen d'un micro-CT à haute résolution d'image SkyScan 1272 (SkyScan, Bruker, Belgique). Les acquisitions d'images ont été effectuées à 70 kV, 166 mA, avec une taille de pixels de 5µm. Les reconstructions d'images 3D ont été

réalisées à l'aide du logiciel NRecon. La détermination de la région d'intérêt et des volumes osseux en 3D a été faite par le logiciel CTan pour l'évaluation qualitative et quantitative de la repousse osseuse.

#### 2.3.2.2.7.2. *Analyses en microscopie électronique à balayage (MEB)*

En vue de l'analyse au microscope électronique à balayage (MEB), les explants ont été inclus en résine Technovit 9100N (à base de méthyle méthacrylate, spécialement développée par Heraeus Kulzer GmbH pour l'inclusion de tissus minéralisés). Les échantillons sont d'abord déshydratés dans des bains croissants d'alcool (70° – 100°) par jour et de xylène ; ensuite suivent les étapes de pré-imprégnation, d'imprégnation et d'inclusion à froid (4°C et -20°C), dans des moules. Après le démoulage, les blocs sont poncés à l'aide d'une ponceuse Rotronic (Reitel, Bad Essel, Allemagne). Les échantillons sont ensuite coupés avec une scie à disque diamanté circulaire (SP1600, Leica, Wetzlar, Allemagne), dans la zone de plus diamètre, afin d'obtenir deux échantillons identiques, l'un pour l'analyse au MEB et l'autre pour l'analyse histologique.

La surface de chaque échantillon destiné à l'analyse au MEB a été polie à l'aide d'une polisseuse Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, Illinois, Etats-Unis), ensuite métallisée à l'or-palladium par un métalliseur Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, Etats-Unis). Les images ont été obtenues en utilisant le mode d'électron rétrodiffusé (BSE) à 15 keV (MEB : Leo 1450VP, Zeiss, Allemagne). L'évaluation quantitative de la néoformation osseuse a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image semi-automatique (Quantimètre 500, Leica Microsystème d'image, Cambridge, Royaume Uni). L'analyse des images obtenues est basée sur une méthode de seuillage quantitatif du niveau de gris dans une région d'intérêt (R.O.I. : region of interest) définie ; l'os apparaît en gris, les BCP en blanc, les espaces médullaires en noir. Les zones d'os néoformé, les granules de BCP et les tissus non minéralisés sont identifiés et exprimés en pourcentage occupé par rapport à la surface totale du défaut.

#### 2.3.2.2.7.3. *Analyse histologique*

Les échantillons inclus en résine Technovit 9100N destinés à l'étude histologique ont été recoupés au microtome pour tissus durs (Polycut SM2500, Leica, Wetzlar, Allemagne) afin d'obtenir des sections fines de 5 µm d'épaisseur. Ces coupes ont été montées entre lames et lamelles pour réaliser une série de colorations à l'aide d'un automate de coloration (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Etats-Unis). Le trichrome de Goldner, le pentachrome de Movat et la coloration à l'hématoxyline éosine (HES), caractéristiques aux tissus minéralisés, ont été effectués. De même, une coloration à la phosphatase acide tartrate résistance (TRAP : tartrate resistance acide phosphatase) a été faite afin d'évaluer l'activité des ostéoclastes. Les lames ont été observées au microscope photonique

(Axioplan2, Zeiss, Darmstadt, Allemagne) afin d'apprécier le tissu osseux néoformé, les interfaces os/biomatériaux, les espaces médullaires.

#### 2.3.2.2.7.4. *Analyse statistique*

Toutes les données sont présentées par la moyenne  $\pm$  écart-type. Une analyse de variance (ANOVA) avec comparaison de moyennes (PLSD Fischer) a été utilisée afin de comparer la néoformation osseuse et le biomatériau résiduel en fonction de l'adjonction ou non de BMP2. Le niveau de significativité retenu était de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.2.3. Résultats

#### 2.3.2.3.1. Procédure chirurgicale

La procédure opératoire s'est déroulée de façon satisfaisante, tous les rats étaient vivants à la fin de l'intervention. Aucune perforation du sinus veineux sagittal ni de la dure mère n'a été notée. En revanche, 3 semaines après l'implantation, nous avons constaté chez 4 rats implantés avec de l'HPMC-Si, un lâchage des fils et des berges non jointives, secondaires au « grignotage » par d'autres animaux.

#### 2.3.2.3.2. Résultats au micro-CT

Les analyses montrent un potentiel ostéoinducteur de chitosan silanisé (CHI-Si + HPMC-Si + BMP) supplémenté en morphogène au même titre que le SOAR (HPMC-Si + BCP + BMP) chargé en BMP2.

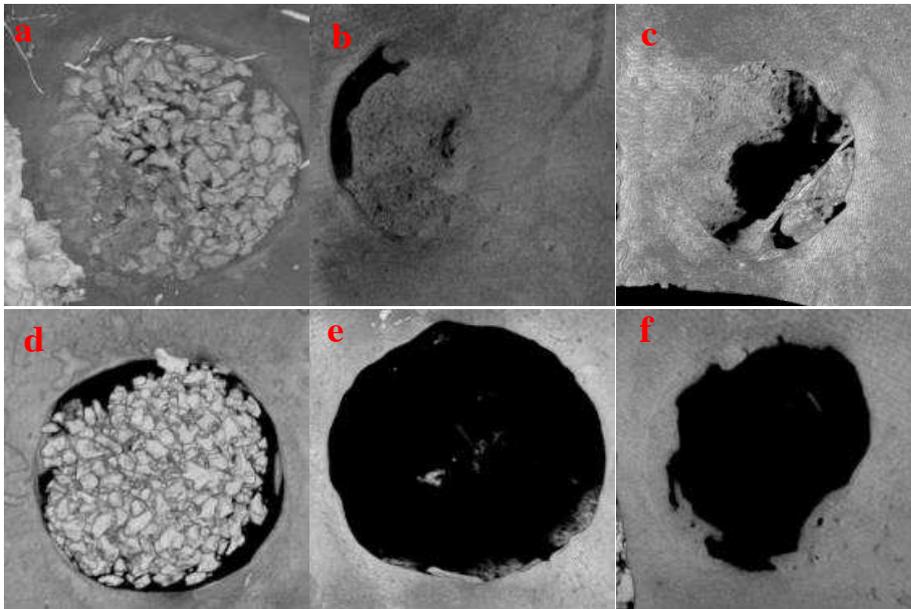


Figure 12: images  $\mu$ CT en 3D de défauts de calvaria à 8 semaines post-implantation. Acquisition d'images à 100 keV de tension et 91  $\mu$ A d'intensité, taille de pixel de 19.4  $\mu$ m. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

Nous observons : a) un comblement du défaut, interface SOAR/os natif connectée ; b) un comblement presque complet du défaut de calvaria, bordure médiale non interconnectée ; c) une néoformation osseuse centripète partielle ; d) une persistance d'une quantité importante de BCP, absence de néoformation objectivée à la jonction corticale/biomatériau ; e) pas de néoformation osseuse visible, ni de minéralisation à l'interface os/biomatériau, absence de persistance du substitut osseux injectable ; f) pas de néoformation osseuse visible, bordure corticale irrégulière.

Le tableau X ci-dessous représente l'évaluation quantitative de la repousse osseuse induite par les matrices chargées ou non de BMP2. Le chitosan silanisé (CHI-Si + HPMC-Si + BMP) a induit un pourcentage de repousse similaire au SOAR (HPMC-Si + BCP + BMP), de l'ordre de 44 %. Les écarts-types importants traduisent les variations de quantité d'os néoformé (selon les opérateurs = 3).

Tableau X: % quantitatif de néoformation osseuse par seuillage de gris au micro-CT 3D dans la région d'intérêt du défaut

% os néoformé /conditions $\mu$ CT 3D	HPMC-Si + BCP + BMP	CHI-Si + HPMC-Si + BMP	HPMC-Si + BMP	CHI-Si + HPMC-Si	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
Moyenne	44,6	44,16	35,96	3,35	6,57	13,51
Ecart-type	18,29	15,05	20,31	2,01	3,98	6,3

D'autre part, le chitosan silanisé semble moins ostéoconducteur que le BCP (CHI-Si + HPMC-Si = 3,35 % contre 6,57 % pour HPMC-Si + BCP).

L'analyse quantitative des granules de BCP résiduels montre une importante résorption des BCP dans les conditions avec BMP par rapport à celles dépourvues de facteurs de croissance (tableau XI ci-après) :

Tableau XI: % quantitatif de granules de BCP résiduels par seuillage de gris au micro-CT 3D dans la région d'intérêt du défaut

% BCP résiduels $\mu$ CT-3D	HPMC-Si + BCP + BMP	HPMC-Si + BCP
Moyenne	1,64	21,08
Ecart-type	1,37	6,01

Ces résultats montrent le potentiel ostéoinducteur des substituts osseux supplémenté de BMP. Les interactions entre le facteur de croissance et les biomatériaux sont confirmés par les tests statistiques.

**Test PLSD de Fisher pour BV/TV 3D**

**Effet : BMP**

**Niveau de significativité : 5 %**

**Eclaté par : Biomat**

**Céllule : BCP-HPMC**

**Exclusion de lignes : Données Amadou.svd**

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	38,02661	19,302	,0019

S

Effet de la BMP sur le substitut SAOR à induire à la néoformation osseuse. Test significatif avec  $p < 0,05$ .

Test PLSD de Fisher pour BV/TV 3D

Effet : BMP

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Biomat

Céllule : CHI-HPMC

Exclusion de lignes : Données Amadou.svd

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	40,81071	18,56753	,0017

S

Effet de la BMP sur le substitut CHI-Si + HPMC-Si à induire à la néoformation osseuse. Test significatif avec  $p < 0,05$

Test PLSD de Fisher pour BV/TV 3D

Effet : BMP

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Biomat

Céllule : HPMC

Exclusion de lignes : Données Amadou.svd

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	22,45597	25,21765	,0733

Effet de la BMP sur l'hydrogel d'HPMC-Si seul à induire à la néoformation osseuse. Test non significatif avec  $p > 0,05$

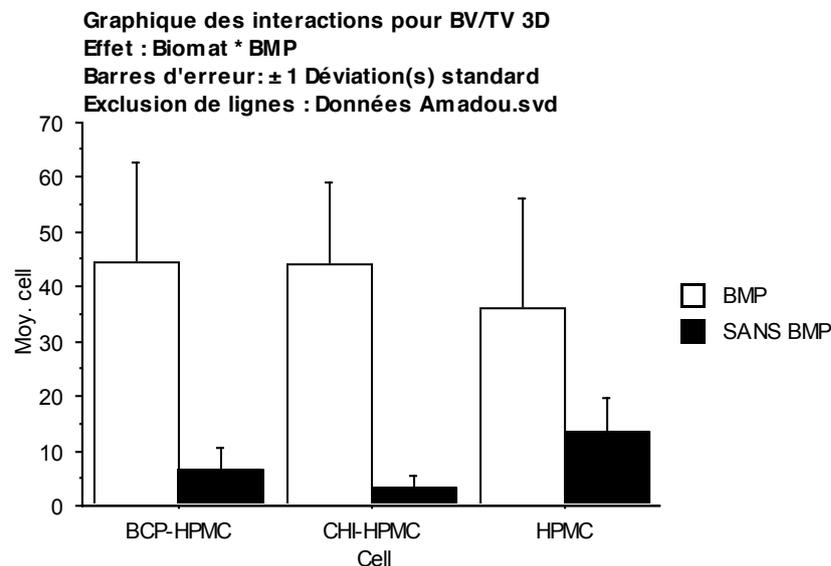


Figure 13: Action de la BMP sur le potentiel des différents substituts à induire la néoformation osseuse. Données au  $\mu$ CT 3D.

### 2.3.2.3.3. Résultats en microscopie électronique à balayage (MEB)

Les analyses qualitatives au microscope électronique à balayage (MEB) ont permis d'objectiver l'ultrastructure des explants notamment l'interface entre la néoformation osseuse et la matrice, ainsi que la jonction biomatériaux / os natif.

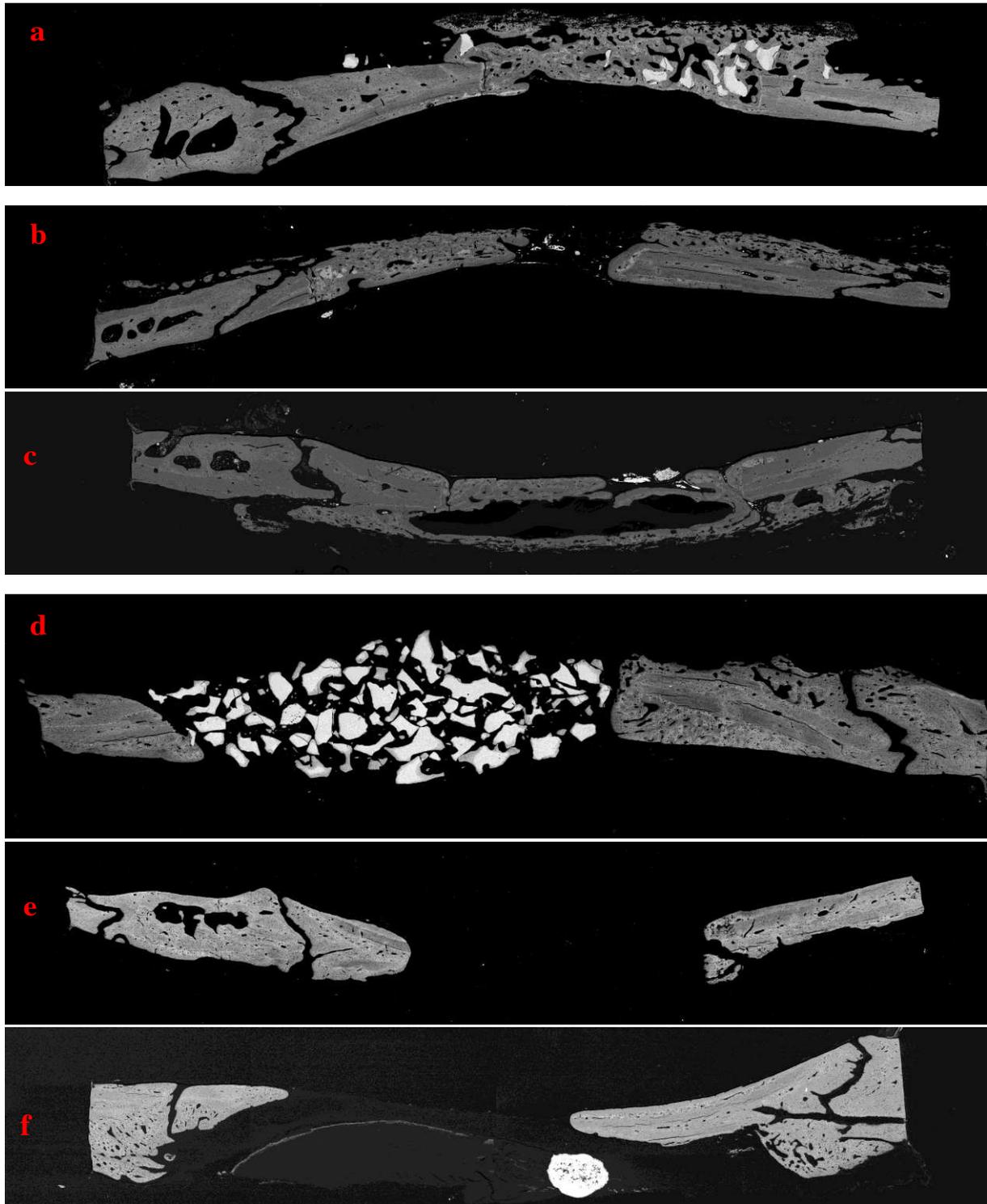


Figure 14: image MEB en 2D de défauts de calvaria à 8 semaines post-mortem

sur échantillon métallisé Au-Pd. Acquisition d'images par mode d'électron rétrodiffusé à 15keV. Seuillage de gris des composants dans la région d'intérêt : os en gris, biomatériau en blanc, tissu mou en noir.

Défauts comblés avec : a) HMPC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

L'image montre : a) une régénération osseuse centripète du défaut, une réduction considérable des granules de BCP, une fusion des jonctions médiale et latérale ; b) une régénération presque complète du defect osseux, pas d'os néoformé visible sur l'un des bords du défaut, légère fusée du gel sur l'os controlatéral ; c) un comblement du défaut le long de la membrane péricardique bovine ; d) pas d'os néoformé ni au cœur du substitut osseux, ni à la jonction biomatériau / os natif, persistance d'une importante quantité de BCP ; e) une résorption complète de l'hydrogel CHI-Si + HPMC-Si, sans os néoformé ; f) présence de l'aspect d'excroissance calvariale post lâchage des fils de suture.

Les analyses qualitatives au MEB vont dans le même sens que celles faites au microscanner. L'os néoformé était réparti de façon homogène au sein du défaut dans les conditions HPMC-Si + BCP + BMP. Mais la repousse osseuse était plus abondante aux bords corticaux qu'au centre du défaut. En revanche, avec le chitosan silanisé supplémenté en BMP2, la repousse était aussi importante, mais pas toujours aux berges du défaut. L'hydrogel d'HPMC-Si chargé en BMP a induit une minéralisation intéressante, néanmoins inhomogène.

Les résultats quantitatifs sont similaires également à ceux observés au microscanner. Le pourcentage d'os néoformé dans le défaut par rapport à la surface totale du défaut dans la zone d'intérêt était sensiblement équivalent (44 %) pour les conditions CHI-Si + HPMC-Si + BMP et HPMC-Si + BCP +BMP (SOAR). D'autre part, le chitosan silanisé était moins ostéoconducteur que les granules de BCP : CHI-Si + HPMC-Si = 3,36 % contre 6,63 % pour HMPC-Si + BCP (substituts osseux dépourvus de BMP2).

Tableau XII: % quantitatif de néoformation osseuse par seuillage de gris au MEB 2D au niveau de la région d'intérêt du défaut

% os néoformé /conditions MEB 2D	HMPC-Si + BCP + BMP	CHI-Si + HMPC-Si + BMP	HPMC-Si + BMP	CHI-Si + HMPC-Si	HPMC-Si + BCP	HPMC-Si
Moyenne	44,66	44,23	36,1	3,36	6,63	13,54
Ecart-type	18,29	15,05	20,35	2,01	3,99	6,31

Le facteur de croissance BMP2, en plus d'induire la formation osseuse, favorise la résorption des granules de BCP : 1,65 % pour SOAR avec BMP contre 21,22 % sans BMP.

Tableau XIII: % quantitatif de granules de BCP résiduels par seuillage de gris au MEB 2D au niveau de la région d'intérêt du défaut

% BCP résiduels	MEB 2D	HPMC-Si + BCP + BMP	HPMC-Si + BCP
Moyenne		1,65	21,22
Ecart-type		1,38	6,04

D'autre part, la structure d'os lamellaire dense, observée par seuillage de gris au microscanner et au MEB, a été confirmée par la microanalyse X par énergie dispersive (EDX). Cependant, l'os néoformé était plus mature avec les conditions HPMC-Si + BCP +BMP comparées à CHI-Si + HPMC-Si +BMP.

**Test PLSD de Fisher pour BV/TV 2D**

**Effet : BMP**

**Niveau de significativité : 5 %**

**Eclaté par : Biomat**

**Céllule : BCP-HPMC**

**Exclusion de lignes : Données Amadou.svd**

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	38,02858	19,30886	,0019

 S

Effet de la BMP sur le substitut SAOR à induire à la néoformation osseuse. Test significatif avec  $p < 0,05$ .

**Test PLSD de Fisher pour BV/TV 2D**

**Effet : BMP**

**Niveau de significativité : 5 %**

**Eclaté par : Biomat**

**Céllule : CHI-HPMC**

**Exclusion de lignes : Données Amadou.svd**

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	40,8697	18,58356	,0017

 S

Effet de la BMP sur le substitut CHI-Si + HPMC-Si à induire à la néoformation osseuse. Test significatif avec  $p < 0,05$

**Test PLSD de Fisher pour BV/TV 2D**

**Effet : BMP**

**Niveau de significativité : 5 %**

**Eclaté par : Biomat**

**Céllule : HPMC**

**Exclusion de lignes : Données Amadou.svd**

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
BMP, SANS BMP	22,5626	25,27265	,0727

Effet de la BMP sur l'hydrogel d'HPMC-Si seul à induire à la néoformation osseuse. Test non significatif avec  $p > 0,05$

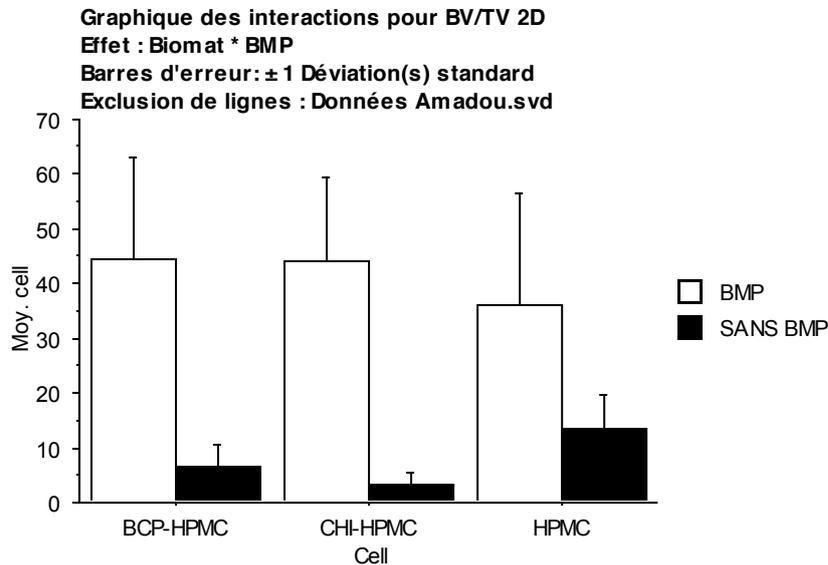


Figure 15: Action de la BMP sur le potentiel des différents substituts à induire la néoformation osseuse. Données au  $\mu$ CT 2D.

L'interaction de la BMP sur la résorption du support matriciel et la quantité de BCP résiduelle est également significative.

Tableau XIV : Rapport Ca/P comparatif entre os néoformé par CHI-Si + HPMC-Si + BMP et SOAR + BMP

Eléments	%massique CHI-SI + HPMC-Si + BMP	%massique HPMC-Si + BCP + BMP
Calcium : Ca	5,27	19,10
Phosphore : P	4,2	10,46
Rapport Ca/P	<b>1,25</b>	<b>1,83</b>

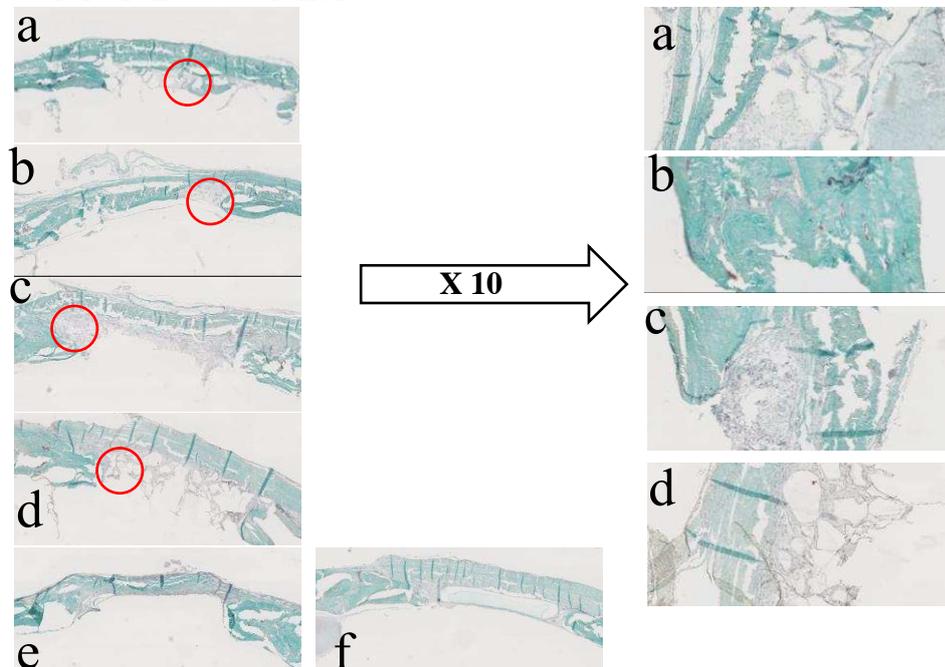
#### 2.3.2.3.4. Résultats histologiques

L'analyse histologique, par différentes colorations (Goldner, Movat, HES, TRAP et CD 68 pour certaines conditions expérimentales), a permis la mise en évidence de la néoformation osseuse, son aspect, ainsi que les rapports entre les biomatériaux et le tissu environnant.

Sur les conditions SOAR + BMP, la néoformation osseuse observée à partir des bords corticaux était centripète en direction du cœur du défaut, mais aussi entre les granules de BCP. L'os formé avait une structure haversienne avec des ostéoblastes en palissade à la surface des travées osseuses. Les repousses osseuses obtenues avec les matrices CHI-Si + HPMC-Si + BMP étaient minéralisées, denses, avec de nombreux ostéocytes visibles. Cette structure était observée avec la condition HPMC-Si + BMP, cependant avec moins de cellules ostéoïdes.

Dans les autres conditions expérimentales, les défauts étaient comblés par un tissu fibreux conjonctif. Dans les conditions sans BMP, seules les matrices HPMC-Si + BCP présentaient quelquefois, une structure minéralisée à leur interface avec l'os natif. Le CHI-Si dépourvu de morphogène n'a pas montré de propriétés ostéoconductrices comparables aux granules de BCP.

#### Coloration de Goldner



*Figure 16: Coloration de Goldner à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.*

*Le tissu minéralisé apparaît en vert, le biomatériau en blanc, le tissu conjonctif et ostéoïde en gris.*

## Coloration de MOVAT

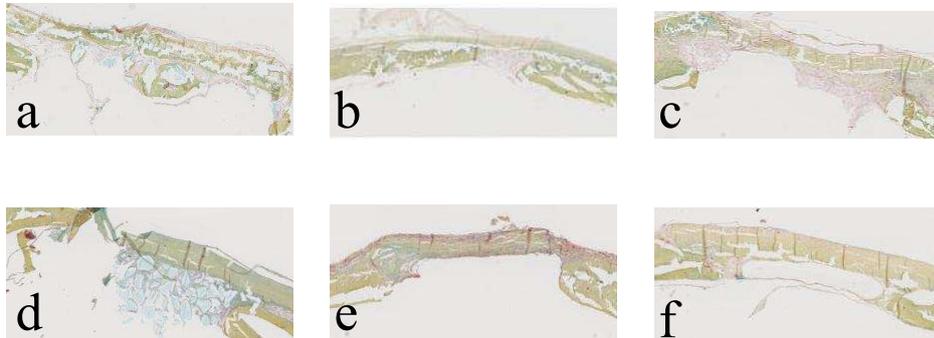


Figure 17: Coloration de Movat à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si. Le tissu osseux apparaît en jaune/vert, le biomatériau en bleu/blanc, le tissu conjonctif en rouge pâle.

## Coloration HES

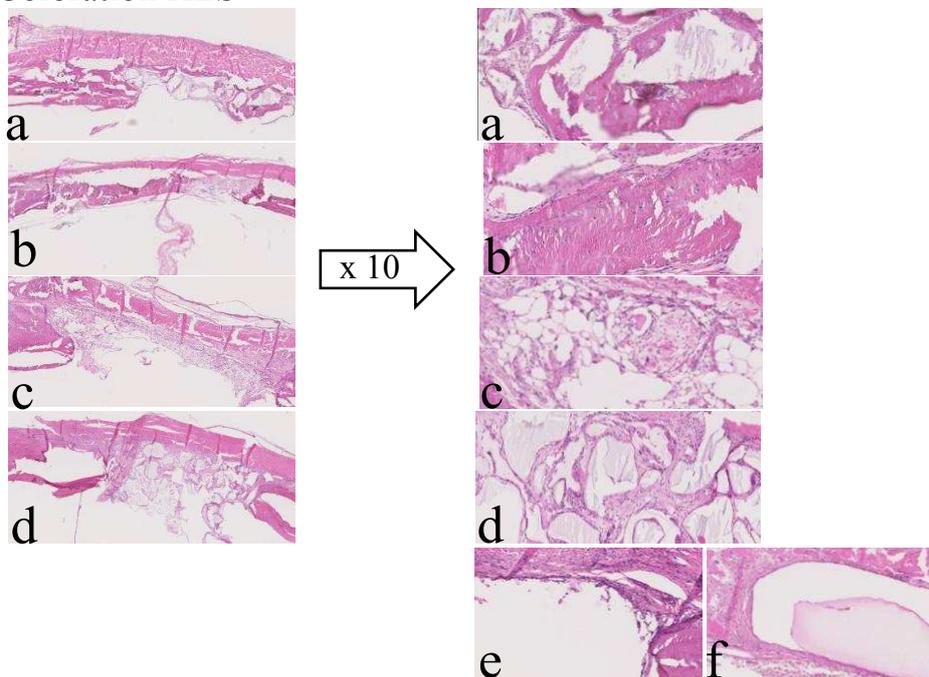


Figure 18: Coloration HES à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5 (zoom x 10 des zones d'intérêt). Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

Tissu osseux en rose foncé/mauve, BCP en gris, tissu mou en rose pâle.

### Coloration TRAP

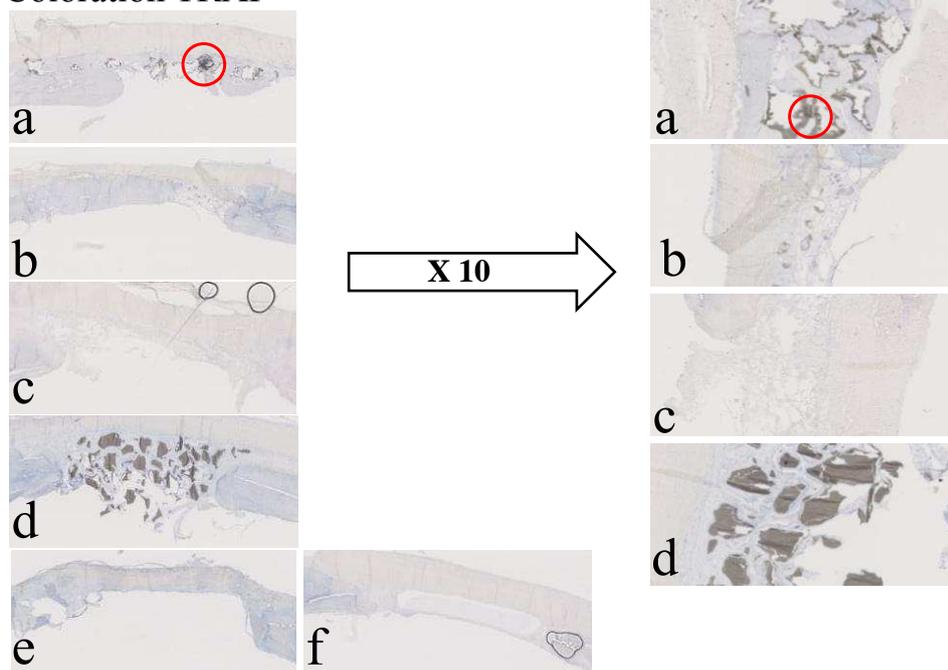
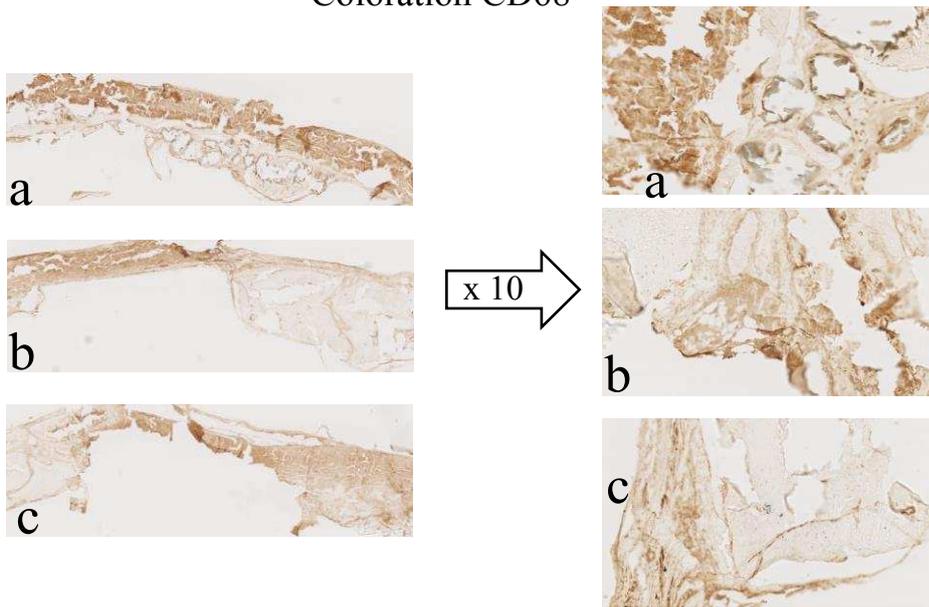


Figure 19: Coloration TRAP à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si + BMP, c) HPMC-Si + BMP, d) HPMC-Si + BCP, e) CHI-Si + HPMC-Si, f) HPMC-Si.

Cellule TRAP + multinucléée observée dans la condition HPMC-Si + BCP + BMP (a), en encadré.

### Coloration CD68



*Figure 20: Coloration CD68 à 8 semaines sur des échantillons de défauts de calvaria au grossissement X 5. Défauts comblés avec : a) HPMC-Si + BCP + BMP, b) CHI-Si + HPMC-Si, c) HPMC-Si.*

*Monocytes et macrophages observés avec les conditions expérimentales CHI-Si + HPMC-Si (b) et HPMC-Si (c).*

L'analyse histologique confirme la repousse osseuse constatée au microscanner et sur les coupes MEB avec SOAR + BMP. Néof ormation osseuse autour des granules de BCP et à l'interface avec l'os natif (Fig 16-a, 17-a). Cicatrisation du défaut avec SOAR + BMP, identique à l'étude orthotopique chez le chien (étude expérimentale in vivo 1). Confirmation de l'ostéoconduction du CHI-Si à la place de BCP, en présence de BMP2, par la cicatrisation du défaut calvarial aussi bien au  $\mu$ CT, au MEB que par l'histologie (CHI-Si + HPMC-Si + BMP : Goldner Fig. 16-b et Movat Fig. 17-b).

HPMC-Si seul chargé en BMP induit une faible cicatrisation osseuse en site orthotopique (comme en site ectopique : étude antérieure non publiée ici sur des souris nudes et C57/Bl6). Présence de la membrane de recouvrement sans véritable néof ormation osseuse (Fig. 16-c et 17-c) à l'inverse de  $\mu$ CT et MEB.

SOAR (HPMC-Si + BCP) bien en place au site d'implantation. Sans BMP, le contrôle négatif confirme l'absence d'ostéoinduction et la moulabilité du biomatériau seul (Fig. 16-d, 17-d). Intérêt de la substitution du BCP par le CHI-

Si : dégradation complète du biomatériau (CHI-Si + HPMC-Si) sur ces lames où il ne reste que la membrane de recouvrement. CHI-Si : bonne alternative aux granules de BCP en terme d'injectabilité (Fig. 16-e, 17-e). Présence de l'hydrogel (HPMC-Si) sous la membrane de recouvrement, malgré une légère fusée sous la calvaria (Fig. 16-f, 17-f). Pas d'ostéoconduction notée aux berges du défaut.

La coloration à l'hématoxyline éosine (HES), met en évidence la composition cellulaire. Dans les conditions avec le facteur de croissance BMP2, un tissu minéralisé est observé au contact des granules de BCP (SOAR + BMP, Fig. 18-a), les autres conditions montrent du tissu ostéoïde avec des lacs vasculaires et des progéniteurs hématopoïétiques (18-a, b, c). Dans les conditions sans BMP, le tissu de granulation formé est riche en fibroblastes (18-d, e, f).

La présence de cellule TRAP positive (en encadré sur la lame Fig. 19-a) traduit la dégradation du biomatériau parallèlement à la régénération de la perte de substance avec la condition SOAR +BMP. Signe de remaniement des granules de BCP sur la lame 24-d. Pas de cellule TRAP positive observée sur ces lames (Fig. 19-b, c, e, f).

Une mise au point de CD68 en immunohistochimie comme marqueurs de monocytes et macrophages, réalisée sur des conditions expérimentales avec ou sans BMP, a révélé une forte activité inflammatoire avec les hydrogels dépourvus de morphogènes CHI-Si + HPMC-Si, HPMC-Si (Fig. 20-b, c).

#### 2.3.2.4. Discussion

Cette étude expérimentale constituait la première évaluation d'une stratégie d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) utilisant un mélange d'hydrogels de chitosan silanisé (CHI-Si) et d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé (HPMC-Si), combiné à la BMP2, en vue de la reconstruction d'une perte de substance en site orthotopique hypotrophique. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR) combinant des hydrogels de CHI-Si et d'HPMC-Si, associé à la BMP2, à induire l'ostéoformation dans un défaut de taille critique de calvaria de rat. L'hypothèse était que l'utilisation de la matrice CHI-Si + HPMC-Si, supplémentée de BMP2 libérée progressivement, améliorerait la dégradabilité du matériau, tout en induisant la repousse osseuse.

Dans tous les défauts de calvaria de taille critique comblés par des matrices dépourvues de BMP2, le CHI-Si + HPMC-Si n'était plus observé après 8 semaines. L'hydrogel semblait complètement résorbé ; en effet, il a été noté sur des lames CD 68, la présence de macrophages en faveur de la dégradation du support matriciel. Le même phénomène était observé avec les conditions d'hydrogel HPMC-Si seul, en dehors des excroissances inflammatoires notées suite au « grignotage » par d'autres rats. Les défauts comblés par le SOAR sans BMP2 ont montré une intégration du biomatériau et la persistance d'une quantité importante de granules de BCP (21.22 % contre 1.65 % pour SOAR + BMP2). Sur ce plan, le mélange CHI-Si + HPMC-Si semble être plus prometteur en termes d'injectabilité et résorbabilité que le substitut HPMC-Si + BCP. D'autre part, le chitosan possède des propriétés adhésives vis-à-vis des cellules du fait de sa solubilité et de sa charge électropositive en milieu acide. Ce qui lui confère la faculté, au niveau du site d'implantation, de recruter et de différencier des cellules souches de l'hôte en cellules ostéoprogénitrices. Dans une étude *in vitro*, Kim et al. (2011) ont montré la viabilité et la prolifération de cellules souches embryonnaires palatines humaines (HEPM) et de cellules stromales préostéoblastiques murines (W-20-17) après 3 jours de culture sur un gel de chitosan ( $p < 0.05$ ) [272]. Le même gel de chitosan associé à du  $\beta$ -glycérophosphate et supplémenté de rhBMP2 a montré une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), une surexpression d'ostéocalcine après 14 jours d'incubation de ces mêmes souches cellulaires. L'étude de Guzmán et al. (2014) [265] menée sur des souches prémyoblastiques murines (C2C12), a montré également une viabilité cellulaire après 3 jours de culture et une prolifération après 14 jours sur un gel de chitosan associé à des sels de phosphate de calcium (CPS) et à la rhBMP2. Ces résultats étaient supérieurs et plus significatifs ( $p < 0.05$ ) que les cultures sur CHI + CPS ou CHI + rhBMP2 séparément.

Dans ces études, le support chitosan était combiné à des sels de phosphate de calcium ou à du phosphate inorganique ( $\beta$ -glycérophosphate). Le chitosan ne présenterait pas de propriété d'ostéoconduction. Dépourvues de BMP2, nos conditions expérimentales CHI-Si + HPMC-Si n'ont généré que 3.36 % de repousse osseuse contre 6.63 % pour HPMC-Si + BCP. Lorsqu'elles sont chargées de facteurs de croissance, les matrices CHI-Si + HPMC-Si + BMP2 ont induit 44 % de repousse osseuse au même titre que SOAR + BMP2. L'apport du morphogène était significatif, comme attesté par les analyses statistiques (CHI-Si + HPMC-Si + BMP2 >>> CHI-Si + HPMC-Si avec  $p = 0.017$ , et SOAR + BMP2 >>> SOAR avec  $p = 0.019$ ). Cependant, la néoformation osseuse était répartie de façon homogène dans les défauts comblés avec SOAR + BMP2, depuis les interfaces os natif / biomatériaux jusqu'au centre. Cela n'était pas le cas avec l'os néoformé induit par CHI-Si + HPMC-Si + BMP2. Le ratio Ca/P de 1.25 pour CHI-Si + HPMC-Si + BMP2, inférieur à celui de SOAR + BMP (1.83) traduirait une repousse ostéoinduite moins minéralisée par rapport à celle de SOAR + BMP2. Des études précliniques utilisant une matrice de chitosan supplémentée de BMP2 et / ou de cellules ostéogéniques, ont montré une meilleure cicatrisation et régénération des défauts lorsque les substituts osseux étaient associés à des sels de phosphate de calcium ou à d'autres dérivés phosphocalciques [264, 272, 273]. L'apport de la présente étude est que la trame minérale à base de phosphate de calcium semble quand même importante voire indispensable dans les matrices d'hydrogel associées ou non à la BMP dans la reconstruction de défauts osseux de taille critique.

Le chitosan silanisé (CHI-Si), combiné à une libération contrôlée de BMP2 des mailles du réseau tridimensionnel de l'HPMC-Si, a induit une néoformation osseuse abondante ; celle-ci était similaire au SOAR, de l'ordre de 44 %. L'apport d'une quantité identique de BMP2 de 30  $\mu\text{g/mL}$  dans cette étude, correspondant à une dose physiologique chez les modèles murins [144, 148, 181], permet d'affirmer que le substitut injectable CHI-Si + HPMC-Si + BMP2 présenterait des propriétés ostéoinductrices quasi similaires au contrôle positif. Les défauts étaient constamment régénérés dans tous les cas cliniques comblés avec ces deux conditions expérimentales. Les analyses 3D au microscanner et 2D au MEB ont révélé une structure osseuse mature, lamellaire, avec une densité de connectivité des ostéons (unités multicellulaires de base : BMU) [43, 62]. Selon Mont et al. [47], l'efficacité clinique des formes recombinantes de BMP (rhBMP2) dépendra du support matriciel utilisé pour assurer un relargage progressif à des concentrations adéquates du morphogène au site d'implantation.

D'autre part, selon plusieurs études, l'activité de la BMP2 à partir de gels de chitosan serait espèces dépendantes [272]. Les résultats obtenus en ITO peuvent être influencés par de nombreux paramètres, notamment la durée de l'étude, la

procédure d'implantation, le site de comblement, l'espèce animale. Barradas et al. (2011) ont rapporté que sur 51 études portant sur le potentiel d'ostéoinduction des substituts phosphocalciques, seules 10 ont été menées sur des modèles murins [28]. La formation osseuse serait plus lente avec les petites espèces animales par rapport aux animaux plus grands. De plus, les techniques et matériels de chirurgie utilisés avec les gros modèles animaux se rapprochent davantage de la clinique humaine. Mais, pour des raisons éthiques et de coût, les protocoles et procédures sont d'abord testés et validés sur de petits modèles animaux.

L'adjonction de dérivés phosphocalciques non cristallins dans les matrices d'hydrogel améliorerait leur ostéoconduction. Le relargage ionique de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  permettrait la re-précipitation en surface d'apatites biologiques bioactifs [35]. Cette stratégie trouverait son intérêt dans la délivrance d'une matrice biomimétique par un procédé mini-invasif. Un substitut ostéoinducteur, injectable, pourrait être une alternative prometteuse à un second temps opératoire, lorsqu'une greffe autologue est indiquée. Les avantages des biomatériaux ostéoinducteurs résident dans leur potentialité à réparer des grandes pertes de substance osseuses [29]. Ceci éviterait la morbidité liée à l'acte chirurgical, aux risques consécutifs au prélèvement d'un greffon osseux, la durée d'hospitalisation. Selon Stephan et al. (2010), l'une des avancées dans les stratégies d'ITO est axée sur la délivrance mini-invasive de substituts osseux [273]. Le complexe CHI-Si + HPMC-Si est une association d'hydrogels injectables. Chargé en BMP2, il a induit une repousse osseuse abondante, mise en évidence par les analyses au microscanner et au MEB, de l'ordre de 44 % (tableaux XI et XIII). Cette néoformation osseuse était aussi importante que celle obtenue avec le substitut osseux auto-réticulant (SOAR : HPMC-Si + BCP + BMP = 44 %) chargé en BMP2 (contrôle positif).

L'étude de Stephan et al. a mis en évidence, la capacité d'un biopolymère injectable prometteur basé sur un mélange de chitosan et de phosphate d'ammonium, chargé en BMP et/ou CSM (cellules souches mésenchymateuses) à cicatrifier un défaut de taille critique de calvaria [273]. Le complexe CHI-Si + HPMC-Si supplémenté en BMP a favorisé une cicatrisation, certes pas toujours complète des défauts, au même titre que HPMC-Si + BCP + BMP2 (44 %). La néoformation osseuse était plus importante avec ces deux conditions expérimentales, qu'avec le seul HPMC-Si chargé en BMP2 (35 %), ou bien qu'avec la condition BCP + BMP2 (42,3 % : obtenue dans une autre étude [239]). Toutes les conditions sans facteur de croissance n'ont pas induit de néoformation osseuse significative.

Les perspectives iront dans le sens du développement de substituts osseux auto-réticulants composites associant une trame organo-minérale d'hydrogels de CHI-Si + HPMC-Si et une trame minérale de phosphate de calcium amorphe non

cristalline (sous forme de sels). De tels supports biomimétiques, injectables et ostéoconducteurs, chargés en morphogène libéré progressivement, induiraient la formation d'une matrice osseuse semblable à l'os natif dans un contexte de procédure mini-invasive. Les résultats d'études antérieures ont montré que l'efficacité de tels substituts, dans la régénération osseuse de défauts de taille critique, était supérieure lorsque les agents de minéralisation (sels phosphocalciques) et les facteurs de croissance agissaient de façon combinée plutôt que séparément [265]. Les propriétés biomécaniques de la néoformation osseuse seront étudiées de façon plus approfondie. La diminution des quantités utilisées de BMP2 sera orientée dans le sens de la dose minimale efficace ; ce qui limiterait les complications et effets secondaires liés à l'emploi de la BMP2 dans un cadre optimal et sécurisé. L'amélioration des performances aussi bien sur le plan ostéoconducteur qu'ostéoinducteur, pourrait trouver un intérêt dans une future application clinique de ces substituts osseux auto-réticulants en chirurgie buccale et maxillo-faciale. Ces biomatériaux seraient indiqués dans le comblement des poches parodontales, dans la procédure d'élévation sinusienne en remplaçant le greffon osseux support de la future pose d'implants endo-osseux. En chirurgie cranio-maxillo-faciale, dans la restauration des pertes de substance acquises ou congénitales, ces matrices biomimétiques serviraient de biomatériaux de comblement, de support pour un prototypage rapide ou une bio-impression 3D.

### 2.3.2.5. Conclusion

Le travail présenté dans cette expérimentation animale a porté, d'une part, sur l'évaluation d'un substitut osseux auto-réticulant injectable, supplémenté de facteur de croissance, à favoriser la néoformation osseuse en site orthotopique hypotrophique. D'autre part, cette recherche visait à déterminer la pertinence de la substitution de granules phosphocalciques par un gel de chitosan. Il s'agissait de la première étude à tester le potentiel cicatriciel et résorbable de la combinaison de chitosan silanisé et d'HPMC-Si, associée ou non à la BMP2, sur un défaut de taille critique de calvaria. Ce mélange de polymères, couplé au morphogène BMP2, a induit une néoformation osseuse similaire au substitut osseux auto-réticulant (SOAR : HPMC-Si + BCP + BMP2). Dépourvu de facteur de croissance, le complexe CHI-Si + HPMC-Si n'a pas engendré de repousse osseuse à l'interface avec l'os natif ; il n'était plus décelable au site d'implantation. Ceci traduit l'ostéoinduction du biomatériau injectable chargé en BMP2, mais aussi son manque d'ostéoconduction et sa résorbabilité. L'adjonction d'une phase amorphe non cristalline de phosphate de calcium pourrait améliorer les propriétés intrinsèques de substitut osseux auto-réticulant injectable. La collaboration entre chercheurs et cliniciens est indispensable du fait du caractère pluridisciplinaire de l'ingénierie tissulaire osseuse afin de surmonter les limites techniques actuellement rencontrées pour synthétiser de nouveaux matériaux biomimétiques.

## Conclusion générale

La prise en charge des pertes de substance crano-maxillo-faciale, quelle que soit leur origine, acquise ou congénitale, demeure un challenge pour les thérapeutes. La réhabilitation prothétique conserve encore ses indications dans le domaine maxillo-facial pour rétablir les fonctions oro-faciales malgré l'évolution des techniques chirurgicales, l'essor de la microchirurgie, le développement de nouveaux matériaux de comblement. La chirurgie réparatrice reste la procédure de référence dans le traitement des défauts de taille critique malgré les risques de morbidité au niveau des sites de prélèvement de greffons osseux. Ce travail s'intègre dans la démarche d'amélioration de la prise en charge des patients présentant des pertes de substance, dans l'optique de trouver des alternatives aux prothèses inertes et aux greffes autologues. L'ingénierie tissulaire et la médecine régénératrice représentent des disciplines prometteuses dans ce contexte.

L'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à la mise au point de substituts osseux auto-réticulants afin d'améliorer l'efficacité de la BMP2 au site d'implantation par une libération progressive, et ainsi la régénération osseuse de grande perte de substance. L'hypothèse était que le relargage progressif d'une dose physiologique BMP2 induirait la régénération osseuse in vivo en site orthotopique hypotrophique, sans engendrer d'effets indésirables. Cela contribuerait au transfert en clinique humaine de manière sécurisée.

L'étude expérimentale a été menée en phases in vitro et in vivo. Dans un premier temps, le potentiel d'encapsulation et de libération de molécules des mailles de l'hydrogel d'HPMC-Si a été testé in vitro. Le dosage du glucose a montré une libération progressive à partir de l'HPMC-Si. Le dosage du facteur de croissance BMP2 a révélé un relargage in situ nettement inférieur à la quantité reconstituée au départ. Ces profils de libération avec l'hydrogel d'HPMC-Si étaient différents de l'élimination rapide observée avec les particules phosphocalciques. Les tests mécaniques effectués sur des échantillons d'hydrogel, chargés ou non de glucose et / ou de BMP2, ont montré des propriétés rhéologiques intéressantes en termes d'injectabilité. En revanche, les modules élastiques n'étaient pas en faveur d'une substitution en l'état avec la matrice extracellulaire osseuse. C'est ce qui milite en faveur du développement de biomatériaux composites comme supports de réparation de tissus endommagés.

Le travail présenté dans la première étude in vivo a porté sur l'évaluation du potentiel cicatriciel du substitut osseux auto-réticulant (SAOR : HPMC-Si + BCP), chargé ou non en BMP2. Dépourvu de morphogène, le SOAR a montré un potentiel ostéoconducteur au contact de l'os hôte uniquement, sans capacité ostéoinductrice. En revanche, le SOAR supplémenté de BMP2 a montré des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices en induisant la régénération

complète de défauts segmentaires d'ulna de chiens et la résorption des granules de phosphate de calcium biphasé, par une libération contrôlée du morphogène. Cependant, il a été noté une persistance des particules de BCP après 4 mois d'implantation. Un substitut osseux optimal doit présenter une résorption complète au bout de 4 à 6 mois ; ce qui est recommandé pour les essais cliniques.

La deuxième étude expérimentale *in vivo*, en plus d'essayer de confirmer l'ostéoinduction et l'ostéoconduction de SOAR + BMP2 sur des défauts de taille critique de calvaria, a porté sur l'amélioration de la résorption et de l'injectabilité du substitut osseux auto-réticulant. Les granules de BCP ont été remplacés dans certaines conditions par du gel de chitosan silanisé. Le mélange d'hydrogels de CHI-Si et de HPMC-Si associé à la BMP2, a présenté, en plus d'une injectabilité propice à une chirurgie mini-invasive, une résorption améliorée à 8 semaines post-implantation, ainsi que des propriétés ostéoinductrices et ostéoconductrices. Les propriétés de l'os néoformé étaient moindres par rapport à celui induit par le biomatériau composite HPMC-Si + BCP ; d'où la nécessité d'adjonction de phase amorphe phosphocalcique.

Le relargage contrôlé de morphogènes, biologiquement actifs, à la dose et à la concentration appropriées au niveau du site d'implantation, pour une application donnée, en utilisant une matrice biomimétique, biocompatible, biorésorbable, est essentielle pour favoriser la régénération de défaut osseux de taille critique. Dans la perspective d'une application clinique pour la reconstruction de pertes de substance cranio-faciales et orthopédiques, la combinaison de biomatériaux composites et de BMP se révèle être une stratégie prometteuse. Actuellement, le challenge pour les chercheurs et cliniciens en ingénierie tissulaire osseuse demeure la délivrance de facteurs ostéoinducteurs par un substitut optimal, de manière à assurer une régénération osseuse constante identique voire supérieure à la greffe autologue, possédant les propriétés mécaniques et physiques de l'os natif. Les études futures devront être axées sur le développement de matériaux intelligents (smart scaffold) et de système de relargage contrôlé de facteurs bioactifs, personnalisables (prototypage rapide, impression 3 D). Ces matériaux intelligents devraient être adaptés aux procédés chirurgicaux mini-invasifs (principalement injectables) et aux modifications physiologiques du microenvironnement des défauts osseux pour le bien-être et l'amélioration de la qualité de vie des patients concernés.

## Références bibliographiques

1. Benoist M. réhabilitation et prothèse maxillo-faciales. Editions Prélat, 1978 ; 454p.
2. Khaidem D, Nadeem Y, Amit Kumar T. Oral Maxillofac Prosthetics Part I : Objectives and history ; Heal Talk 2012 ; 4(5) : online.
3. Vigarios E, Destruhaut F, Pomar P, Dichamp J, Toulouse E. la prothèse maxillo-faciale. Editions CdP, Memento 2015 ; 176p.
4. Vigarios E et al. Psychologie et relation d'aide en réhabilitation maxillo-faciale. EMC Stomatologie 2004 ; 22-066-B-53.
5. Genisa AE et al. Orofacial clefts in the national birth defects prevention study, 1994-2004. Am J Med Genet Part A 2009 ; 149A(6) : 1149-1158.
6. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. Clinical Genetics 2006 ; 69(6) : 512-7.
7. Gundlach KK, Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. J Craniomaxillofac Surg 2006 Sep;34 Suppl 2:1-2.
8. Ishorst N, Francheschelli P, Böhmer AC, FaicalM et al. Nonsyndromic cleft palate : an association study at GWAS candidate loci in a multiethnic sample. Birth Defect Res 2018 ; 110(10) : 871-882.
9. Birnbaum S, Ludwig KU, Teutter H, et al : Nature Genetics 2009 ; 41 : 473-477.
10. Carter CO. The inheritance of common congenital malformations. In: *Progress in medical genetics, vol. 4*. Grune & Stratton, New York-London 1965; 59-84.
11. De Mey A, Melevez C, Mansbach AL, George M. Prise en charge des fentes labio-maxillo-palatines à l'hôpital des enfants Reine Fabiola de Bruxelles: Ann Chir Plast Esthét 2002; 47: 134-137.
12. Couly G. Croissance craniofaciale du foetus et du jeune enfant. Encycl Méd Chir 2002; 22-001-A-30.
13. Veau V. Division Palatine: Anatomie, Chirurgie, Phonétique. Masson ed; 1931.
14. Kernahan DA. The striped Y--a symbolic classification for cleft lip and palate. Plast Reconstr Surg 1971 May;47(5):469-70.

- 15.Noirrit-Esclassan E, Pomar P, Esclassan R, Terrie B, Galinier P, Woisard V. Plaques palatines chez le nourrisson porteur de fente labiomaxillaire. EMC-Stomatologie 2005 ; 1 :60-79.
- 16.Ohngren LG. Malignant tumours of the maxilloethmoidal region : a clinical study with special reference to the treatment with electrosurgery and irradiation. Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh) 1933 ; 19 : 1-476.
- 17.Boutault F, Paoli JR, Lauwers F. Reconstruction chirurgicales des pertes de substance des maxillaires. EMC Stomatologie 2005 ; 22-087-E-10 : 18p.
- 18.Dieng L, Mbodj EB, Gueye M, Thioune N, Toure A, Seck MT, Toure SN, Nabhane E, Ndiaye C. Réhabilitation prothétique par un obturateur rigide d'une vascularite de Wegner à localisation maxillaire : rapport de cas. Rev Col Odonto-Stomatol Afr Chir Maxillo-Fac 2013 ; 20(2) : 59-66.
- 19.Raoul G, Maes JM, Pasquier D, Nicola J, Ferri J. Ostéoradionécrose des maxillaires (maxillaire et mandibule). EMC Médecine Buccale 2005 ; 22-062-D-20 ; 21p.
- 20.Haute Autorité de la Santé (H.A.S.) Guide ALD 30 « cancers des voies aérodigestives supérieures » (Novembre 2009) [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)
- 21.Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jougla E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzo, A, Bara S, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. Rev Épidémiologie Santé Publique 2008 ; 56 : 159–175.
- 22.Brown JS, Rogers SN, Mc Nally DN, Boyle M. A modified classification for maxillectomy defect. Head Neck 2000 ; 22 : 17-26.
- 23.Pavlov BL. Classification of mandibular defects. Stomatologia 1974 ; 54 (5): 43-46.
- 24.Bléry P, Corre P, Malard O, Sourice S, Pilet P, Amouriq Y, Guicheux J, Weiss P, Espitalier F. Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and fresh total bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold 2014 ; 25(12) :2711-20.
- 25.Le Bars P, Allavena C, Piot B, Giumelli B. Radiothérapie et réhabilitation maxillo-faciale. Act Odont Stomatol 2006 ; 234 : 191-210.
- 26.Giumelli B, Saade K, Le Bars P. Traitement prothétique des pertes de substance acquises des maxillaires en cancérologie. EMC (Editions Scientifiques et Médicales, Elsevier SAS, Paris) 2000 ; 23-393-A-10, 7p.

27. Maurice D, André O, Ravallec X, Lerouxel E, Ygitolu M, Augier MC. Odontologie et prise en charge des défauts maxillo-faciaux. *Cah Proth* 2002 ; 120 :17-25.
28. Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P : Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 2011; 21: 407-429.
29. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K : Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 2006 ; 24: 867-876.
30. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM : Implantation of recombinant human bone morphogenetic protein with biomaterial carriers : a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 2000 ; 50 : 227-38.
31. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA : The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2002 ; 84:1032-1044.
32. Riley EH, Lane J, Urist M, Lyons K, Lieberman J. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 1996 ; 324 : 39-46.
33. Chu TM, Warden SJ, Tumer CH, Rena LS. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2007 ; 28: 459-67.
34. Sciadini MF, Johnson KD : Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 2000 ; 18: 289-302.
35. LeGeros RZ : Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. rev* 2008 ; 108: 4742-4753.
36. Daculsi G, Miramond T, Borget P, Baroth S: Smart calcium phosphate bioceramic scaffold for bone tissue engineering. *Key Engineering Materials* 2013 ; 529-530: 19-23.
37. Goyenvalle E, Gauthier O, Bouler JM, Le Nihouannen JC, G. Daculsi G, Aguado E : "Intérêts et limites des céramiques phosphocalciques en chirurgie orthopédique vétérinaire. *Rev. Med. Vet* 2000 ; 151: 291-302.
38. Fatimi A, Axelos MAV, Tassin JF, Weiss P : Rheological characterisation of self-hardening hydrogel for tissue engineering applications : gel point determination and viscoelastic properties. *Biomaterials* 2008 ; 266 :12-16.
39. Minier K, Touré A, Fusellier M, Fella BH, Bouvy B, Weiss P, Gauthier O : BMP2 delivered from a self-cross-linkable CaP/hydrogel construct promotes bone regeneration in a critical-size segmental defect of non-union in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2014 ; 27 : 411-421.

40. Lee SH, Shin H: Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 339-359.
41. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M: Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials* 2008; 29:1207-1215.
42. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M: Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 2009; 31:1817-1824.
43. Allori AC, Sillon AM, Warren SM: Biological basis of bone formation, remodeling, and repair. Part II: Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2008; 14: 275-283.
44. Allori AC et al.: Biological basis of bone formation, remodeling, and repair. Part III: Biomechanical Forces. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2008; 14: 285-293.
45. Boerckel JD, Kolambkar YM, Stevens HY, Lin ASP, Dupont KM, Guldberg RE: Effects of in vivo mechanical loading on large bone defect regeneration. *J Orthop Res* 2012; 30:1067-1075.
46. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D: Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007; 38: 3-6.
47. Mont MA, Ragland PS, Biggins B, Friedlaender G et al.: Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. *J Bone Joint Surg* 2004; 86:41-55.
48. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenk JC, Hollinger JO: The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2010; 16: 123-145.
49. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ: Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:1367-1378.
50. Boden SD, Kang J, Sandhu HS, Heller JG: Use of rhBMP2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective randomized clinical trial. *Spine* 2002; 27: 2662-2673.
51. Fei Z, Hu Y, Wu D, Wu H et al.: Preparation and property of a novel bone graft composite consisting of rhBMP-2 loaded PLGA microspheres and calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19:1109–1116.
52. Liu J, Mao K, Liu Z, Wang X, Cui F, et al.: Injectable biocomposites for bone healing in rabbit femoral condyle defects. *PLoS ONE* 2013; 8(10): e75668. doi:10.1371/journal.pone.0075668.

53. Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P : Bone repair using a new injectable self cross-linkable bone substitute. *J Orthop Res* 2006 ; 24 : 628-635.
54. Struillou X, Boutigny H, Badran Z, Fellah BH, Gauthier O, Sourice S, Pilet P, Rouillon T, Layrolle P, Weiss P, Soueidan A : Treatment of periodontal defects in dogs using an injectable composite hydrogel / biphasic calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2011 ; 22 : 1707-17.
55. Seo BB, Koe JT, Song SC : Tuning physical properties and BMP2 release rates of injectable hydrogel systems for an optimal bone regeneration effects. *Biomaterials* 2017 ; 122 : 91-104.
56. Gauthier O, Bouler JM, Weis P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E : Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999 ; 47: 28-35.
57. Gauthier O, Müller R, Von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G : In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial : a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials* 2005 ; 26 : 5444-5453.
58. Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, Daculsi G, Giumelli B: The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials* 2007 ; 28: 3295-3305.
59. Gerber H, Ferrara N. Angiogenesis and bone growths. *Trends in cardiovascular Medicine* 2000 ; 10 : 223-228.
60. Robling A, Castillo A, Turner C. Biomechanical and molecular regulation of bone remodelling. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; 8(1): 455-498.
61. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27(3): 677-90.
62. Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2008 14(3): 259-73.
63. Cheng H, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 2003 ; 85-A(8): 1544-52.
64. Gerstenfeld LC, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 873-84.
65. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003 ; 8(21): 980-9.
66. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 2001 ; 29(6): 560-4.

67. Huang YC, et al. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2005 ; 20(5): 848-57.
68. Deckers MM, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002 ; 143(4): 1545-53.
69. Petite H. Tissue engineering of bone. *M S-Med Sci* 2002 ; 18(10) : 995-1002.
70. Berner A, Reichert JC, Muller MB, Zellner J, Pfeifer C, Dienstknecht T, et al. Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. *Cell Tissue Res* 2012 ; 347(3) : 501-19.
71. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J* 2016; 98-B(1 Suppl A):6-9.
72. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes : a review. *Indian J Med Res* 2010 ; 132 : 15-30.
73. Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon* 2012; 10(4): 230-9.
74. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 1999 ; 360 : 71-86.
75. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991;2(3):187-208.
76. Pederson WC, Person DW. Long bone reconstruction with vascularized bone grafts. *Orthop Clin North Am* 2007; 38(1): 23-35, v.
77. Tilley S, et al. Taking tissue-engineering principles into theater : augmentation of impacted allograft with human bone marrow stromal cells. *Regenerative Med* 2006 ; 1(5): 685-92.
78. Reynolds DG, et al.  $\mu$ CT-based measurement of cortical bone graft-to-host union. *J Bone Miner Res* 2009 ; 24(5): 899-907.
79. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-26.
80. Burwell RG. STUDIES IN THE TRANSPLANTATION OF BONE VII. The Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone An Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-containing Bone Grafts. *J Bone Joint Surg* 1964; 46- B(1) : 110-140.
81. Burkus JK, Dorchak JD, Sanders DL. Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. *Spine* 2003; 28(4): 372-7.
82. Singh K, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct in posterolateral lumbar spine fusion: a prospective CT-scan analysis at one and two years. *J Spinal disorders Tech* 2006; 19(6): 416-23.

83. Soucacos PN, Johnson EO, Babis G. An update on recent advances in bone regeneration. *Injury* 2008; 39 Suppl 2: S1-4.
84. Trommelmans, L, Selling J, Dierickx K. Ethical reflections on clinical trials with human tissue engineered products. *J Medical Ethics* 2008. 34(9): doi.org/10.1136/jme.2007.022913.
85. Hunziker E, et al. Translation from research to applications. *Tissue Engineering* 2006 ; 12(12): 3341-64.
86. Lysaght M, Jaklenec A, Deweerd E. Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. *Tissue Engineering Part A* 2008 ; 14(2): 305-315.
87. Lysaght M, Reyes J. The growth of tissue engineering. *Tissue Engineering* 2001; 7(5): 485-93.
88. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009; 30(30): 5897-909.
89. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury* 2011; 42(6): 609-13.
90. Ciapetti G, Granchi D, Baldini N. The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds scaffolds for bone repair. *Curr Pharm Des* 2012; 18(13): 1796-820.
91. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3:S20-7.
92. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2: S96-101.
93. LeGeros RZ, Daculsi G, et al. Bioactive bioceramics. *Musculoskeletal Tissue Regeneration* 2008 ; 153-181.
94. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury* 2011; 42(6): 569-73.
95. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2529-43.
96. Manassero M, Viateau V, Deschepper M, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H, et al. Bone regeneration in sheep using acropora coral, a natural resorbable scaffold, and autologous mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(13-14): 1554-63.
97. Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng* 2006; 12(5): 1261-73.
98. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8(4): 277-84.
99. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74(7): 1487-510.

100. Papadimitropoulos A, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Molinari E, Komlev VS, Rustichelli F, et al. Kinetics of in vivo bone deposition by bone marrow stromal cells within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: an X-ray computed microtomography study. *Biotechnol Bioeng* 2007; 98(1): 271-81.
101. Hernandez A, Sanchez E, Soriano I, Reyes R, Delgado A, Evora C. Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater* 2012; 8(2): 781-91.
102. Lapczynska H, Galea L, Wust S, Bohner M, Jerban S, Sweedy A, et al. Effect of grain size and microporosity on the in vivo behaviour of beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Eur Cell Mater* 2014; 28: 299-319.
103. Guillemain G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res* 1989; 23(7): 765-79.
104. Konermann A, Staubwasser M, Dirk C, Keilig L, Bourauel C, Gotz W, et al. Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43(4): 514-21.
105. Braye F, Irigaray JL, Jallot E, Oudadesse H, Weber G, Deschamps N, et al. Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* 1996; 17(13): 1345-50.
106. Komlev VS, Mastrogiacomo M, Pereira RC, Peyrin F, Rustichelli F, Cancedda R. Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model studied by X-ray computed microtomography. *Eur Cell Mater* 2010; 19: 136-46.
107. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40(5): 363-408.
108. Evans CH. Advances in regenerative orthopedics. *Mayo Clin Proc* 2013; 88(11): 1323-39.
109. David B, Bonnefont-Rousselot D, Oudina K, Degat MC, Deschepper M, Viateau V, et al. A perfusion bioreactor for engineering bone constructs: an in vitro and in vivo study. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(5): 505-16.
110. Berner A, Woodruff MA, Lam CX, Arafat MT, Saifzadeh S, Steck R, et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43(4): 506-13.
111. Wu YC, Lee TM, Chiu KH, Shaw SY, Yang CY. A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals

- based on the criteria for bone-tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(6): 1273-80.
112. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2006; 27(17): 3230-7.
  113. Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1990; 11: 86-7.
  114. Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C. Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 2015; 3: 202-17p.
  115. LeGeros R. Apatites in biological systems. *Prog Cryst Growth Charact* 1981; 4: 1-45.
  116. Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, et al. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 84(1): 1-6.
  117. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395:81-98.
  118. Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP2. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55:1613-29.
  119. Skoog T. The use of periosteum and Surgicel for bone restoration in congenital clefts of the maxilla. A clinical report and experimental investigation. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1967; 1(2): 113-30.
  120. Bohic S, Weiss P, Roger P, Daculsi G. Light scattering experiments on aqueous solutions of selected cellulose ethers: contribution to the study of polymer–mineral interactions in a new injectable biomaterial. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12(3): 201-5.
  121. Crini G, Badot PM, Guibal E. Chitine et chitosane : du biopolymère à l'application. Presses Universitaires Franche-Comté. Université Franche-Comté, 2009. 308p.
  122. Jull AB, Ni Mhurchu C, Bennett DA, Dunshea-Mooij CA, Rodgers A. Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (3):CD003892.
  123. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005 ; 26(30): 5983-90.
  124. Eppley BL, Morales L, Wood R, Pensler J, Goldstein J, Havlik RJ, et al. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: clinical experience in 1883 patients. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114(4): 850-6.

125. Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD, Yao Z, Stiehler M, Goodman SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *Bio Drugs* 2012; 26(4): 245-56.
126. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474-91.
127. Mistry AS, Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 94: 1-22.
128. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344(5): 385-6.
129. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13(5): 947-55.
130. Kellomaki M, Niiranen H, Puumanen K, Ashammakhi N, Waris T, Tormala P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2495-505.
131. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71(6): 354-61.
132. Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 1999; 25(2 Suppl): 5S-9.
133. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993; 14(1): 65-88.
134. Arinzech TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* 2005; 26(17): 3631-8.
135. Lobo SE, Arinzech TL. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials* 2010; 3:815-26.
136. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998; 19(16): 1473-8.
137. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1989; 23(8): 883-94.
138. Fellah BH, Layrolle P. Sol-gel synthesis and characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity. *Acta Biomaterialia* 2009 ; 5(2): 735-742.

139. Lobo SE, et al. Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. *Cell Tissue Res* 2015; 361(2): 477-95.
140. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 1973; 7(3): 25-42.
141. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface : a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998; 40(1): 1-11.
142. Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang KH, Kim SK. Alginate composites for bone tissue engineering : a review. *Int J Biol Macromol* 2015; 72: 269-81.
143. Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for bone regenerative engineering. *Adv Healthcare Mater* 2015 ; 4(9) : 1268-85.
144. Verrier S, Alini M, Alsberg E, Buchman SR, Kelly D, Laschke MW, et al. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. *Eur Cell Mater* 2016; 32: 87-110.
145. Woodruff M, Lange C, Reichert J, Berner A, Fratzl P, Schantz J, et al. Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Mater today* 2012; 15(10): 430-5.
146. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007; 28(29): 4240-50.
147. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and / or stem cells. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S77-81.
148. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Bigham-Sadegh A. Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *Biofactors* 2014; 40(5): 459-81.
149. Vukicevic S, Sampath K. Bone morphogenetic proteins: from local to systemic therapeutics. Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Verlag AG; 2008.
150. Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures. *Biologics* 2008; 2(3): 345-54.
151. Yu YY, Lieu S, Lu C, Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* 2010; 47(1): 65-73.
152. Evans CH. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(12) : 1331-40.
153. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (355 Suppl): S116-23.

154. Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (355 Suppl): S274-82.
155. Oest ME, et al. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res* 2007; 25(7): 941-50.
156. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2002 ; 84(6): 1032-44.
157. Mahendra A, Maclean AD. Available biological treatments for complex non-unions. *Injury* 2007; 38(Suppl4): S7-12.
158. Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Injury* 2005; 36(Suppl3): S28-33.
159. Van Der Stok et al. Full regeneration of segmental bone defects using porous titanium implants loaded with BMP-2 containing fibrin gels. *Eur Cells Mater* 2015; 29: 141-54.
160. Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009; 40(Suppl 3): S4-7.
161. Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 2009; 40(Suppl3): S1-3.
162. Pneumaticos SG, Triantafyllopoulos GK, Basdra EK, Papavassiliou AG. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J Cell Mol Med* 2010; 14(11): 2561-9.
163. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res* 2015; 3:150-05.
164. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4): 233-41.
165. Kim RY, Oh JH, Lee BS, Seo YK, Hwang SJ, Kim IS. The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption. *Biomaterials* 2014; 35(6): 1869-81.
166. Freyria AM, Courtes S, Mallein-Gerin F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2. *Patho Biol*2008; 56(5): 326-33.
167. Gohil SV, Kuo CL, Adams DJ, Maye P, Rowe DW, Nair LS. Evaluation of the donor cell contribution in rhBMP-2 mediated bone formation with chitosan thermogels using fluorescent protein reporter mice. *J Biomed Mater Res* 2016; 104(4): 928-41.

168. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16(3): 247-52.
169. Bagaria V. Bone morphogenetic protein: current state of field and the road ahead. *J Orthopaedics* 2005; 2(4):e3.
170. Blokhuis TJ, den Boer FC, Bramer JA, Jenne JM, Bakker FC, Patka P, et al. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials* 2001; 22(7): 725-30.
171. Yu YY, Lieu S, Lu C, Miclau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors and effectors during fracture repair. *Bone* 2010; 46(3): 841-51.
172. Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007; 25(5): 665-77.
173. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85(8): 1425-35.
174. Pountos I, Panteli M, Panagiotopoulos E, Jones E, Giannoudis PV. Can we enhance fracture vascularity: What is the evidence? *Injury* 2014; 45(Suppl2): S49-57.
175. Huang RL, Yuan Y, Tu J, Zou GM, Li Q. Exaggerated inflammatory environment decreases BMP-2/ACS-induced ectopic bone mass in a rat model: implications for clinical use of BMP-2. *Osteoarthritis Cartilage* 2014; 22(8): 1186-96.
176. Cowan CM, Aalami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment and bone turnover. *Tissue Eng* 2005; 11(3-4): 645-58.
177. Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; 27(4): 479-86.
178. Blokhuis TJ. Formulations and delivery vehicles for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions. *Injury* 2009; 40(Suppl3): S8-11.
179. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* 2001; 19(7): 255-65.
180. Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury* 2009; 40(Suppl3): S67-76.

181. Yuan H, De Bruijn JD, Zhang X, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12(9): 761-6.
182. Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury* 2008; 39(Suppl2): S37-43.
183. Agrawal V, Sinha M. A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2017; 105(4): 904-25.
184. Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Boure L, Tami A, Anderson JM, et al. Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect. *J Biomed Mater Res Part A* 2011; 96(1): 66-74.
185. Den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. 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): 521-28.
186. Mehrkens A, Saxer F, Guven S, Hoffmann W, Muller AM, Jakob M, et al. Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 308-19.
187. Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, Wentzensen A, Moghaddam A. Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury* 2009; 40(Suppl3): S50-3.
188. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81(4): 710-18.
189. Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience. *Injury* 2008; 39(Suppl2): S83-90.
190. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, et al. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury* 2009; 40(Suppl3): S53-61.
191. Friedlaender GE. OP-1 clinical studies. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2):S160-1.
192. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial non-unions. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
193. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, 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): 2123-34.
194. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (Infuse Bone Graft). *Int Orthopaedics* 2007; 31(6): 729-34.
  195. Corinaldesi G, Piersanti L, Piattelli A, Iezzi G, Pieri F, Marchetti C. Augmentation of the floor of the maxillary sinus with recombinant human bone morphogenetic protein-7: a pilot radiological and histological study in humans. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012; 51(3): 247-252.
  196. Furth ME, Atala A, et al. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007; 28(34): 5068-73.
  197. Dickinson BP, Ashley RK, Wasson KL, et al. Reduced morbidity and improved healing with bone morphogenic protein-2 in older patients with alveolar cleft defects. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(1): 209-17.
  198. Alonso N, Risso G, Denadai R, Raposo-Amaral C. Effect of maxillary alveolar reconstruction on nasal symmetry of cleft lip and palate patients: A study comparing iliac crest bone graft and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Plast Reconstr Aesth Surg* 2014; 67(9): 1201-08.
  199. Allareddy V. Use of human recombinant bone morphogenetic protein is associated with increased hospital charges in children with cleft lip and palate having bone graft procedures. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72(12): 2531-38.
  200. Chenard KE, Teven CM, He TC, Reid RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. *J Biomed Biotech* 2012; 14p. doi:10.1155/2012/601549.
  201. Sweeny L, Lancaster WP, Dean NR, et al. Use of recombinant bone morphogenetic protein 2 in free Flapreconstruction for osteonecrosis of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70(8): 1991-96.
  202. Sándor GK, et al. Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard tissue defects. *Stem Cell Translat Med* 2014; 3(4): 530-40.
  203. Poon B, Kha T, Tran S, Dass CR. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68(2): 139-47.
  204. Nauth A, Ristiniemi J, McKee MD, Schemitsch EH. Bone morphogenetic proteins in open fractures: past, present, and future. *Injury* 2009; 40(Suppl3):S27-31.

205. Woo EJ. Adverse events reported after the use of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70(4): 765-7.
206. Stiel N, Hissnauer TN, Rupprecht M et al. Evaluation of complications associated with off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in pediatric orthopaedics. *J Mater Sci: Mater Med* 2016; 27:184. DOI 10.1007/s10856-016-5800-8.
207. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(9-10): 1389-99.
208. Boraiah S, Paul O, Hawkes D, Wickham M, Lorich DG. Complications of recombinant human BMP-2 for treating complex tibial plateau fractures: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467(12): 3257-62.
209. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011; 11(6):471-91.
210. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 2016 ; 22(4). doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0357
211. Hughes AP, Taher F, Farshad M, Aichmair A. Multiple myeloma exacerbation following utilization of bone morphogenetic protein-2 in lateral lumbar interbody fusion: a case report and review of the literature. *Spine J* 2013; 14(4): 9.
212. Kelly MP, Savage JW, Bentzen SM, Hsu WK, Ellison SA, Anderson PA. Cancer risk from bone morphogenetic protein exposure in spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg* 2014; 96(17): 1417-22.
213. Whitfield JF. How to grow bone to treat osteoporosis and mend fractures. *Current rheumatology reports* 2003; 5(1): 45-56.
214. Arpornmaeklong P, Kochel M, et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro / in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 60-70.
215. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 2003; 21(5): 610-19.
216. Barradas AMC et al. Molecular mechanisms of biomaterial-driven osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells. *Integr Biol* 2013; 5: 920-31.

217. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3): 381-90.
218. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *Int Orthop* 2015; 39(4): 807-17.
219. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116(5): 639-48.
220. Halme DG, Kessler DA. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *New Eng J Med* 2006; 355(16): 1730-35.
221. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials* 2008; 29(21): 3053-61.
222. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004; 364(9436):766-70.
223. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis : a preliminary result of three cases. *Bone* 2004; 35(4): 892-8.
224. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001; 344(5): 385-6.
225. Daculsi G. Association of cells and biomaterials for bone regeneration. *Ingénierie et recherche biomédicale*. 2011; (32): 76-9.
226. Helm GA, Dayoub H, Jane JA Jr. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus* 2001;10(4):E4.
227. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; 18(2): 187-96.
228. Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. *J Trauma* 2006; 60(6): 1322-9.
229. Al Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(1): 105-14.
230. Barboza EP. Clinical and histologic evaluation of the demineralized freeze-dried bone membrane used for ridge augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 19(6): 601-7.

231. Evans CH. Barriers to the clinical translation of orthopedic tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17(6): 437-41.
232. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16(2): 155-62.
233. Kruyt MC, Stijns MM, Fedorovich NE, De Bruijn JD, et al. Genetic marking with the DeltaLNGFR-gene for tracing goat cells in bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2004; 22(4): 697-702.
234. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, et al. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *J Orthop Res* 2004; 22(3): 544-51.
235. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18(9): 959-63.
236. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 2003; 21(5): 610-19.
237. Corre P, Merceron C, Longis, Khonsari RH, Pilet P, et al. Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects: a preclinical study. *Acta Biomaterialia* 2015; 26: 306-17.
238. Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area : a dog study. *Bone* 2005 ; 36 : 323-30.
239. Corre P, Merceron C, Vignes C, Sourice S, Masson M, Durand N, et al. Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an “all-in-one” study in nude mice. *PLoS ONE* 2013; 8(12): e81599. doi.org/10.1371/journal.pone.0081599.
240. Ohba S, Yano F, Chung U. Tissue Engineering of Bone and Cartilage. *IBMS BoneKEy* 2009; 6(11): 405-19.
241. Boden SD. The ABCs of BMPs. *Orthop Nurs* 2005; 24(1): 49-52.
242. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C. Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. *Int J Pharm* 1999; 187(1): 91-99.
243. Trojani C, Boukhechba F, Scimeca JC, Vandebos F, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006; 27: 3256-64.
244. Lin H, Zhao Y, Sun W, Chen B, Zhang J, et al. The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein2. *Biomaterials* 2008; 29(9): 1189-97.

245. Patel ZS, Yamamoto M, Ueda H, Tabata Y, Mikos AG. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia* 2008; 4(5): 1126-38.
246. von Walter M, Herren C, Gensior T, Steffens GCM, et al. Biomimetic modification of the TiO<sub>2</sub>/glass composite Ecopore with heparinized collagen and the osteoinductive factor BMP-2. *Acta Biomaterialia* 2008; 4(4): 997-1004.
247. Visser R, Arrabal PM, Becerra J, Rinas U, Cifuentes M. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials* 2009; 30(11): 2032-37.
248. Kempen D, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, et al. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(22): 3245-52.
249. Hosseinkhani H, Yamamoto M, Inatsugu Y, et al. Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials* 2006; 27(8): 1387-98.
250. Jeon O, Song SJ, Kang SW, et al. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly (L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 2007; 28(17): 2763-71.
251. Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clinic Cases Mineral Bone Metabolism* 2013; 10(3): 155-61.
252. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24(2): 218-35.
253. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, et al. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70(1): 115-21.
254. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(2): 197-208.
255. Engstrand T, Veltheim R, Arnander C, Docherty-Skog AC, et al. A novel biodegradable delivery system for bone morphogenetic protein-2. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121: 1920-28.
256. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 2003; 77: 626-31.
257. Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. *An*

- experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 181-90.
258. Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, Fu E, Turek TJ, et al. Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996; 16: 524-37.
259. Mayer M, Hollinger J, Ron E, Wozney J. Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98:247-59.
260. Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, et al. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 451-58.
261. Saito N, Murakami N, Takahashi J, et al. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:1037-48.
262. Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid—an experimental study in rats. *Biomaterials* 2008; 29: 103-10.
263. Nie H, Soh BW, Fu YC, Wang CH. Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery. *Biotechnol Bioeng* 2008; 99(1): 223-34.
264. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 2012; 30(10): 546-54.
265. Guzmán R, Nardecchia S, Gutiérrez MC, Ferrer ML, Ramos V, et al. Chitosan scaffolds containing calcium phosphate salts and rhBMP-2: in vitro and in vivo testing for bone tissue regeneration. *PLoS One* 2014; 9(2): e87149.
266. Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials*. 2007; 28(7): 1376-84.
267. Villa MM, Wang L, Rowe DW, Wei M. Effects of cell-attachment and extracellular matrix on bone formation in vivo in collagen hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One* 2014; 9(10): e109568.
268. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J* 2013; 49: 780-92.
269. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Mar Drugs* 2010; 8: 2252-66.

270. Cheng NC, Lin WJ, Ling TY, Young TH. Sustained release of adipose-derived stem cells by thermosensitive chitosan/gelatin hydrogel for therapeutic angiogenesis. *Acta Biomaterialia* 2017; 51: 258-67.
271. Jamal A, Shahzadi L, Ahtzaz S, Zahid S, et al. Identification of anti-cancer potential of doxazocin: loading into chitosan based biodegradable hydrogels for on-site delivery to treat cervical cancer. *Mater Sci Eng Part C* 2018; 82: 102-9.
272. Kim S, Tsao H, Kang Y, Young DA, Sen M, Wenke JC, Yang Y. In vitro evaluation of an injectable chitosan gel for sustained local delivery of BMP-2 for osteoblastic differentiation. *J Biomed Mater Res Part B Applied Biomaterials* 2011; 99(2): 380-90.
273. Stephan SJ, Tholpady SS, Gross B, Petrie-Aronin CE, Botchway EA, et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *The Laryngoscope* 2010 ; 120(5) : 895-901.
274. Pomar P, Dichamp J. Introduction à la prothèse maxillo-faciale. *EMC Stomatologie* 2004; 22-066-8-50.
275. Pomar P, Soulet H. Empreinte fragmentée : contribution à la réhabilitation prothétique de l'édenté total après maxillectomie. *Actual Odonoto Stomatol* 1995; 191: 443-7.

## Annexes

### Etude in vitro

Les matériaux utilisés sont des céramiques phosphocalciques biphasées (BCP) et des hydrogels d'HPMC-Si. Les BCP sont des granules de phosphate de calcium biphasés macro- et micro-poreux (MBCP+™, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France). Le diamètre des granules est compris entre 250 et 500  $\mu\text{m}$ , ils sont constitués de 20 % d'hydroxyapatite et de 80 % de  $\beta$ -TCP (phosphate tricalcique  $\beta$ ). Ces granules sont utilisés pour leurs propriétés d'ostéoconduction et d'ostéointégration. Les granules sont conditionnés dans des tubes « eppendorf » puis stérilisés à l'autoclave.

Les hydrogels d'HPMC-Si sont des matrices synthétiques constitués d'un réseau de polymères hydrophiles réticulés et formant des réseaux tridimensionnels insolubles. Leurs propriétés rhéologiques, leur biocompatibilité et l'absence de toxicité in vitro, de même que leur biofonctionnalité ont permis de les utiliser comme matrice synthétique en ingénierie tissulaire du cartilage in vivo (Vinatier et al 2007).

La BMP2 utilisée est la Dibotermine alpha (rhBMP2). La dibotermine alpha (Protéine-2 ostéogénique humaine recombinante; rhBMP-2) est une protéine humaine dérivée d'une lignée cellulaire recombinante d'Ovaire de Hamster Chinois (CHO). Un flacon de lyophilisat contient 0,66 mg de poudre pour suspension.

Pour déterminer le profil de libération de molécules encapsulées dans les réseaux de l'HPMC-Si, nous avons utilisé le glucose comme molécule biologique test. Le relargage de BMP2 a été testé également.

### Dosage du glucose par DNS et de la BMP2 par Elisa.

Le glucose est un aldohexose, principal représentant des oses. Transporté par la circulation sanguine, il est la principale source d'énergie pour les cellules de l'organisme.

Principe : on utilise les propriétés réductrices du glucose. A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction du DNS (acide 3, 5 dinitrosalicylique) ; le DNS jouant le rôle d'oxydant et le glucose étant le réducteur. L'absorbance du DNS oxydé est lue à 540 nm sur un spectrophotomètre. Le DNS n'ayant pas réagi ne se voit pas à cette longueur d'onde. La quantité de DNS oxydée est proportionnelle à la quantité de glucose réduite.

La BMP2 utilisée est la Dibotermine alpha (rhBMP-2) sous forme de lyophilisat de 0,66 mg. Après reconstitution, la concentration de BMP2 est de 200µg/mL. Le dosage se fait test Elisa à 450 nm au lecteur de plaque Victor.

Mode opératoire :

Matériels de mesure ; Réactifs :

- ✓ Spectrophotomètre UV-visible ;
- ✓ Cuves UV-visibles de 1.5 mL ;
- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Bain marie ;
- ✓ Plaque chauffante ;
- ✓ Etuve à 37° ;
- ✓ Réactifs au DNS :
  - 1 g DNS dissipé dans 40 mL d'eau distillée ;
  - 1.6 g NaOH dissout dans 30 mL d'eau distillée ;
  - 30 g de tartrate double de sodium et de potassium ;
  - Volume ajusté à 100 mL.
- ✓ Solution de glucose à 0.005 mol.L<sup>-1</sup> ;
- ✓ HPMC-Si à 2 %
- ✓ BCP ;
- ✓ PBS (Phosphate Buffered Saline);
- ✓ Plaques de culture (12 puits et 24 puits).

- Lyophilisat de BMP2 : 0,66 mg
- Solvant 3.2 mL
- Solution de rhBMP2 reconstituée : 200 µg / mL (TruScient)
- 1mL rhBMP2 + 11.5 mL H<sub>2</sub>O → 12.5 mL BMP2 à 16 µg/mL
- HPMC-Si 4% (pH 12.8)
- Tampon B (pH 3.6)
- NaOH : 0.09M
- BMP2 Quantikine Elisa kit.

Etablissement des courbes d'étalonnage du glucose

Préparation d'une solution standard de glucose de 2160 mg.L<sup>-1</sup>. A partir de celle-ci, on établit des concentrations connues de glucose à mesurer :

Tableau: étalonnage du glucose

Tubes à essai	0	1	2	3	4
Volume d'étalon glucose 2160mg.L <sup>-1</sup> (ml)	0	0.05	0.1	0.15	0.2
H <sub>2</sub> O (mL)	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3
DNS (mL)	1	1	1	1	1
Quantité de glucose (mg)	0	108	216	324	432

Tracer la courbe d'étalonnage  $f([\text{glucose}]) = A_{540}$  ;

Donner l'équation de la droite et le coefficient de régression linéaire.

#### 2.3.2.5.1. Préparation et dosage des échantillons à analyser

→ Hydrogel d'HPMC-Si à 2 % = 4.8 mL

Gel P240 KG 3 % = 3.2 mL

Tampon B (Hepes) = 1.6 mL

→ Glucose à 125 g/L = 0.2 mL

↔ HPMC-Si glucosé = 5 ml (à 25 g/L).

Répartition de l'HPMC-Si glucosé dans des plaques de culture de 12 puits :  
1 mL HPMC-Si + Glucose (5g/L) par puits ;

+ 3 mL H<sub>2</sub>O.

→ Dosages dynamiques :

Deux surnageants (H<sub>2</sub>O ou PBS) sont utilisés :

Après 24 heures, le surnageant (3 mL H<sub>2</sub>O ou PBS) est prélevé chaque jour pour être dosé (et ensuite renouvelé). Dosages à J1 ; J2 ; J3 ; ... J<sub>x</sub>.

→ Préparation du HPMC-Si + BMP2 :

HPMC-Si 4% (2 mL) + Tampon B (1 mL) + BMP2 à 16 µg/mL (1 mL) :

↔ 4 mL [HPMC-Si + BMP2 (4 µg/mL)] (2/1+1, v/v)

→ Libération à 37°

1 mL [HPMC-Si + BMP2 (4 µg/mL)] + 3 mL H<sub>2</sub>O / PBS

Prélèvement et renouvellement du surnageant (eau et/ou PBS) chaque jour.  
Congélation à -20°C du surnageant prélevé de J1 à J30.

→ TruScient reconstitué : 200 µg/mL

→ 1 mL BMP2 + 49 mL H<sub>2</sub>O ↔ 50 mL BMP2 à 4 µg/mL

❖ 2.5 mL BMP2 + 7.5 mL = 10 mL

❖ 2.5 mL BMP2 + 7.5 mL PBS = 10 mL

❖ 2.5 mL BMP2 + 2.5 mL Tampon B + 5 mL NaOH = 10mL

→ Dosage : Elisa à 450 nm au lecteur de plaque Victor.

Le dosage de BMP2 mesurée selon les milieux, prélevés à 37° à différents temps (J0, J3, J7, J10) puis congelés à (-20°), est effectué au 11<sup>ème</sup> jour. A J11, les milieux sont prélevés et dosés immédiatement sans congélation.

#### Propriétés rhéologiques de l'HPMC-Si:

Une étude comparative des propriétés viscoélastiques de l'HPMC-Si avec ou sans glucose, et / ou BMP2 est effectuée à l'aide du viscoanalyseur dynamique (DMA Wintest 4.0) qui enregistre les contraintes subies par le spécimen en compression. Le module de conservation (ou module élastique E') a été déterminé à la fréquence de 1Hz.

Plaque de 12 puits : → 5 mL HPMC-Si 2% : 1 mL/puits ;

→ 5 mL HPMC-Si + Glucose 5g/L : 1 mL/puits ;

→ 5 mL HPMC-Si + BMP2 : 1mL/puits.

15 jours après la réticulation des hydrogels, les échantillons sont analysés par DMA (analyse mécanique dynamique).

#### STERILISATION DU GLUCOSE INCORPORE DANS L'HPMC-SI :

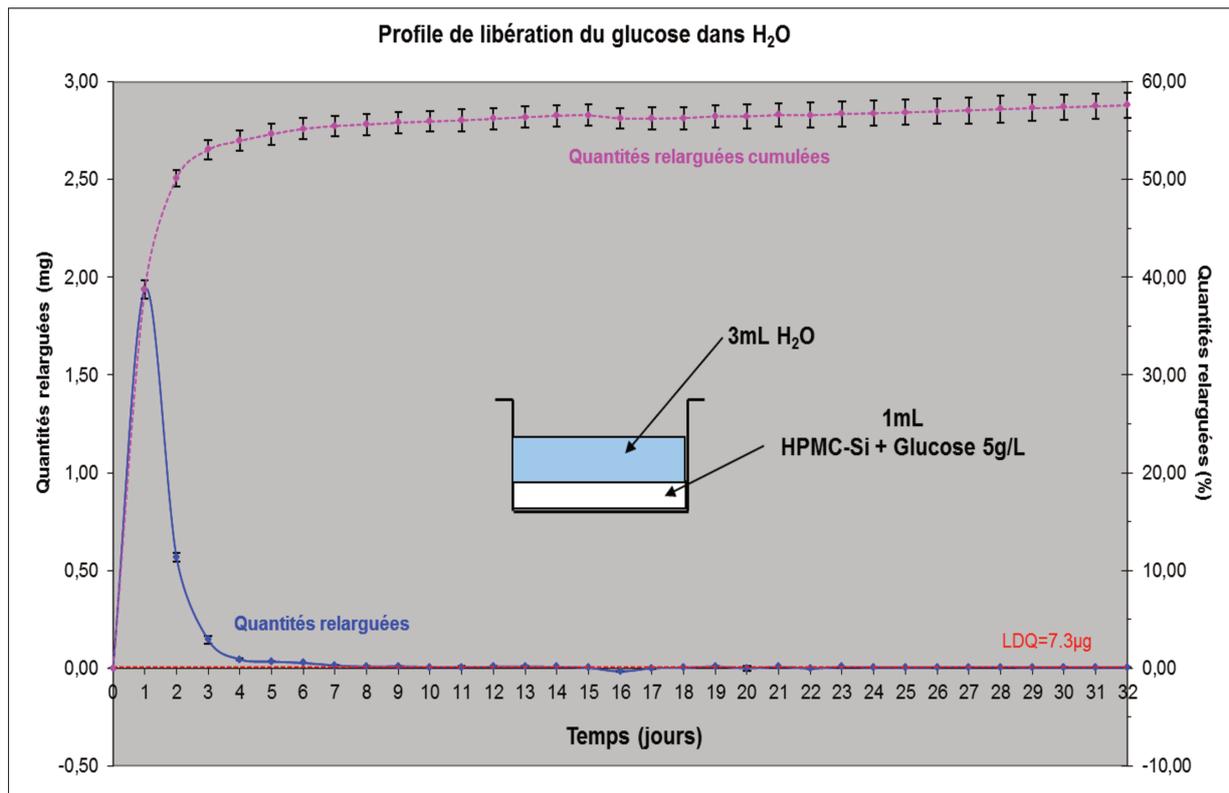
Dans le but de limiter la prolifération de micro-organismes (sur une longue durée), du glucose a été stérilisé à l'autoclave avant d'être incorporé à l'HPMC-Si.

L'analyse dynamique comparative de HPMC-Si + Glucose stérilisé et HPMC-Si + Glucose non stérilisé a été effectuée.

Un test en contrainte de cisaillement a été effectué aussi à l'aide du rhéomètre MARS (Modular Advanced Rheometer System). Le module élastique en cisaillement  $G'$  a été évalué pour l'HPMC-Si à 2% et pour l'HPMC-Si + Glucose 5 g/L, HPMC-Si + BMP2 4 $\mu$ g/mL.

## RESULTATS PRELIMINAIRES

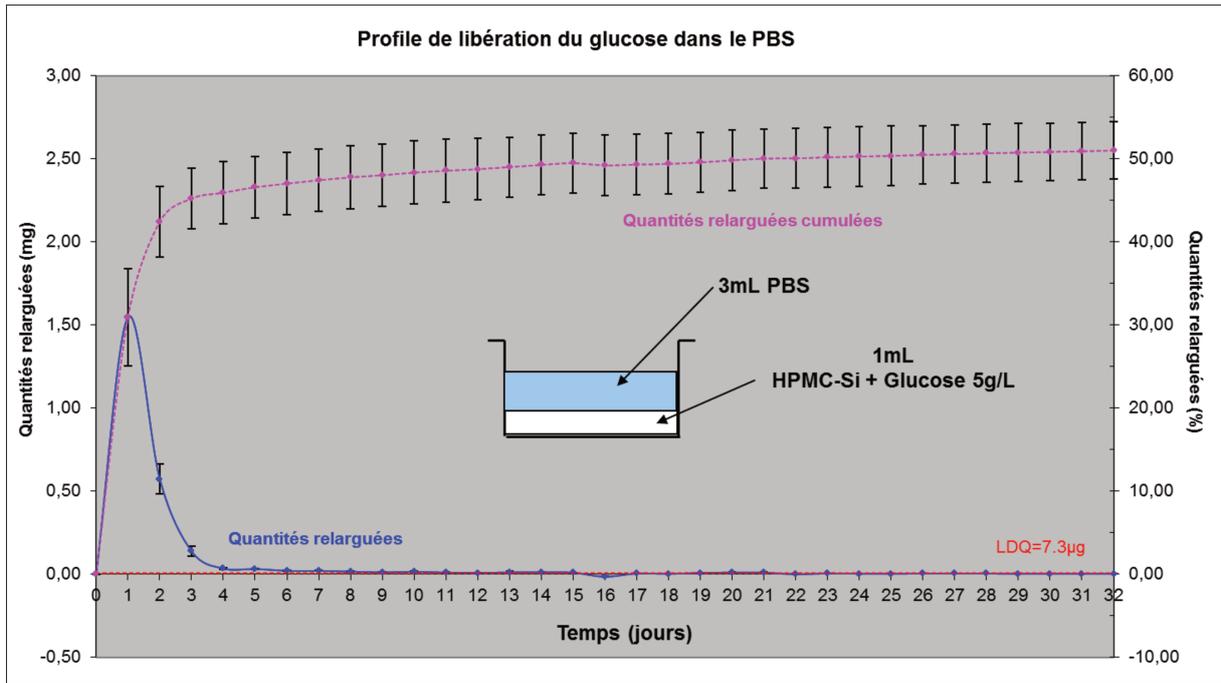
### Dosage dynamique



**Libération dans H<sub>2</sub>O = 58 % à J 32**

*Figure 1: Profil de libération du glucose dans l'eau*

- *Bleu : quantité de glucose relarguée dans H<sub>2</sub>O par 24H.*
- *Rouge : quantité cumulée de glucose relarguée dans H<sub>2</sub>O.*



**Libération dans le PBS = 53 % à J32**

Figure 2: Profil de libération du glucose dans le PBS

- *Bleu* : quantité de glucose relarguée dans le PBS par 24H.
- *Rouge* : quantité cumulée de glucose relarguée dans le PBS.

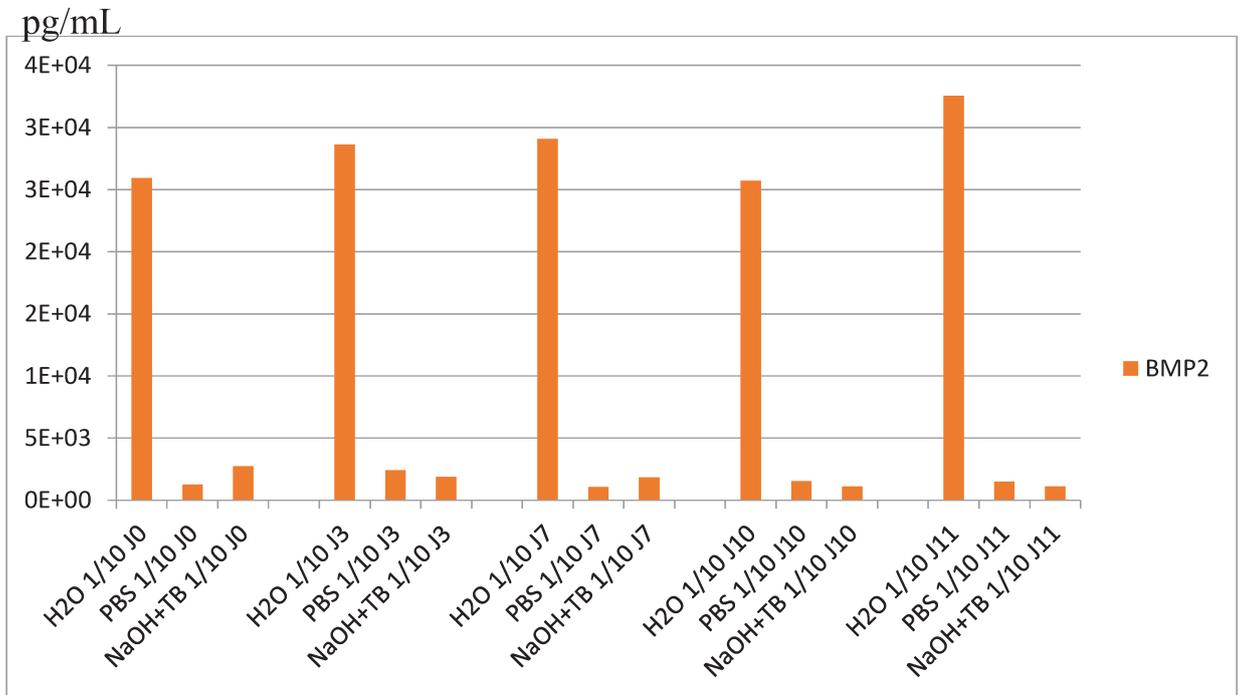
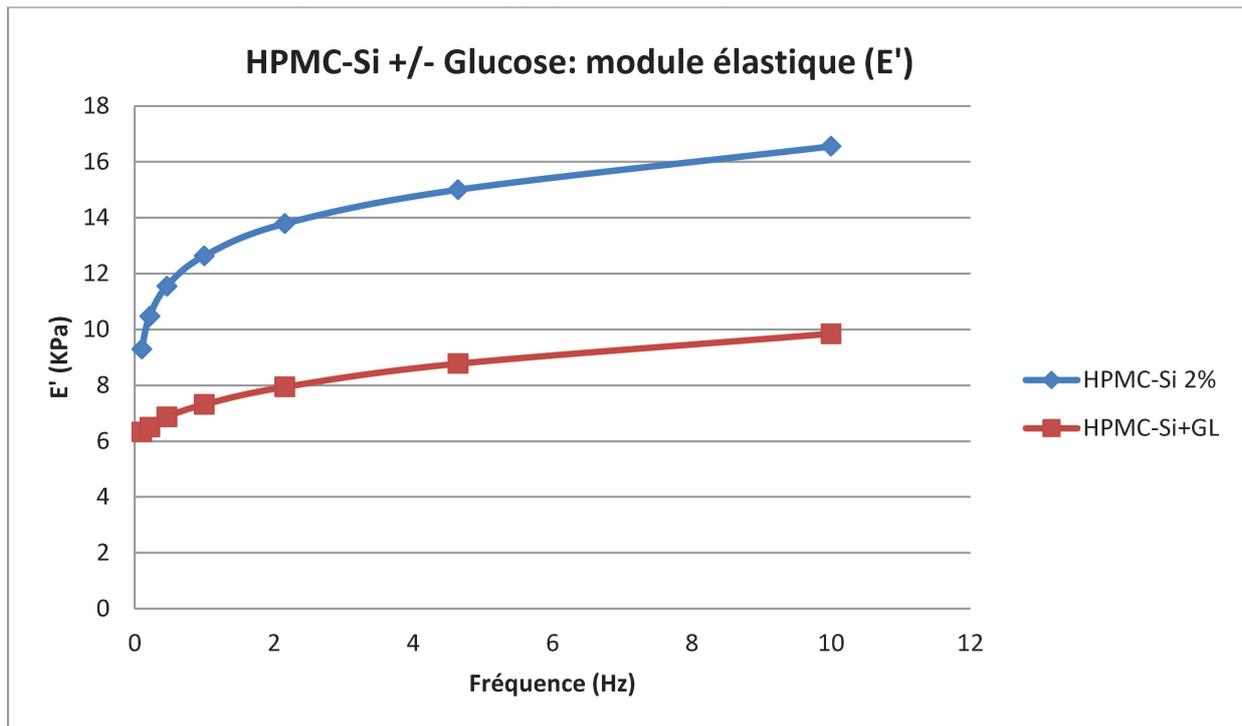


Figure 3 : profil de libération de la BMP2 en fonction des milieux utilisés  
BMP2 libérée < 2,8 % de la quantité initiale

Propriétés rhéologiques en compression: DMA de l'HPMC-Si:



**Module élastique HPMC-Si > HPMC-Si + Glucose (1Hz: 13KPa > 7KPa)**

Figure 4: module élastique (E') de l'HPMC-Si avec ou sans glucose

Propriétés rhéologiques en cisaillement (G') de l'HPMC-Si

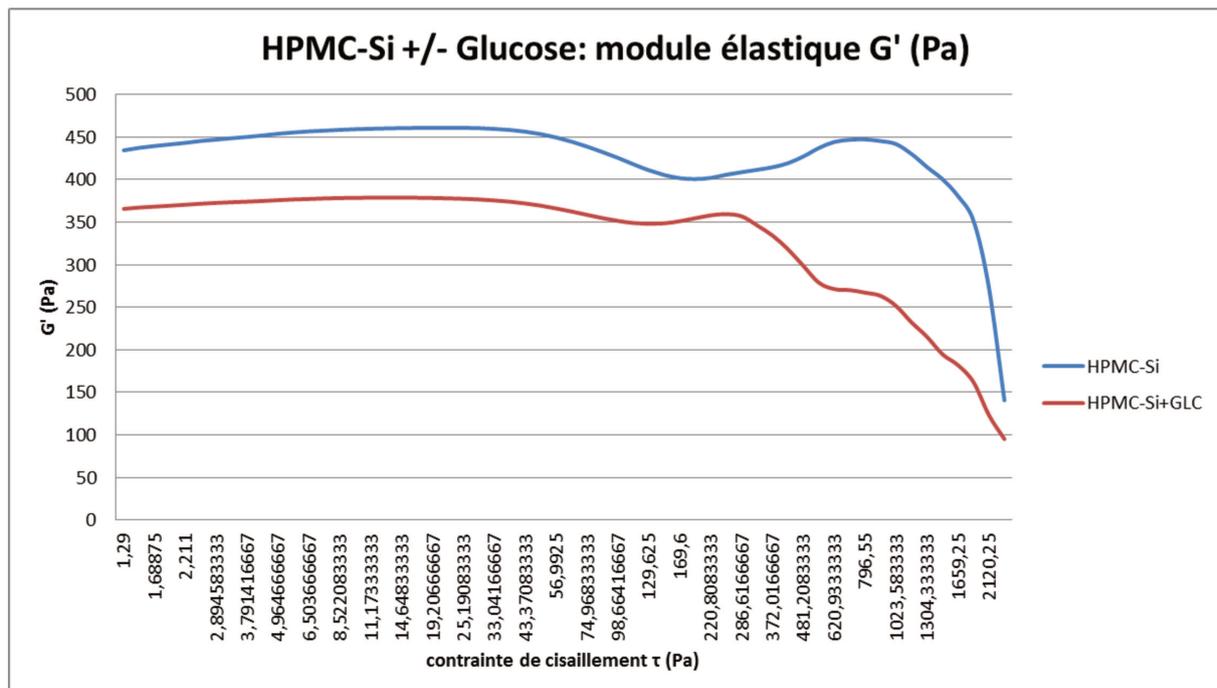
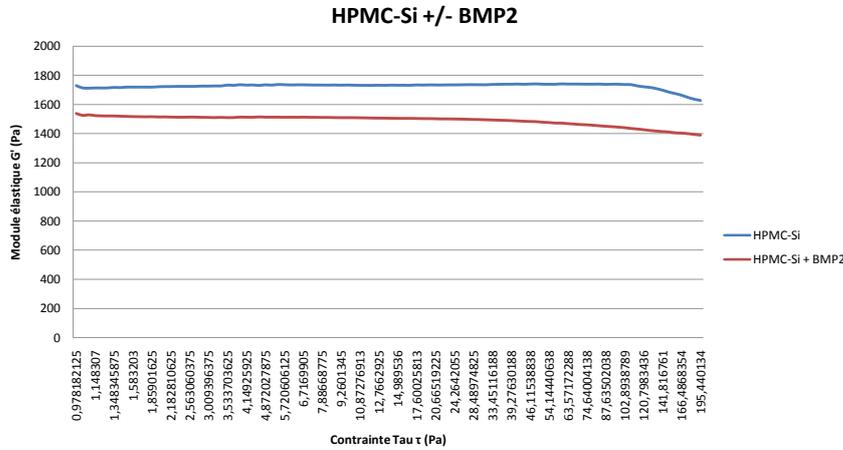


Figure 5: module élastique G' HPMC-Si > HPMC-Si + Glucose

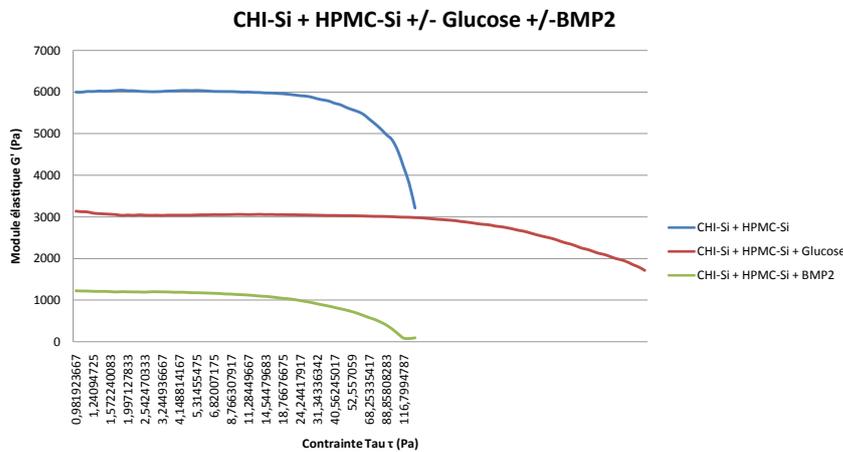
## Test de cisaillement: HPMC-Si avec/sans BMP2



Module élastique  $G'$ : HPMC-Si > HPMC-Si + BMP2

Figure 6 : test de cisaillement de l'HPMC-Si chargé ou non de BMP2

## Test de cisaillement: CHI-Si + HPMC-Si avec/sans Glucose; avec/sans BMP2



Module élastique  $G'$ : CHI-Si + HPMC-Si > CHI-Si + HPMC-Si + Glucose > CHI-Si + HPMC-Si + BMP2

Figure 7 : test mécanique du mélange CHI-Si + HPMC-Si chargé ou non de glucose ou de BMP2

Le profil de libération progressif du glucose après encapsulation et le comportement rhéologique des matrices chargées laissent suggérer des interactions entre les molécules encapsulées et les réseaux de l'hydrogel d'HPMC-Si.

Cependant, l'HPMC-Si chargé de glucose a montré une libération progressive de l'ordre de 58 % et 53 % après 32 jours dans l'H<sub>2</sub>O et le PBS respectivement.

La BMP2 libérée, de l'ordre de 1 à 2.8 %, est nettement inférieure à la BMP2 reconstituée. Le relargage est plus important dans l'eau (2.8 %) par rapport aux autres milieux testés (1 %). Il n'a pas été noté de différence significative liée au pH, à la congélation, au temps de contact entre le facteur de croissance et le tampon acide.



# BMP-2 delivered from a self-cross-linkable CaP/hydrogel construct promotes bone regeneration in a critical-size segmental defect model of non-union in dogs

K. Minier<sup>1,3</sup>; A. Touré<sup>2</sup>; M. Fusellier<sup>1,2</sup>; B. Fellah<sup>1</sup>; B. Bouvy<sup>3</sup>; P. Weiss<sup>2</sup>; O. Gauthier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Small Animal Surgery, Oniris College of Veterinary Medicine, Nantes, France; <sup>2</sup>University of Nantes, INSERM, UMR 791, LIOAD, Nantes, France; <sup>3</sup>Centre Hospitalier Veterinaire Fregis, Arcueil, France

## Keywords

Recombinant human bone morphogenetic protein, BMP-2, calcium phosphate hydrogel, bone union, critical sized defect, dog

## Summary

**Objectives:** To determine whether the addition of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) to a self-crosslinkable cellulosic hydrogel/biphasic calcium phosphate (BCP) granules construct promotes bone healing in critical-size ulnar defects in dogs.

**Methods:** A standardized 2 cm long ulnar osteotomy was performed bilaterally in five dogs to compare bone healing with hydrogel/BCP constructs associated with or without rhBMP-2. Cancellous-bone autografts were used as positive controls in unilateral ulnar defects in five additional dogs. Radiographically, bone healing was evaluated at four, eight, 12, 16 and 20 weeks postoperatively. Histological qualitative analysis with microCT imaging and light and scanning

electron microscopy were performed 20 weeks after implantation.

**Results:** All rhBMP-2-loaded constructs induced the formation of well-differentiated mineralized lamellar bone surrounding the BCP granules and bridging bone/implant interfaces as early as eight weeks after surgery. Bone regeneration appeared to develop earlier with the rhBMP-2 constructs than with the cancellous-bone autografts while similar results were obtained at 20 weeks. Constructs without any rhBMP-2 showed osteoconductive properties limited to the bone junctions and a lack of osteoinduction without bone ingrowth within the implantation site. In one dog, the leakage of the hydrogel loaded with rhBMP-2 induced an extensive heterotopic bone formation.

**Clinical significance:** The addition of rhBMP-2 to a self-crosslinkable hydrogel/BCP construct could promote bone regeneration in a critical-size-defect model with similar performance to autologous bone grafts.

eral disadvantages which result in significantly increased patient morbidity in humans (2). Calcium phosphate (CaP) bone substitutes such as hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), as well as mixtures of these compounds such as biphasic calcium phosphate (BCP) are currently used for bone substitution in many different clinical applications such as repair of bone defects after trauma or tumour, bone augmentation in spinal arthrodesis, periodontal treatment, or as coatings for metallic implants (3–6). They can also act as drug-delivery systems through their association with bioactive molecules that can be released *in situ* after implantation to favour bone regeneration (7). Although these bone substitutes are osteoconductive, they often lack the osteogenicity needed to support bone healing in large defects and are slowly degraded in the body.

Current strategies to promote non-union bone healing have been studied through different long-bone critical-size defect models with autologous bone grafts, bone-substitute biomaterials in combination with growth factors, and bone-marrow or tissue-engineered products with both autologous and allogeneous mesenchymal stem cells (8–10). The lack of an ideal grafting option has spurred extensive research into the potential of growth factors including recombinant human bone morphogenetic proteins. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) has been shown to accelerate bone healing in humans and animal models (7, 11–13). Bone morphogenetic protein-2 acts by osteoinduction and is involved in the differentiation of mesen-

## Correspondence to:

Minier Kévin  
12, Rue de L'Abbé Lemire  
59110 La Madeleine, France  
Phone: +33 6 84 04 95 72  
E-mail: kevinminier@gmail.com

Vet Comp Orthop Traumatol 2014; 27: 411–421

<http://dx.doi.org/10.3415/VCOT-14-03-0036>

Received: March 4, 2014

Accepted: July 31, 2014

Epub ahead of print: October 20, 2014

## Introduction

Despite the benefits that minimally invasive surgery and osteosynthesis have brought to fracture management and bone healing, there are still many circumstances

where bone healing may remain challenging. Autologous bone grafts are still considered the gold standard in bone regeneration because of their osteogenicity, osteoinductivity, and osteoconductivity (1). However they also are associated with sev-

chymal progenitor cells into osteoblasts (7, 11, 13). However, due to its rapid diffusion and degradation, appropriate delivery systems or carriers are necessary to prevent its dispersion from the site of application and achieve gradual release. Various carriers have been examined for bone morphogenetic proteins, such as bone matrix and collagen, synthetic polymers like poly(glycolic acid-co-lactic acid), and ceramic materials such as hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate (7, 12). A self-crosslinking polymer based on silanized hydroxypropyl-methylcellulose (Si-HPMC) has been developed and may act as a potential scaffold for bone regeneration (14). This hydrogel exhibits viscous and elastic properties that make its injection smooth, and its combination with BCP particles gives consistency to the product by linking granules together and improving their stability in the osseous defects. Depending on the size of the associated BCP granules, this association can provide injectable or mouldable hydrogel/BCP constructs that have been tested for use in both orthopaedic and dental surgery (14–16).

In human medicine, recent meta-analysis review has highlighted a paucity of data on the use of bone morphogenetic proteins in fracture healing, as well as considerable industry involvement in currently available evidence, and reported that the use of bone morphogenetic proteins for treating non-union remained unclear (17, 18). Only a few veterinary studies and clinical reports have been published (13, 19–25). Although the combination of BMP-2 with collagen sponges has proved to be a promising strategy for bone healing applications, collagen matrix may still have drawbacks in ensuring suitable BMP-2 *in situ* delivery, such as loss and leakage of the BMP-2 solution, insufficient affinity for the BMP-2 binding sites, inadequate porosity of the sponges, or collagen degradation related to a variety of sterilization processes (6). Recent studies investigated the association of BMP-2 with different biopolymers for BMP-2 retention and delivery and reported variable results depending on the BMP-2 source (26, 27). In this context, the purpose of this study was to determine whether the addition of BMP-2 to a Si-HPMC hydrogel/BCP granules construct could improve bone healing

in critical-size ulnar defects in dogs, compared to the same construct without any BMP-2, and compared to autologous cancellous bone grafts.

## Materials and methods

### Experimental design

This study was conducted on 10 adult spayed female Beagle dogs ( $11 \pm 1.5$  kg;  $8 \pm 1$  years old) after approval by the Pays de Loire Animal Ethical Committee (No. CEEA.2012.120) and the Oniris College of Veterinary Medicine Animal Welfare Committee. Haematology was performed preoperatively to ensure the absence of coagulopathy and systemic diseases. The dogs had no signs of bone or joint disease on the relevant limbs, as assessed by clinical examination and preoperative radiographs.

### Implant preparation

The hydrogel/BCP constructs were prepared immediately before their use in surgery, under aseptic conditions. The micro-macroporous BCP ceramic granules<sup>a</sup> were 0.5 to 1 mm in diameter with a HA/ $\beta$ -TCP weight ratio of 60/40. The hydrogel was a 3% aqueous solution of a cellulosic derivative polymer (HPMC) of which the biocompatibility had already been demonstrated (14). Grafting of silanol groups onto the HPMC polymer was performed using a previously published method that provides self-crosslinking properties to the hydrogel through a non-exothermic acid-base reaction (14, 15). The lyophilisate recombinant human bone morphogenetic protein 2<sup>b</sup> (rhBMP-2) (0.33 mg/implant) was solubilised with the aqueous phase of the hydrogel. Then, the BCP granules were mixed with the Si-HPMC hydrogel in a 40/60 w/v ratio to form a mouldable hydrogel/BCP scaffold with or without any rhBMP-2.

### Anaesthesia

For each dog, a fentanyl patch<sup>c</sup> (5  $\mu$ g/kg) was applied to the skin on the lateral flank 12 hours prior to surgery. Morphine hydrochloride<sup>d</sup> (0.2 mg/kg, SC) and acepromazine<sup>e</sup> (0.05 mg/kg, SC) were administered for premedication. Anaesthesia was induced with propofol<sup>f</sup> (6 mg/kg, IV) and maintained with isoflurane<sup>g</sup> in 100% oxygen. Cefalexin<sup>h</sup> (30 mg/kg IV) was administered after general anaesthesia was induced. No postoperative antibiotic treatment was given.

### Surgical procedure

With the animal positioned in lateral recumbency, a skin incision was made to perform a caudo-lateral approach of the ulna. Measurements of the distance from the olecranon to the styloid process were made from preoperative radiographs and reported perioperatively to ensure reproducibility of the defect at a standard location. A bilateral standardized 2 cm long diaphyseal ulnar ostectomy, including the enveloping periosteum, was performed in five dogs, using an oscillating saw under constant saline irrigation (28, 29). Stabilization of the proximal and distal bone ends was achieved with an eight-hole 2.4 locking bone plate<sup>i</sup> with three and two locking screws inserted into the proximal and distal ulnar fragments respectively. During surgery, a hydrogel/BCP construct with rhBMP-2 was implanted into the bone defect on one side and a hydrogel/BCP construct without any rhBMP-2 was implanted into the contralateral limb so that each animal was its own control. The BCP granules were easy to handle when associated with the hydrogel, and the constructs fitted the defect dimensions perfectly. As positive controls, five additional dogs had a unilateral ulnar ostectomy that was filled with autolo-

c Durogesic: Janssen-Cilag, Beerse, Belgium

d Morphine chlorhydrate: CDM Lavoisier, Paris, France

e Calmivet: Vetoquinol, Lure, France

f Propolipid: Fresenius Kabi, Sèvres, France

g Vetflurane: Virbac, Carros, France

h Rilexine: Virbac SA, Carros, France

i LCP: Synthes, Lure, France

a Graftys, Aix-en-Provence, France

b Trusciant: Zoetis Belgium, Louvain-la-neuve, Belgium

gous cancellous bone harvested from the ipsilateral proximal humerus. The surgical wounds were closed routinely.

### Postoperative care

Postoperative pain was assessed every two hours during the first 24 hours and then every six hours for the following five days and controlled with morphine injections when necessary. Meloxicam<sup>j</sup> (0.1 mg/kg) was administered orally during the five postoperative days. The animals were kept in individual cages with modified Robert-Jones bandages applied to the treated forelimbs during the first three postoperative days. Any abnormality, such as swelling or discharge from the incision site, or persistent lameness, was noted in the medical record.

### Radiological assessment

Craniocaudal and mediolateral radiographic views of each osteotomy site were assessed immediately after surgery to monitor the position of the implants, and at four, eight, 12, 16 and 20 weeks postoperatively to assess union with the host bone at both proximal and distal junctions. Bone union (BU) and bone formation (BF) were also assessed for the rhBMP-2-treated and untreated constructs and the autologous cancellous bone grafts according to a previously described scoring system, in which proximal and distal junctions were both graded from 0 to 3 for bone union (BU) and from 0 to 4 for bone formation (BF) at the junctions (30). Thus the highest possible score was 6 for BU and 4 for BF. The combined score (BU+BF) refers to the sum of the scores for BU and BF, the maximum score being 10. Resorption of the implant was assessed only qualitatively.

### Microcomputed tomography

Twenty weeks after implantation, the constructs were explanted during a second surgical procedure, preserving both proximal and distal interfaces and implants were re-

moved. Specimens were conserved frozen until microcomputed tomography<sup>k</sup> ( $\mu$ CT) imaging was performed. Images were acquired under an 80 keV voltage with a constant 500  $\mu$ A current. The slice thickness was 110  $\mu$ m and each acquisition generated 512 images with a pixel size of 110  $\mu$ m.

### Histological analysis

Autografts, and rhBMP-2-treated and untreated specimens were then fixed in 10% formalin solution and prepared for histological analysis by both light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) to assess bone union at the junctions and new bone formation within the constructs. Undecalcified specimens were dehydrated in graded ethanol series and pure acetone. The samples were impregnated with glycolmethylmethacrylate for seven days and then embedded in a glycolmethylmethacrylate resin. The samples were sectioned longitudinally, polished and then sputter-coated with carbon and observed by SEM<sup>l</sup>. Images were acquired using the back-scattered electron mode. Light microscopy was performed on 5  $\mu$ m thick sections stained with Movat's pentachrome. Sections were obtained parallel to the long axis of the bone and extending over the length of the defect. Both the radiographic and histological assessments were blindly performed.

### Statistical analysis

One-sided non-parametric Wilcoxon signed-rank tests were used to compare the BU and BF scores of rhBMP2-treated and untreated constructs since higher scores were expected for the rhBMP-2-treated constructs. A Mann-Whitney test was used to compare constructs and autologous bone grafts. Statistical analysis was performed using a commercial software package<sup>m</sup>. Significance was set for a p-value <0.05.

## Results

### Clinical results

The clinical outcome was considered excellent in all cases and weight-bearing usually started during the first postoperative day. The implanted biomaterials did not cause any apparent signs of irritation or infection, and cutaneous wound healing was uneventful.

### Radiographic results

All the proximal junctions and four out of five of the distal junctions appeared healed at eight weeks after implantation with the rhBMP-2-treated constructs (► Figure 1, ► Table 1), while only one proximal junction and none of the distal junctions appeared healed with the untreated constructs (► Figure 2, ► Table 1). No signs of implant loosening or pseudarthrosis inside the implantation site were detected during the radiological follow-up. In the defects filled with bone autografts, all but one proximal and one distal junction exhibited bone union at 20 weeks (► Figure 3, ► Table 1, ► Table 2). Bone healing at the junctions appeared to be delayed after implantation for untreated constructs compared to rhBMP2-treated ones (► Table 1, ► Table 2). The scores for BU, BF, and BU+BF at four, eight, 12 and 20 weeks, as assessed from radiographs, are shown in ► Table 2. The BU, BF, and BU+BF scores of rhBMP-2-treated constructs were significantly higher than the scores for the untreated ones at eight, 12, and 20 weeks.

Neither osteointegration nor resorption of the ceramic granules could be precisely assessed on the radiographs for both groups as the BCP particles radiodensity prevented accurate radiographic evaluation of bone ingrowth.

In one dog, the hydrogel was not sufficiently set at the time of implantation, and some BCP granules and hydrogel treated with rhBMP-2 leaked outside the defect area. Eight weeks later, bone union was achieved and the defect was filled with new

j Metacam: Boehringer Ingelheim, Paris, France

k Inveon  $\mu$ CT: Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA

l Leo 1450VP: Zeiss, Oberkochen, Germany

m Graph PadPrism v.6 software: GraphPad Software, San Diego, CA, USA

bone tissue despite the perioperative leakage. However, extensive heterotopic bone formation was also observed within the soft tissues surrounding the defect area,

from the implantation site to the distal end of the ulna (► Figure 4).

During explantation, the gross findings for the implanted sites were in accordance

with the radiographic images. In the rhBMP-2-treated constructs, the plates were covered with various amounts of firm bone, without invasion of surrounding soft

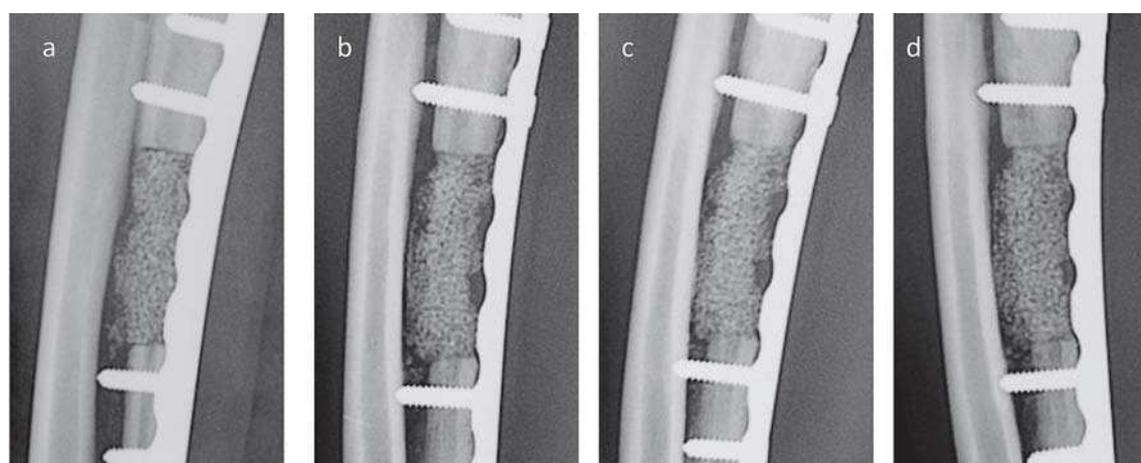


**Figure 1** Medio-lateral radiographs of an ulnar defect filled with the hydrogel/BCP construct with rhBMP-2: a) immediately after surgery, and at b) eight weeks, c) 12 weeks, and d) 20 weeks postoperatively. New bone formed within the first eight weeks of implantation, without any noticeable change until 20 weeks. There was also development of new cortex at the cranial edge of the defect from eight weeks postoperatively.

	8 weeks postoperatively			20 weeks postoperatively		
	rhBMP-2-treated constructs (n = 5)	Untreated constructs (n = 5)	Autografts (n = 5)	rhBMP-2-treated constructs (n = 5)	Untreated constructs (n = 5)	Autografts (n = 5)
Bone union at proximal interface	5	1	2	5	1	4
Bone union at distal interface	4	None	3	4	1	4

rhBMP-2 = recombinant human bone morphogenetic protein 2.

**Table 1** Subjective radiological assessment of bone healing at eight and 20 weeks postoperatively, at both proximal and distal interfaces between the various implanted materials and the host bone.



**Figure 2** Medio-lateral radiographs of an ulnar defect filled with the hydrogel/BCP construct without any rhBMP-2: a) immediately after surgery, and at b) eight weeks, c) 12 weeks, and d) 20 weeks postoperatively. Radiodense BCP particles remained inside the defect area due to the cross-linking

properties of the hydrogel, but the formation of new bone was difficult to assess, even though the proximal junction was considered to show signs of bone union at 12 weeks postoperatively.

**Figure 3**

Medio-lateral radiographs of an ulnar defect filled with an autologous cancellous-bone graft: a) immediately after surgery, and at b) eight weeks, c) 12 weeks, and d) 20 weeks post-operatively. The distal junction was considered healed at eight weeks, and the proximal junction at 12 weeks postoperatively.



tissues, but all the metallic implants could be easily removed. All untreated constructs exhibited a soft tissue consistency.

### MicroCT results

MicroCT assessment was able to distinguish between the three phases present inside the defects: newly formed bone, remaining BCP ceramic and non-mineralized tissues. Assessment of bone healing at proximal and distal junctions remained uncertain, (► Figure 5) even on three-dimensional reconstructed images (► Figure 6). The rhBMP-2-treated constructs seemed to show a smaller quantity of remaining BCP particles and more obvious new-bone colonisation than the untreated ones.

### Histological results

Qualitative assessment was made of the amount of remaining ceramic within the

defect and of the organization and maturity of regenerated bone.

On SEM investigation, bone union was observed at all the proximal and distal interfaces where the defects had been filled with the rhBMP-2-treated constructs (► Figure 7), whereas only one of the proximal junctions and three of the distal ones where the untreated constructs had been used showed bone union. The untreated constructs showed a larger remaining quantity of BCP particles, a limited amount of newly formed bone at the junctions and an absence of bone formation in the centres of the defects (► Figure 8). Conversely, the rhBMP-2-treated constructs showed a residual amount of BCP particles and abundant new lamellar bone formation that had developed in direct contact with BCP particles without any fibrous interface (► Figure 7). The new bone network showed many osteocytic lacunae and growth both on the BCP granule surfaces and in the intergranular spaces

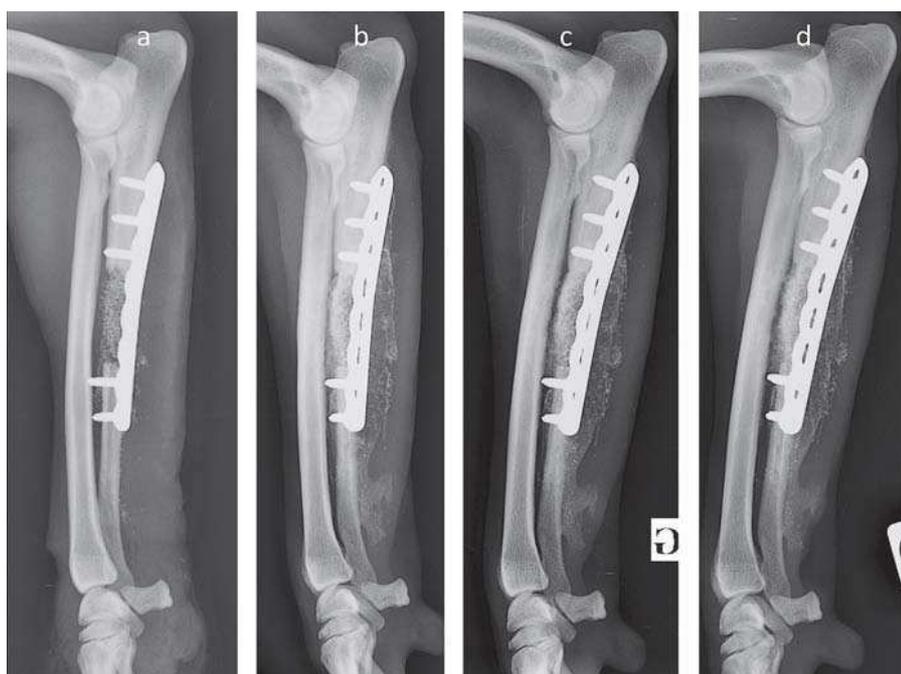
(► Figure 7C). New bone formation appeared to be denser in the new cortex area where many Haversian systems were observed compared to the marrow cavity area.

In defects filled with the rhBMP-2-treated constructs, an abundant new bone colonisation with active, mineralized, lamellar newly formed bone (► Figure 9) was observed by light microscopy. An osteoid border was present at the surface of the newly formed bone tissue showing an active apposition and mineralization process. New bone formation at the junctions developed in continuity with the host bone cortices and embedded most of the BCP particles. Light-microscopy observations confirmed the absence of new-bone formation inside the defects that had been filled with the untreated constructs. Without any rhBMP-2, the constructs did not support any bone colonization of the defects and a larger amount of BCP particles remained within the implantation site,

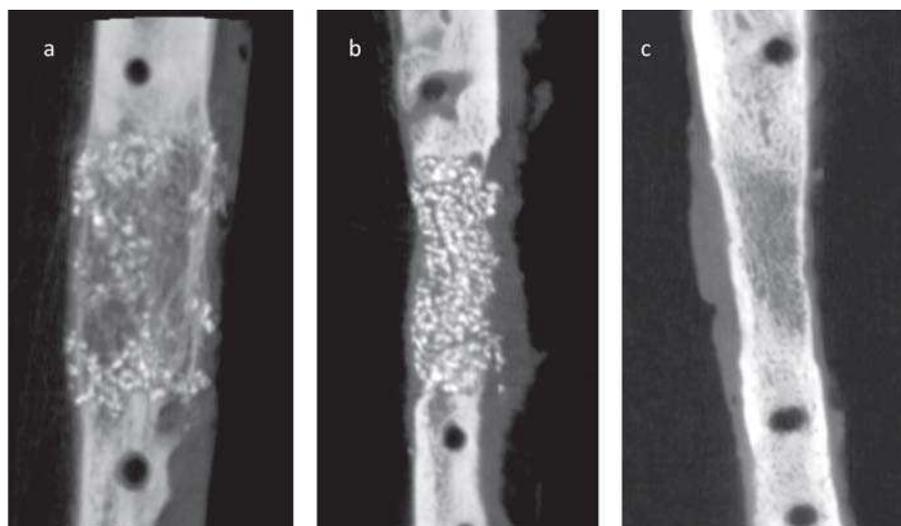
**Table 2** Median and range of radiographic scores for bone union (BU, max 6) and bone formation (BF, max 4); and the combined score (BU+BF, max 10), scored according to Johnson et al (30).

Weeks	rhBMP-2-treated constructs			Untreated constructs			Autologous cancellous bone		
	BU	BF	BU+BF	BU	BF	BU+BF	BU	BF	BU+BF
4	1 <sup>a</sup> (0–3)	1 <sup>a</sup> (0–2)	3 <sup>a</sup> (0–3)	0 <sup>a</sup> (0–0)	0 <sup>a</sup> (0–0)	0 <sup>a</sup> (0–0)	0 <sup>a</sup> (0–1)	1 <sup>a</sup> (0–1)	1 <sup>a</sup> (1–2)
8	5 <sup>a</sup> (4–6)	2 <sup>a</sup> (2–3)	7 <sup>a</sup> (6–9)	0 <sup>b</sup> (0–0)	0 <sup>b</sup> (0–0)	0 <sup>b</sup> (0–0)	4 <sup>a</sup> (3–5)	3 <sup>a</sup> (2–3)	6 <sup>a</sup> (5–8)
12	5 <sup>a</sup> (5–6)	3 <sup>a</sup> (2–3)	8 <sup>a</sup> (7–9)	1 <sup>b</sup> (0–1)	0 <sup>b</sup> (0–1)	1 <sup>b</sup> (0–2)	6 <sup>a</sup> (5–6)	4 <sup>a</sup> (3–4)	10 <sup>a</sup> (8–10)
20	6 <sup>a</sup> (5–6)	3 <sup>a</sup> (2–4)	8 <sup>a</sup> (7–10)	1 <sup>b</sup> (0–2)	0 <sup>b</sup> (0–1)	1 <sup>b</sup> (0–2)	6 <sup>a</sup> (5–6)	4 <sup>a</sup> (3–4)	10 <sup>a</sup> (8–10)

Within each row, values for each parameter (BU, BF or BU+BF) that do not share the same superscript letters are significantly different. \* $p < 0.05$ .



**Figure 4** Medio-lateral radiographs of an ulnar defect filled with the hydrogel/BCP construct, with rhBMP-2, with insufficient setting of the hydrogel resulting in BCP granules and rhBMP-2 leaking out from the implantation site: a) immediately after surgery, and at b) eight weeks, c) 12 weeks, and d) 20 weeks postoperatively. Noticeable formation of new bone was observed inside the defect area, but rhBMP-2 leakage resulted in extensive heterotopic ossification along the ulnar diaphysis.



**Figure 5** Microtomography two-dimensional images of a defect filled with the hydrogel/BCP construct: a) with rhBMP-2, b) without any rhBMP-2, and c) with an autologous cancellous-bone graft 20 weeks postoperatively. a) New bone formation appeared abundant inside the defect area, with a lesser amount of remaining BCP particles and newly formed bone cortices. b) New bone formation was more difficult to assess, both at the junctions and inside the defect area. A larger amount of BCP particles was still present within the implantation site. c) Bone union could be clearly seen at both the proximal and distal interfaces; and bone healing was complete within the defect area.

surrounded by a dense, non-mineralized connective tissue (► Figure 10). For autologous cancellous bone grafts in control dogs, microCT, SEM and conventional histology confirmed the bone healing of the defects as observed on radiographs (► Figure 3, ► Figure 5C, ► Figure 6C, ► Figure 11).

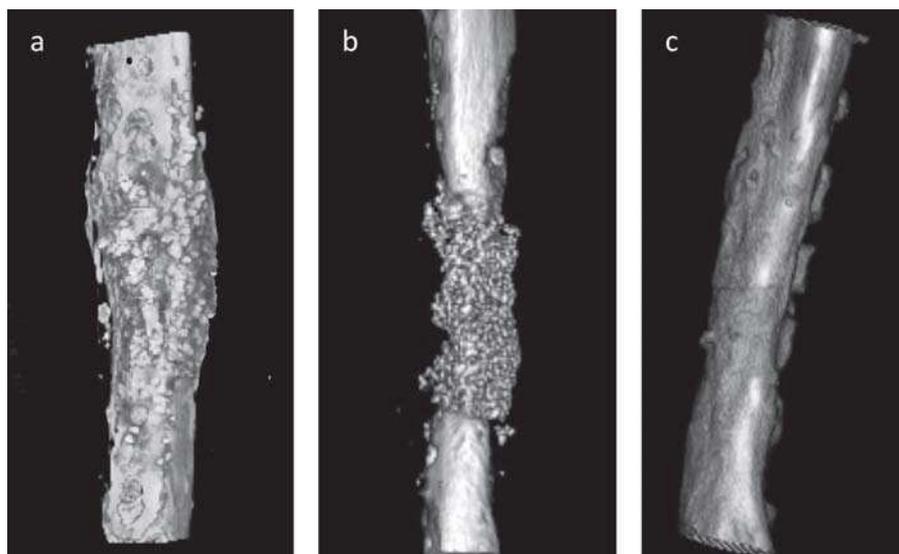
## Discussion

This study has described the combination of a self-crosslinkable hydrogel and CaP-particle bone substitute to locally deliver rhBMP-2 for bone regeneration at critical-size ulnar defects. The rhBMP-2-treated constructs encouraged the formation of abundant bone tissue bridging both proximal and distal interfaces as early as eight weeks after surgery, without any noticeable changes until 20 weeks. Both microCT and SEM imaging techniques are particularly suitable ones to describe the *in vivo* behaviour of CaP biomaterials. Together with conventional light microscopy histology, such techniques brought more reliable information about bone healing in such defect models than radiographs.

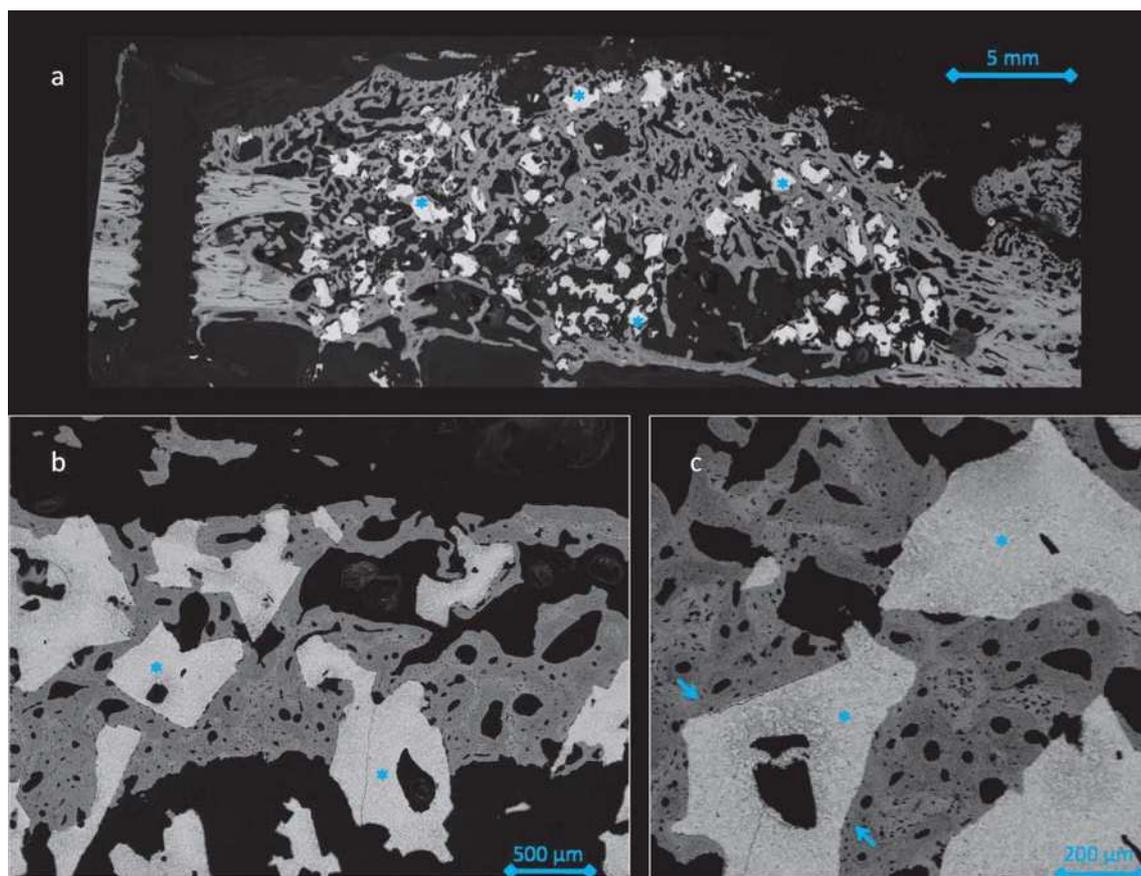
Newly formed bone tissue within the implantation site was well-differentiated mineralized lamellar bone surrounding the BCP granules, as usually observed with such CaP biomaterials. The rhBMP-2 release from the constructs did not alter the quality, the architecture and the mineralization of the newly formed bone, as shown by the number of osteocytic lacunae and Haversian systems and the presence of an osteoid border at the surface of the new trabeculae. Constructs without any rhBMP-2 showed osteoconductive properties limited to the bone junctions and no bone ingrowth into the implantation site, showing a lack of osteoinduction. The results obtained with the autografts were similar to the ones from the rhBMP-2 constructs at 20 weeks, but radiographically, bone regeneration at the junctions between the host cortical bone and the implanted biomaterials appeared to develop earlier with the rhBMP-2-treated constructs than with the bone autografts.

Regeneration to compensate for bone defects can be accelerated by localized delivery of appropriate growth factors

incorporated within a biodegradable carrier. The carrier may allow the impregnated growth factor to release at a desirable rate and concentration, and can be formulated to have a particular structure facilitating cellular infiltration and growth (31, 32). In our study, both Si-HPMC hydrogel and BCP granules confirmed to be safe and biocompatible biomaterials, with favourable rheological and biological properties (14, 16, 33, 34). The addition of rhBMP-2 to hydrogel/BCP constructs improved bone healing at 20 weeks, compared to the hydrogel/BCP combination alone that did not display significant osteoconductive ability. The addition of the hydrogel to the BCP granules made them easier to manipulate and may have enhanced their initial stability within the defect area. In the case where the biomaterial leaked outside

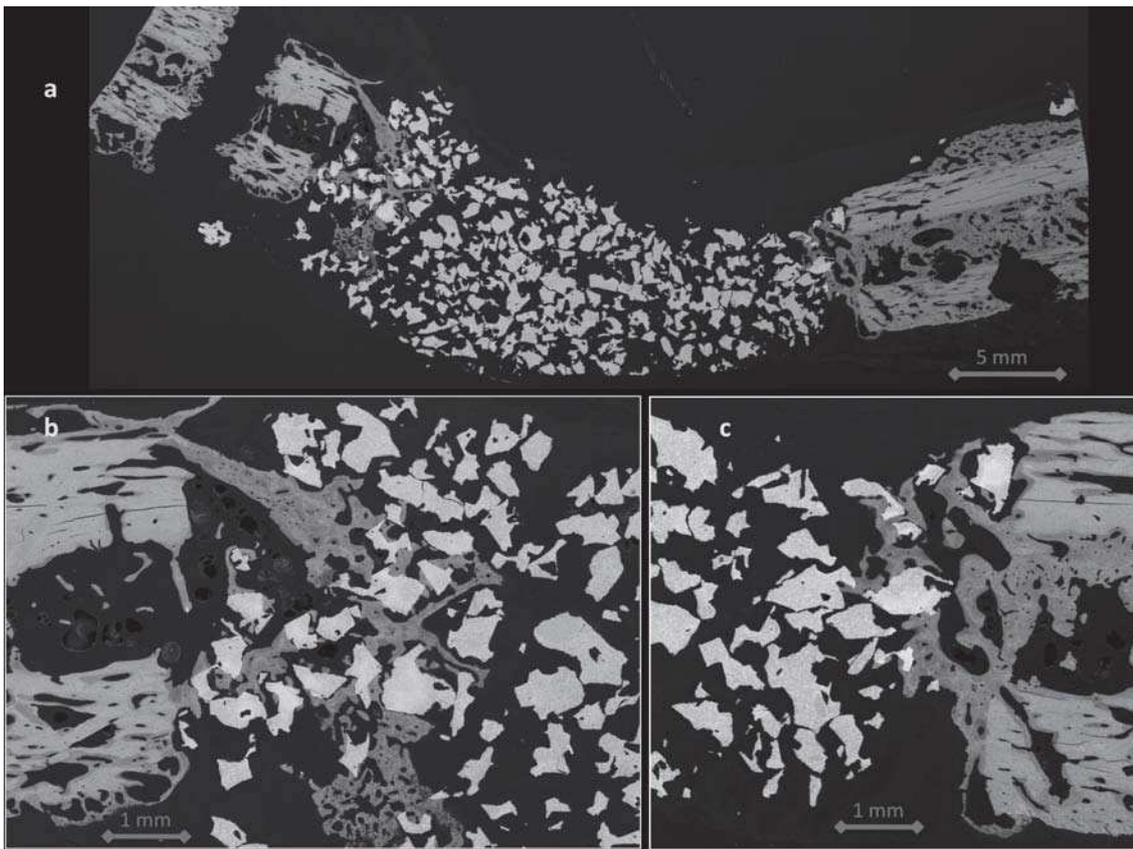


**Figure 6** Microtomography three-dimensional images of a defect filled with the hydrogel/BCP construct: a) with rhBMP-2, b) without any rhBMP-2, and c) with an autologous cancellous-bone graft 20 weeks postoperatively.



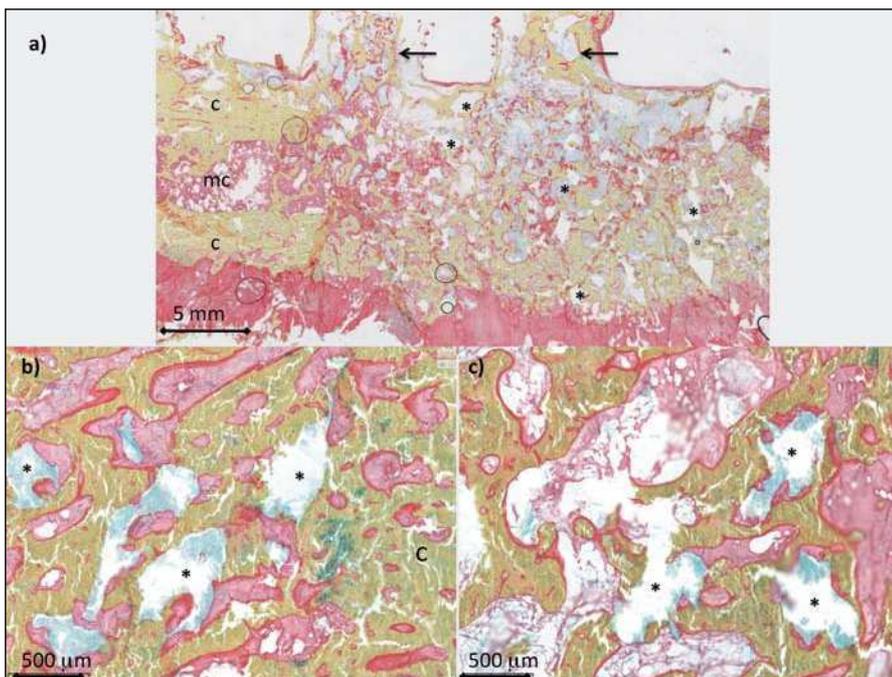
**Figure 7** SEM images of bone defects filled with the rhBMP-2-treated hydrogel/BCP construct, 20 weeks postoperatively. BCP particles (\*) appear white, bone tissue grey, and non-mineralized soft tissues black. a) New bone formation appears denser in the cortex area than in the medullary cavity area. b) Higher magnification SEM image at the cortical junction with the

host bone, showing that the new bone tissue developed in direct contact with the BCP surface and joined the BCP particles together. c) Many Haversian systems are observed within the newly formed bone with numerous osteocytic lacunae (blue arrows) in the new bone lamellae.



**Figure 8** SEM images of a bone defect filled with a construct without any rhBMP-2 at 20 weeks postoperatively. a) Longitudinal median section showing bone cortical and marrow cavity. The implant bent during the histology preparation due to the absence of new bone colonization. b) Higher magnification of the proximal bone-implant junction. New bone

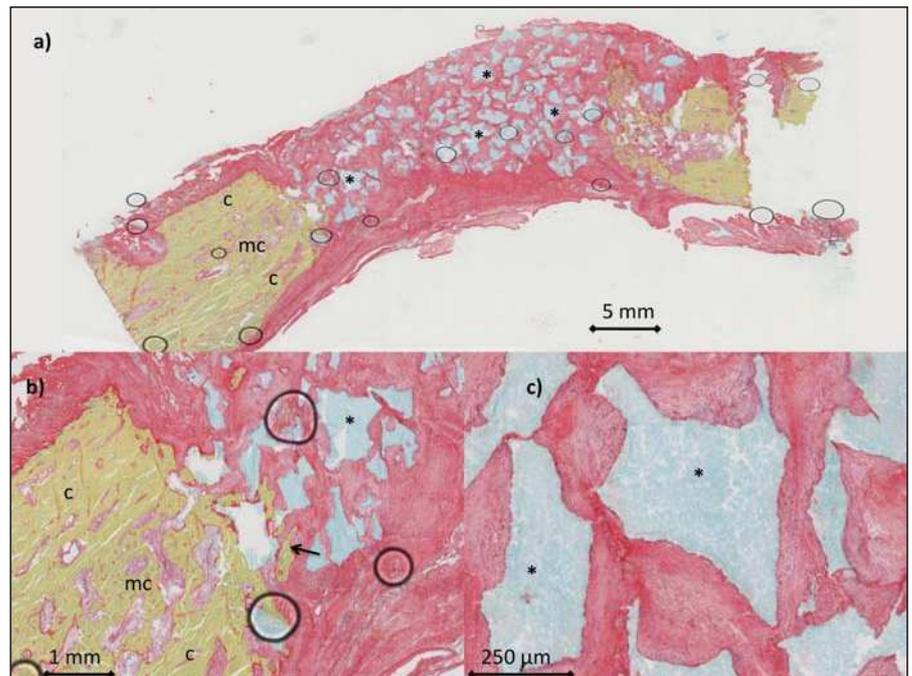
formation developed on the surface and between the BCP particles only in the immediate contact area with the host bone. No bone formation was observed in the centre of the defect. c) Higher magnification of the distal bone-implant junction with very limited osteoconduction.



**Figure 9** Histological microphotograph of a defect filled with a rhBMP-2-treated hydrogel/BCP construct, 20 weeks postoperatively. a) A matrix of newly formed bone developed between the BCP particles (\*) and in the unfilled holes of the LCP plate (arrows). Newly formed bone appears yellow and the remaining BCP particles light blue (Movat's pentachrome staining). b) Higher magnification image at the junction with the host bone cortex. BCP particles are surrounded by abundant, well-differentiated and mineralized new bone formation. c) Higher magnification image of the medullary cavity area. The newly formed bone, which appears active as an osteoid border (in red), was observed at the surface of each new bone trabeculae. c: cortical bone, mc: marrow cavity.

the implantation site, it was responsible for extensive ectopic ossification along the distal ulna diaphysis, emphasizing that controlled local release of the rhBMP-2 in the immediate vicinity of the implantation site remained the most critical point. Such a crosslinkable biomaterial proved to be able to contain both the BCP particles and the associated active molecule within the implantation site and its association with a BCP osteoconductive matrix supported the sustainable development of a new lamellar bone network. This polymer has already shown potentially useful properties in periodontal applications, where the hydrogel enhances intergranular cohesion and supports the formation of new bone, but also seems to act as an exclusion barrier preventing epithelial growth between the granules (15, 16). Similarly, in the present study, the presence of the hydrogel in the constructs without any rhBMP-2 may have prevented early cell colonization and subsequent bone ingrowth in soft tissue situations where osteoconduction was limited to bone junctions.

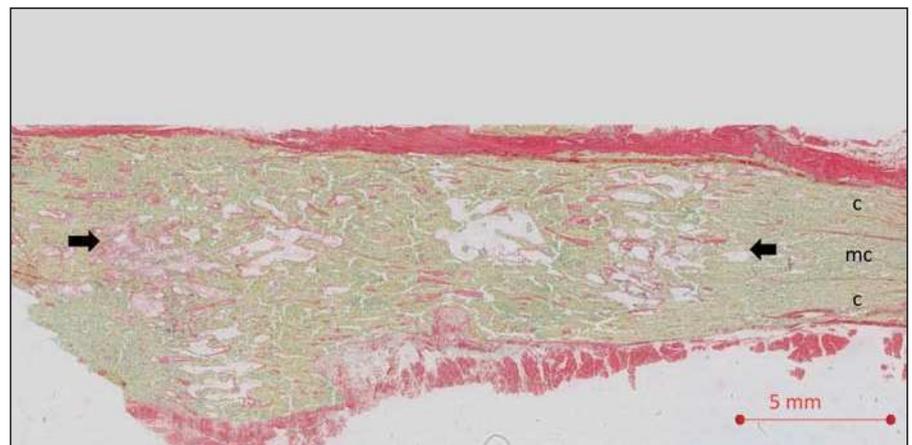
Numerous published studies have shown BMP-2 to have the highest osteoinductive potential among all the bone morphogenetic proteins. There are differences between species in their sensitivity to bone morphogenetic proteins, so the results can be difficult to extrapolate from one species to another (36). A minimum threshold dose of BMP-2 is necessary for a beneficial effect to occur, but a higher dose does not necessarily result in a better outcome (11, 37). Increasing the BMP-2 dose has been reported to increase cyst-like bone voids and reduce biomechanical values (11, 37). A high dose of BMP-2 also seems to induce a larger amount of ectopic bone in surrounding tissues and has the potential to disturb vital structures such as nerves or muscles, possibly leading to discomfort or pain (17, 18). Reducing the bone morphogenetic protein dose required for bone repair would be desirable from both safety and economy viewpoints. Previous studies have tried to investigate the outcomes from using various concentrations of rhBMP-2, ranging from 0.1 mg to more than 0.9 mg per implant (11, 20, 36, 38, 39). It appears difficult to decide on an ideal concentration, since these studies varied in terms



**Figure 10** Histological microphotograph of a defect filled with the hydrogel/BCP construct, without any rhBMP-2, 20 weeks postoperatively (Movat's pentachrome staining) (same implant as in ► Figure 8). **a)** A large amount of BCP particles (\*) remained within the implantation site, surrounded by dense, non-mineralized connective tissue (red colour). **b)** Higher magnification at the junction with the host bone with very limited new bone apposition on the BCP particles in the immediate vicinity of the host bone (arrow). **c)** Higher magnification of the centre of the defect. A dense cellular and non-mineralized connective tissue developed around the BCP particles. c: cortical bone, mc: marrow cavity.

of the BMP-2 carrier and the size of the bone defect. In our study, the dose of 0.33 mg of rhBMP-2 from an available veterinary product added to the hydrogel/BCP construct allowed complete bone re-

generation of diaphyseal critical-size defects. In human surgery, the main concerns regarding the use of bone morphogenetic proteins are ectopic bone formation due to *in situ* supraphysiological dose release, un-



**Figure 11** Histological microphotograph of a defect filled with autologous bone graft, 20 weeks postoperatively (Movat's pentachrome staining) showing complete healing of the defect from proximal (arrow) to distal junction and restoration of both bone cortices and medullary cavity. c: cortical bone, mc: marrow cavity.

predictable results (particularly for treatment of non-union), cost-effectiveness, and industrial pressure (4, 18). The carrier, delivery profile and appropriate dose all have still to be optimized (7, 18, 40, 41). In the present study, differences between rhBMP-2-treated and untreated implants were seen on radiographs as early as four to eight weeks postoperatively. These results could be explained by the fact that rhBMP-2 is probably rapidly released after implantation. Previous studies have shown that bone formation occurs 28 days after implantation of BMP-2-impregnated collagen sponges and that 0.5% of the initial dose of BMP-2 remained after 21 days (42, 43). Conversely, a 4 µg/mL rhBMP-2-treated chitosan-based hydrogel retained about 99% of the encapsulated rhBMP-2 even after 30 days of incubation *in vitro* (44). Consequently, as the nature of the delivering scaffold appears to be a key factor controlling the local release of bioactive molecules, further studies remain needed to assess the kinetic release of rhBMP-2 from our hydrogel/BCP construct. The ulnar osteotomy model we used allowed bilateral implantations during the same procedure, with minimal adverse functional consequences. Previous studies in dogs have shown that a 2 cm osteotomy corresponds to a critical-size defect that does not heal spontaneously without the addition of a bone graft or bone substitute (28, 40, 45, 46). Such an experimental model of non-union provides very limited osteoconduction as bone contact was only present at both proximal and distal cortical junctions. The rhBMP-2 appeared to have osteoinductive properties that were quite efficient in such surgical conditions, and combining this material with a CaP matrix and a crosslinkable hydrogel ensured its controlled local release, together with earlier bone healing as compared to autologous bone grafts, and resorption–bone substitution of the BCP granules.

### Limitations

Such an experimental non-union model remained very different from clinical situations but prospective case-controlled clinical trials may be difficult to standardize as each clinical case may be influenced

by individual and specific pathological conditions.

The ideal artificial-graft material should have osteogenicity, osteoinductivity, and osteoconductivity similar to those of a cancellous-bone graft. Without any rhBMP-2, the untreated constructs did not display any osteoinductive or significant osteoconductive ability. The ideal bone graft material should also have a rapid resorption rate to facilitate radiographic assessment (30). The presence of a radiodense ceramic may, however, partially interfere with radiographic assessments. The low resorption rate at 20 weeks may also mask non-union or call into question the long-term persistence of such biomaterials. Additional investigations may be needed to quantitatively investigate resorption of the CaP matrix, and the final mechanical properties and long-term stability of the regenerated bone. Furthermore, the addition of another control group with BCP granules alone would also allow assessment of the effect of the gel.

### Conclusion

The findings of this study shows that the addition of rhBMP-2 to CaP ceramics in a self-crosslinkable hydrogel could promote bone regeneration in a critical-size-defect model controlled study. Such a combination could be a good choice for promoting bone regeneration in large bone defects, and be a step towards an ideal synthetic bone substitute with performance that is similar to autologous bone grafts. Further studies remain necessary, to further improve setting of the gel and avoid any ectopic bone formation related to leakage of the biomaterial and of the active substance outside the implantation site.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. Paul Pilet, Dr. Marine Traverson, Dr. Richard Danger, and Dr. Florian Boukhechba for their valuable suggestions and technical assistance.

### Conflict of interest

There are no conflicts of interest to report, and no grant or financial support was received.

## References

- Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1281-1286.
- Huble MJ. Bone grafts. *Surg Technol Int* 2002; 10: 261-265.
- Daculsi G, Passuti N, Martin S, et al. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 379-396.
- Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopedics surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Rev* 2002; 395: 11-22.
- Gauthier O, Müller R, von Stechow D, et al. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials* 2005; 26: 5444-5453.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rh-BMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1613-1629.
- Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, et al. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 116: 405-423.
- Viateau V, Guillemin G, Calando Y, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg* 2006; 35: 445-452.
- Viateau V, Guillemin G, Bousson V, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* 2007; 25: 741-749.
- Field JR, McGee M, Stanley R, et al. The efficacy of allogeneic mesenchymal precursor cells for the repair of an ovine tibial segmental defect. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011; 24: 113-121.
- Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 2000; 18: 289-302.
- Pluhar GE, Manley PA, Heiner JP, et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on femoral reconstruction with an intercalary allograft in a dog model. *J Orthop Res* 2001; 19: 308-317.
- Schmoekel HG, Weber FE, Hurter K, et al. Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 17-21.
- Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, et al. Bone repair using a new injectable self cross-linkable bone substitute. *J Orthop Res* 2006; 24: 628-635.
- Struillou X, Rakic M, Badran Z, et al. The association of hydrogel and biphasic calcium phosphate in the treatment of dehiscence-type peri-implant defects: an experimental study in dogs. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 2749-2760.
- Struillou X, Boutigny H, Badran Z, et al. Treatment of periodontal defects in dogs using an injectable composite hydrogel/biphasic calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 1707-1717.
- Boraiah S, Paul O, Hawkes D, et al. Complications of recombinant human BMP-2 for treating com-

- plex tibial plateau fractures: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467: 3257-3262.
18. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Jun 16;(6):CD006950. doi: 10.1002/14651858.CD006950.pub2.
  19. Faria ML, Lu Y, Heaney K, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in absorbable collagen sponge enhances bone healing of tibial osteotomies in dogs. *Vet Surg* 2007; 36: 122-131.
  20. Schmiedt CW, Lu Y, Heaney K, et al. Comparison of two doses of recombinant human bone morphogenetic protein in absorbable collagen sponges for bone healing in dogs. *Am J Vet Res* 2007; 68: 834-840.
  21. Milovancev M, Muir P, Manley PA, et al. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet Surg* 2007; 36: 132-140.
  22. Spector DJ, Keating JH, Boudrieau RJ. Immediate mandibular reconstruction of a 5 cm defect using rhBMP-2 after partial mandibulectomy in a dog. *Vet Surg* 2007; 36: 752-759.
  23. Bernard F, Furneaux R, Adrega Da Silva C, et al. Treatment with rhBMP-2 of extreme radial bone atrophy secondary to fracture management in an Italian Greyhound. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008; 21: 64-68.
  24. Arnault F, Maitre P, Cachon T, et al. Treatment of a nonunion, secondary to gunshot fracture, of the distal radius with circular external fixation and rhBMP-2 in a cat. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011; 24: 289-293.
  25. Lewis JR, Boudrieau RJ, Reiter AM, et al. Mandibular reconstruction after gunshot trauma in a dog by use of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1598-1604.
  26. Crouzier T, Sailhan F, Becquart P, et al. The performance of BMP-2 loaded TCP/HAP porous ceramics with a polyelectrolyte multilayer film coating. *Biomaterials* 2011; 32: 7543-7554.
  27. Kisiel M, Ventura M, Oommen OP, et al. Critical assessment of rhBMP-2 mediated bone induction: an in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release* 2012; 162: 646-653.
  28. Tuominen T, Jamsa T, Oksanen J, et al. Composite implant composed of hydroxyapatite and bone morphogenetic protein in the healing of a canine ulnar defect. *Ann Chir Gynaecol* 2001; 90: 32-36.
  29. Jones CB, Sabatino CT, Badura JM, et al. Improved healing efficacy in canine ulnar segmental defects with increasing recombinant human bone morphogenetic protein-2/allograft ratios. *J Orthop Trauma* 2008; 22: 550-559.
  30. Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 1996; 14: 351-369.
  31. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43: 65-92.
  32. Kirker-Head CA, Boudrieau RJ, Kraus KH. Use of bone morphogenetic proteins for augmentation of bone regeneration. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 1039-1055.
  33. Fatimi A, Tassin JF, Quillard S, et al. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 2008; 29: 533-543.
  34. Laib S, Fella BH, Fatimi A, et al. The in vivo degradation of a ruthenium labelled polysaccharide-based hydrogel for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30: 1568-1577.
  35. Gauthier O, Boulter JM, Weiss P, et al. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 28-35.
  36. Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, et al. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 451-458.
  37. Zara JN, Siu RK, Zhang X, et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 1389-1399.
  38. Schaefer SL, Lu Y, Seeherman H, et al. Effect of rhBMP-2 on tibial plateau fractures in a canine model. *J Orthop Res* 2009; 27: 466-471.
  39. Zabka AG, Pluhar GE, Edwards III RB, et al. Histomorphometric description of allograft bone remodeling and union in a canine segmental femoral defect model: a comparison of rhBMP-2, cancellous bone graft, and absorbable collagen sponge. *J Orthop Res* 2001; 19: 318-327.
  40. Mroz TE, Wang JC, Hashimoto R, et al. Complications related to osteobiologics use in spine surgery: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010; 35: S86-104.
  41. Tannoury C, An HS. Complications with use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J* 2014; 14: 552-559.
  42. Yokota S, Uchida T, Kokubo S, et al. Release of recombinant human bone morphogenetic protein 2 from a newly developed carrier. *Int J Pharm* 2003; 251: 57-66.
  43. Kokubo S, Fujimoto R, Yokota S, et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials* 2003; 24: 1643-1651.
  44. McLaughlin SW, Cui Z, Starnes T, et al. Injectable thermogelling chitosan for the local delivery of bone morphogenetic protein. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 2141-2149.
  45. Rabillard M, Grand JG, Dalibert E, et al. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar osteotomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 460-466.
  46. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009; 30: 2149-2163.



**BMP2 delivered from a CaP/hydrogel construct enhances bone regeneration and calcium phosphate biomaterial resorption in a dog segmental bone defect.**

Journal:	<i>Journal of Orthopaedic Research</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article (Non-Member)
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Toure, Amadou; Nantes University, INSERM U1229 Vezier, Joelle; Nantes University, INSERM U1229 Sourice, Sophie; Inserm U 1229 Minier, Kevin; ONIRIS Fellah, Borhane; ONIRIS Geoffroy, Valérie; Nantes University, INSERM U1229 Giumelli, Bernard; Nantes University, INSERM U1229 Gauthier, Olivier; Inserm Oniris U 1229 WEISS, Pierre; Nantes University, INSERM U1229
Areas of Expertise:	BMP2, hydrogel, calcium-phosphate, composite biomaterial, bone tissue engineering
Keywords:	Bone < Biomaterials, Repair / Therapeutics < Bone Fracture, Bone Tissue Engineering and Repair < Bone/ Bone Biology

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**BMP2 delivered from a CaP/hydrogel construct enhances bone regeneration and calcium phosphate biomaterial resorption in a dog segmental bone defect.**

Amadou Touré<sup>1,4</sup>, Joelle Vezières<sup>1</sup>, Sophie Sourice<sup>1</sup>, Kevin Minier<sup>3</sup>, Borhane Fellah<sup>3</sup>, Valérie Geoffroy<sup>1</sup>, Bernard Giumelli<sup>1,2</sup>, Olivier Gauthier<sup>1,3\*</sup>, Pierre Weiss<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> University of Nantes, INSERM, Oniris, UMR 1229 RMeS, Nantes, France

<sup>2</sup> Nantes University Hospital, OTONN, Nantes, France

<sup>3</sup> Center for Preclinical Research and Investigation, Oniris College of Veterinary Medicine Food, Science and Engineering, Nantes, France

<sup>4</sup> Department of Odontology, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, University Cheikh Anta DIOP, Dakar, Senegal

\* These authors contribute equally

## Abstract

This study evaluates the potential of a self-cross-linkable bone substitute, based on biphasic calcium phosphate (BCP) granules with an hydrogel, associated or not with bone morphogenetic protein-2 (BMP2), to promote bone healing of segmental defect. It assesses the amount of newly formed bone and the remaining BCP granules in dogs.

A 2 cm segmental defect was performed on each ulna in five dogs to compare bone ingrowth and residual calcium phosphate particles with the BCP/hydrogel constructs loaded or not with BMP2. Qualitative and quantitative assessment were performed by microscanner, scanning electron microscopy and histomorphometry analysis after 20 weeks of implantation.

The self-cross-linkable bone substitute loaded with BMP2 induces complete healing of the critical size defects with 35 % newly formed bone and 5 % residual calcium phosphate granules. The BCP/hydrogel construct without any BMP2 induce 10 % of newly formed bone at the junction with host bone and 33 % of residual calcium phosphate particles.

BCP/hydrogel constructs loaded with BMP2 can represent a promising alternative to bone graft.

**Keywords:** BMP2; hydrogel; calcium-phosphate; composite biomaterial; bone tissue engineering.

## Introduction

Bone tissue engineering research focuses on decoding and optimizing the roles of the different components involved in bone regeneration. One of the alternatives to autograft, allograft or xenograft is the development of biomimetic bone substitutes capable of supporting cell invasion

and tissue neoformation. Such matrices are key elements in the concept of osteoinductive materials [1]. These osteoinductive biomaterials have the ability to contribute to the repair of major substance losses [2]. However, these substitutes alone are not sufficient to induce bone healing of these large critical size defects. We have developed a composite material combining a mineral matrix based on biphasic calcium phosphate (BCP) granules and an organo-mineral polymer hydrogel based on silanized hydroxypropyl-methylcellulose (Si-HPMC). This self-crosslinkable bone substitute (SCBS) allows the encapsulation and progressive release of molecules from the Si-HPMC hydrogel mesh. This would avoid the rapid release of morphogens from often indicated collagen matrices or the application of high and/or frequent doses of growth factors.

Tissue engineering strategies including bioactive agents such as BMP2 are a promising alternative to bone grafting. Bone morphogenetic proteins have been described as osteoinductive because of their ability to induce the formation of mineralized tissue at the ectopic site. Murine tests of subcutaneous or intramuscular implantation to induce ectopic bone formation are the standard model in vivo. [3]

However, the ectopic test does not represent a clinically relevant model for the repair of substance loss in orthotopic sites. Also, a segmental critical size defect will be used in this experimental study to evaluate the potential of BMP2 encapsulated in a self-crosslinking bone substitute (SCBS) to induce and maintain the bone regeneration process. [4, 5, 6, 7]

The purpose of this study was to investigate the different properties of the newly formed bone associated to the in situ release of BMP2 by a Si-HPMC/BCP construct. The newly formed bone structure, organisation, amount and mineralisation were studied in a segmental critical-sized bone defect in dogs. Bone regeneration was evaluated through histological studies associating quantitative 2D scanning electron microscopy (SEM) histomorphometry and microanalysis, and qualitative histology.

## Materials and Methods

### The self-crosslinkable bone substitute biomaterials:

The self-crosslinkable bone substitute (SCBS) composed by mixture of BCP granules and Si-HPMC hydrogel were prepared immediately prior to surgery, under hygienic and aseptic operative conditions. The mineral structure is made of macro- to microporous, biphasic calcium phosphate (BCP) granules 0.5 to 1 mm in diameter (Graftys, Aix-en-Provence, Marseille). The ratio of hydroxyapatite to tricalcium phosphate  $\beta$  (HA/ $\beta$ -TCP) is 60/40 by weight, after analysis by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX: Energy Dispersive X spectroscopy). Hydroxyapatite, much less soluble than  $\beta$ -TCP, promotes osteoconduction; while the dissolution of  $\beta$ -TCP, by releasing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions, allows surface precipitation of bioactive biological apatites [8]. Thus, BCPs are widely used as a filling matrix in orthopaedics, cranio-maxillofacial and dental surgery [9], but also in veterinary surgery [10].

The organo-mineral matrix of SCBS consists of a hydrogel based on silanized hydroxypropyl-methylcellulose (Si-HPMC). HPMC (hydroxypropyl-methylcellulose) is a water-soluble cellulose ether that has been functionalized in the RMeS laboratory, INSERM Unit UMRS 1229, with a silane to form self-hardening hydrogels to prevent HPMC flow in clinical applications [11]. The principle of the self-crosslinking of Si-HPMC hydrogel is based on bridging silane with epoxy functions along HPMC chains. The silane used in this study is 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS). The dissolution of Si-HPMC takes place in a strong basic medium (NaOH solution at pH 13.2), leading to the ionization of the silane into sodium silanolate ( $\text{SiO}^- \text{Na}^+$ ). The stabilization pH limit for sodium silanolate is approximately 12.1 to 12.2; below that, they are transformed into silanols ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) [11, 12, 26]. Silanols can undergo condensation reactions, forming a three-dimensional network at the Si-HPMC chains.

The preparation of aqueous solutions of Si-HPMC can be done at different concentrations. These polymer solutions at pH 12.9 are obtained by dissolving Si-HPMC powder in a sodium hydroxide solution (NaOH 0.2 M) at 25° for 48H under constant stirring. They are then dialysed in membranes with pores of 6000-8000 Daltons in a basic medium (3.8L of NaOH 0.09M for 16H ; then 4L of NaOH 0.09 M for 2H). Si-HPMC solutions are then aliquoted in vials before being autoclaved for 30 minutes at 121°.

The crosslinking of the Si-HPMC viscous and basic hydrogel is achieved by adding an acid buffer of pH 3.6 based on 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES). It is prepared by mixing 3.2 g HEPES with sodium chloride (NaCl 1.4 g) and hydrochloric acid (30 mL HCl 0.1 M). A proportion of 2 volumes of Si-HPMC gel for one volume of acid buffer (2/1 v/v) allows the hydrogel to crosslink with osmotic pressure and physiological pH (7.4) at room temperature following a non-exothermic polycondensation reaction [11, 12, 26, 27].

The bone substitute implants were prepared extemporaneously during surgery, under aseptic conditions by mixing the Si-HPMC hydrogel in aqueous solution and biphasic calcium phosphate (BCP) 0.5-1 mm granules.

#### *Growth factor BMP2:*

The bioactive agent used is rhBMP2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) (TruScient kit of 0.66 mg; dog implant from Pfizer). It is Dibotermine alpha (recombinant human osteogenic protein-2: rhBMP2), derived from a recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line.

The Truscient kit is presented in a lyophilisate form of 0.66 mg powder with a 3.2 mL vial of solvent, allowing to obtain a final solution of Dibotermine alpha at 0.2 mg/mL of rhBMP2. The bioactive agent thus prepared (rhBMP2) must be used at least 15 minutes before surgery, and at most 2 hours after its reconstitution.

### *Preparation of SCBS:*

The negative control is a mix of : 1 mL Si-HPMCi + 600mg BCP particles, without any BMP2.

The self-crosslinkable bone substitute (SCBS) loaded with BMP2 is prepared extemporaneously intraoperatively by encapsulating the morphogen in the meshes of the Si-HPMC three-dimensional network, and suspending the BCP granules in the hydrogel.

In order to comply with the manufacturer's recommendations for a final concentration of Dibotermine alpha of 0.2 mg/mL (which were used with two collagen sponges), we mixed the lyophilisate (0.66 mg) with 1.6 mL solvent (instead of 3.2 mL). 0.25 mL of this solution is added to 0.25 mL of acid buffer (HEPES B) and mixed with 0.5 mL of Si-HPMC (4%). This results in 1mL of Si-HPMC hydrogel (at 2% w/v), loaded with BMP2 (at 0.2 mg/mL). 600 mg of BCP granules are suspended in order to obtain a moldable SCBS loaded with BMP2, in a 50/50 (w/v) ratio.

### Animals and surgical procedures

#### *Animals:*

Animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE) after obtaining approval from the Local Animal Welfare Committee.

This study was carried out on 5 adult beagle dogs after approval by the Pays de la Loire Animal Ethics and Experimentation Committee (CEEA Pays de la Loire N° 2012.120) and with the support of the Local Animal Welfare Committee of ONIRIS, College of Veterinary Medicine Food,

Science and Engineering, Nantes. These animals did not have any osteoarthritis diseases after clinical and radiological examinations.

*Anesthesia and surgical procedure:*

Each animal received a morphine injection 30 minutes before the induction of general anesthesia. It was based on propofol (6mg/kg in IV) with isoflurane maintained in a 100% oxygen spontaneous ventilation system without rebreathing. Antibio prophylaxis was performed at the same time as the general anaesthesia with 30 mg/kg cefalexin IV.

In animals in lateral decubitus, a skin incision and soft tissue reclosure reveals the middle third of each ulna. Radiographic markers, located between the above and underlying joints, are applied intraoperatively to ensure the precise situation and reproducibility of the defect at the operating site.

Segmental defects 2 cm long are made on each ulna, right and left, by an osteotomy including the periosteum, using an oscillating saw under constant irrigation of saline serum, according to a previously described surgical protocol [12]. The limbs were immobilized with LCP 8-hole 2.4 osteosynthesis plates fixed with 5 screws, 3 proximal and 2 distal.

The defects were filled with SCBS loaded with BMP2 for the left ulna, and SCBS without any BMP2 on the right. At the end of the surgery, the surgical sites were closed with hermetic sutures routinely.

Postoperative care consisted of oral administration of a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID: Meloxicam 0.1mg/kg) for 5 days and daily local dressings for 3 days. The animals were kept in individual cages to ensure proper post-operative care for 3 days before being released from the kennels [12].

Microscanner analysis:

After 20 weeks of implantation, the animals were sacrificed by barbiturate overdose. The explants were carefully removed, 2 cm on either side of the defect, preserving the proximal and distal interfaces with the native bone.

For bone quantification and BCP granules resorption analysis in the samples, we used a Bruker's microscanner, the Skyscan 1272 (Skyscan, Bruker, Belgium), which has a 7cm x 7cm chamber, allowing the analysis of large samples. It has a latest generation source, 3 camera fields and a minimum resolution of 0.8  $\mu\text{m}$ . A 100 keV voltage and 91  $\mu\text{A}$  current source were used. To carry out the measurements, the samples are positioned on a rotating plate that can be self-adjusted in the axial direction. The scanned images were transformed using NRecon software (Skyscan, Bruker, Belgium), and the 2D reconstructions allowed a quantitative evaluation. The pixel size was 19.4  $\mu\text{m}$ .

#### SEM analysis and X-ray microanalysis (EDX):

For scanning electron microscope analysis (SEM: Leo 1450VP, Zeiss, Germany), the sample surfaces were polished and gold-plated (Denton Vacuum Desk III, Moorestown, USA), and the images recorded at magnification x 50. The image acquisition was performed using back-scattered electron (BSE) mode. A 2D micro-architectural analysis was performed on the amount of newly formed bone and residual BCP granules by image analysis (Quantimeter 500, Leica, Cambridge, Great Britain) on sample surfaces obtained by BSE mode from SEM observations.

Quantitative micro-architectural analysis was performed on the defect area and concerned the rates for newly formed bone and remaining ceramic determined by image analysis (Quantimeter 500; Leica, Cambridge, UK) from SEM observations of implant surfaces obtained with BSE. Measurements were obtained from two sections per sample, according to the long axis of the defect. SEM quantitative analysis provided also 2D surface parameters that were compared between the two studied conditions, with or without BMP2: Bone Surface/Total Surface (BS/TS), Remaining

Biomaterial Surface/Total Surface (BiomatS/TS), Non-mineralized soft tissue Surface/Total Surface (Soft tissue S/TS).

The microanalysis was carried out using Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (Link Isis, Oxford Instruments, Great Britain); it is coupled to the scanning electron microscope with an acceleration voltage at 100 kV. The calcium/phosphorus ratio (Ca/P) was compared in newly formed bone observed on samples treated with BMP2 or without any BMP2; as well as with the Ca/P ratio of the adjacent host bone. The Ca/P ratio is expressed as mean  $\pm$  standard deviation, obtained from 30 measurements on each sample.

#### Histological analysis:

The optical microscopy analysis was performed on non-decalcified samples, including GMMA resin (glycol methyl methacrylate). Series of 5  $\mu$ m thick cuts were made parallel to the longitudinal axis of each dog ulna using a hard tissue microtome (Reichert-Jung Supercut 2050, Austria). The slides were observed with a polarized light microscope (Axioplan2, Zeiss, Germany) after haematoxylin-eosin staining.

#### Statistical analysis:

All data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation, unless otherwise indicated. An analysis of variance (ANOVA) with mean comparison (PLSD Fischer) was used to compare newly formed bone and remaining BCP granules according to whether or not BMP2 was added. Significance was set for a p value  $< 0.05$ .

## Results

- Clinical results

Postoperative follow-up was uneventful. No soft tissue swelling around the implantation site, no wound infection was observed. Full weight-bearing was achieved within the first 48 hours in all animals.

- Micro CT results:

$\mu$ CT analyses were performed on explants at 20 weeks postmortem.

We observe in the figure 1: a) SCBS without any BMP2 present at the implantation site, without leak, a density of BCP granules without bone ingrowth; b) SCBS with BMP2 : in the implantation site; dense newly formed bone in contact with the host bone and BCP granules, filling of all substance loss, significant reduction in the amount of BCP, remaining in relation with bone formation.

The scan images show a density of residual BCP granules in defects treated with SCBS alone. Calcium-phosphate ceramics are surrounded by an unmineralized network. The small amount of new bone formation was distinct from host bone only at the bone/biomaterial interface.

Constructs loaded with BMP2 induced abundant and dense bone formation. The microarchitecture of the newly formed bone was similar to the native bone. The new bone volume has completely filled the segmental defect at the three-dimensional level. Qualitative analysis of  $\mu$ CT images also showed a homogeneous distribution of dense and organized new bone formation both at the native bone / SCBS + BMP2 interface, as well as in direct contact with BCP granules and in intergranular gaps. This intimate contact between the BCP granules and the newly formed bone, without fibrous interference, reflects the osseointegration of SCBS. Calcium-phosphate ceramic biodegradation phenomena were observed more in the SCBS loaded with BMP2 than the construct alone.

- SEM results

We observed on the figure 2 : Image A, SCBS without any BMP2 : no newly formed bone within the defect; osteoconduction with new bone formation at the proximal junction; slight distal osteoconduction; large amount of residual BCP granules. Image B: SCBS with BMP2 : dense and significant new bone formation; newly formed bone in direct contact with the host and BCPs; haversian bone with osteocytic lacunae; total healing of the segmental defect with lamellar bone, good osseointegration of SCBS; dense new bone formation, significant reduction of the amount of BCP granules in the defect.

The right segmental defects filled with SCBS without any BMP2 exhibited a single proximal fusion at their interface with the host (1/5) and three distal fusions (3/5). At the centre of the defect, no new bone formation is noted; a significant amount of dense BCP granules persist. At the interface with the native bone, a weak interaction with the periosteum is observed.

SCBS loaded with 0.2 mg/mL of BMP2 shows complete defect healing through abundant lamellar bone ingrowth formation and considerable resorption of BCP granules. The newly formed bone developed both at proximal and distal junctions, as well as in contact with CaP ceramics and intergranular defects. Its configuration reveals a haversian structure with a network of osteocytic lacunae.

Quantitatively, the determination of a 2 cm region of interest, corresponding to the longitudinal distance of the segmental defect, allowed the evaluation of bone ingrowth and residual CaP ceramics in the figure 3. Quantitative analyses show the potential of BMP to induce new bone formation (35% with BMP2 and 10 % without), but also resorption activity of BCP granules (11% with BMP2 and 33% without) in SCBS. These interactions between BMP and biomaterials are confirmed by statistical tests that indicate a significant effect of growth factor. For bone ingrowth,

the value of  $p < 0.0001$  ; the same is true for residual BCP granules in defects.

The mature lamellar bone structure observed on the scanners and SEM images was confirmed by dispersive energy X-ray microanalysis. SCBS loaded with BMP2 showed spectra almost similar to the mature and mineralized bone, but with a lower calcium/phosphorus (Ca/P) ratio than the new bone formation induced by SCBS without BMP2 and by native bone. The new bone formation induced by BMP2 has a higher level of calcium and phosphorus (such as native bone) than SCBS without BMP2. However, the Ca/P ratio of SCBS without any BMP2 (1.86) is higher than SCBS with BMP2 (1.54).

- Histology results

Observations by optical microscopy confirm the results obtained both at  $\mu$ CT and SEM. No bone ingrowth is observed within defects filled with SCBS alone. BCP granules are surrounded by granulation tissue made of fibroblast-rich connective tissue.

The defects treated with SCBS + BMP2 were completely filled with lamellar, mature, dense bone with many osteocytes. Osteoblasts formed a palisade edge on the surface of the bone trabeculae. Newly formed bone trabeculae were abundant, and had been organized in continuum with the cortical, periosteum of the medullary space, and in contact and environment adjacent to CaP ceramics. On the other hand, at high magnification, many newly formed vessels were visible. This mature, interconnected bone organization was similar to that induced by autologous grafts published [12]. The degradation phenomena of BCP granules in the SCBS, observed at  $\mu$ CT and SEM, had to be related to the multinucleated cells observed by optical microscopy.

For Peer Review

## Discussion

This study evaluated the potential of a self-crosslinkable bone substitute (SCBS), combined with rhBMP2, to contribute to the regeneration of critical size bone loss. More practically, this work studied the potential of combining Si-HPMC hydrogel self-crosslinking with BCP granules, to locally release BMP2 in implant site, in order to regenerate a segmental ulna bone defect in dog. The interest of such tissue engineering process lies in its efficiency, safety and simplicity with a view to transfer to a human clinic for the reconstruction of cranio-maxillofacial bone loss as well as orthopaedic and traumatological bone loss. It could constitute an alternative to autologous bone grafting by avoiding a second operation, invasive surgery, a more or less mutilating graft extraction, and morbidity of the donor site.

Postoperative X-rays confirmed the reproducible location of mouldable SCBS and the adequate filling of the defects, the correct positioning of the plate and screws implants.

SCBS alone, without any bioactive factors, showed osteoconductive properties at the interface between native bone and biomaterial, with a proximal and distal fusion in 3 / 5 cases. This bone substitute alone is not sufficient to repair a critical size defect because any induced bone ingrowth has been noted at the centre of the defect; this is the case with most matrices used alone (notably demineralized bone matrix, coral, hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP, hydrogels, fibrin, gelatin, natural polymers, composite materials etc...) [13, 14, 15].

SCBS loaded with BMP2 induced abundant new bone formation, resulting in complete healing of ulna defects. The newly formed bone tissue within the implantation site was lamellar, dense, interconnected, mineralized and well differentiated, in intimate contact with BCP granules as observed both on SEM,  $\mu$ CT and histological analyses. These qualitative observations were similar to the osteoinduced structure generated by autologous grafting (used as positive control in another animal experiment), thus reflecting the osteointegration of the biomaterial within the

defect [12]. Quantitative analyses showed significant ( $p < 0.0001$ ), the potential of BMP2 to induce new bone formation, but also its influence on the significant resorption of CaP granules in the Si-HPMC / BCP mixture. The growth factor would allow a synergy of the entire bone resorption-substitution process with local release of BMP2 at the implantation site.

The analysis of the Ca/P ratio of newly formed bone (SCBS without BMP2: 1.86 and SCBS + BMP2: 1.54) supports an ongoing remodeling and maturation process with BMP2-induced bone ingrowth. Despite a higher calcium (20.03) and phosphorus (12.98) content with BMP2 compared to SCBS without any BMP2, the Ca/P ratio is lower with SCBS + BMP2 condition compared to SCBS without BMP2 and native bone. Would BMP2 stimulate bone formation, but a bone that continues its mineralization process even 4 months after implantation. The bone extracellular matrix (ECM), due to its composition (hydroxyapatite crystals, collagen fibers, proteins...) is organized into woven or immature bone and lamellar bone [16, 17]. During the remodeling process, woven bone is replaced by better organized lamellar bone, concentrically in a haversian system [16, 17]. Boerckel JD, et al showed that BMP2-induced new bone formation had substantially lower mechanical properties than native bone; however, this difference was not statistically significant [18].

The strategy for regenerating a bone defect may depend on the ability to release appropriate bioactive agents into a biodegradable matrix in a controlled manner. According to Giannoudis et al, good osteo-regeneration requires osteogenic cells, osteoinductive growth factors associated with an appropriate release support or system, and mechanical stability at the defect site, summarized as the "Diamond Concept" [19]. Ideally, the degradation of the matrix should be inversely proportional to the formation of the new tissue [21]. The biomaterial must allow the progressive release, at an appropriate concentration and for a sufficiently long time, of encapsulated morphogens at the lesion site in order to promote in situ recruitment of progenitors

and stimulation of healing processes of the tissues or organs concerned [20]. The gradual release of BMP2 is therefore important in the bone repair process. It is suggested and accepted that the clinical efficacy of human recombinant forms of BMP will depend on the matrix support chosen to ensure efficient release at adequate concentrations of the protein at the implantation site [20]. Several materials have been developed for the release of BMP2 [22]. Numerous studies show that collagen, approved by the FDA as a carrier in clinical practice, has a low binding to BMP2, despite their affinity. Adsorbable collagen sponges, approved by the FDA, were used as a carrier for rhBMP2; but the flash release of proteins (about 80% in the first few days) was not beneficial for bone healing [15].

The rapid release of bioactive agents from collagen supports explains the use of supra-physiological doses, or the repeated administration of growth factors. The recommended average dose in humans is 1.5 mg/mL (e. g. not to exceed 12 mg for anterior fusion of vertebral bodies, or 20 mg on each side for vertebral arthrodesis) [23].

Several categories of carrier materials have been developed for the release of morphogens [24]. Composite biomaterials are developing more and more, potentiating the advantages of their components while limiting their mutual disadvantages [25].

In our study, the two inorganic (BCP granules) and organo-mineral (Si-HPMC hydrogel) matrices were found to be safe, biocompatible biomaterials with favourable rheological and biological properties, as described in previous work [12]. However, it can be consider as a barrier for bone ostéointégration [26]. The SCBS composite biomaterial (Si-HPMC / BCP) loaded with BMP2 resulted in complete healing of ulna defects after eight weeks post-implantation. The osteogenic proteins encapsulated in the polymer were gradually released from the three-dimensional network of the self-crosslinking hydrogel. The suspension of BCP granules in Si-HPMC produced a moldable, easily manipulable, stable and osteointegrated bone substitute at the

lesion site; the CaP particles serving as osteoconductive support. The suspension of calcium-phosphate granules in the Si-HPMC crosslinked hydrogel ensures intergranular cohesion and improves SCBS stability within lesion defects [12, 26, 27, 29, 30, 31]. The encapsulation of growth factors in Si-HPMC and their progressive release is a significant advantage in controlling the doses of morphogens administered [12]. In our study, the dose of 0.2 mg/mL of rhBMP2, corresponding to the manufacturer's recommendations, was respected. The Dibotermine alpha in the TruScient kit from Pfizer contains 0.2 mg/mL of rhBMP2, representing a physiological dose in dogs, approved by veterinarians [12]. It is 7 times smaller than the same average dose in humans (1.5 mg/mL). In addition, a single administration by SCBS was sufficient to recruit osteoprogenitors at the ulna defect site and to promote bone healing. This is more interest than collagen matrices where the burst release of morphogen requires the application of supra-physiological concentrations or repeated administrations and costly doses for satisfactory bone healing [15]. These problems can be reduced or even controlled with the use of composite biomaterials. In vivo studies with composite bone substitutes loaded with BMP2 showed that the implant had osteoinductive properties, growth factor retained its bioactivity and increased bone defect regeneration after 8 weeks [28]. Further efforts and challenges will be required to optimize growth factor retention and release kinetics to produce appropriate bone substitutes that can be used effectively and safely in future clinical applications. SCBS loaded with BMP2 induced dense, mature, lamellar bone formation. However, investigations are still needed to evaluate the profile and kinetic release of BMP2 from the SCBS as well as the resorption (complete or not of BCP granules) beyond 20 weeks, the minimum effective dose of BMP2, the biomechanical properties of the newly formed bone. The ideal bone substitute must have osteogenic, osteoinductive, osteoconductive potential similar to autologous grafting, but also be biocompatible, biodegradable and without any side effects.

## Conclusion

Bone tissue engineering strategies involving growth factors have demonstrated significant potential to induce various cellular functions essential for bone regeneration. This experimental study showed that the combination of osteoinductive protein (rhBMP2) with a self-crosslinkable bone substitute (composed to a mix of calcium-phosphate ceramics and Si-HPMC hydrogel) could regenerate a critical size bone defect. Such a bone substitute enriched with bioactive agent could be a promising alternative to autologous bone grafting and allografting in the management of high bone loss. Composite matrices are excellent candidates because of the combination of two or more materials, improving their stability, ease of handling, porosity, biocompatibility, resorption and especially their osteoconductivity. Further studies are needed to better control the intrinsic properties of SCBS.

## Acknowledgments:

We sincerely acknowledge Paul Pilet who was an engineer in microscopy in our laboratory and help us for all our experiments.

## References

1. Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P : Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European cells Materials* 21: 407-429, 2011.

2. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K :  
Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 24: 867-876, 2006.
3. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM : Implantation of recombinant human bone morphogenetic protein with biomaterial carriers : a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 50 : 227-38, 2000.
4. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA : The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg* 84:1032-1044, 2002.
5. Riley EH, Lane J, Urist M, Lyons K, Lieberman J. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 324 : 39-46, 1996.
6. Chu TM, Warden SJ, Tumer CH, Rena LS. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28: 459-67, 2007.
7. Sciadini MF, Johnson KD : Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 18: 289-302, 2000.
8. LeGeros RZ : Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. rev.* 108: 4742-4753, 2008.
9. Daculsi G, Miramond T, Borget P, Baroth S: Smart calcium phosphate bioceramic scaffold for bone tissue engineering. *Key Engineering Materials* 529-530: 19-23, 2013.
10. Goyenvalle E, Gauthier O, Bouler JM, Le Nihouannen JC, G. Daculsi G, Aguado E :  
"Intérêts et limites des céramiques phosphocalciques en chirurgie orthopédique vétérinaire." *Revue Med. Rev. Med. Vet* 151: 291-302, 2000.

11. Fatimi A, Axelos MAV, Tassin JF, Weiss P : Rheological characterisation of self-hardening hydrogel for tissue engineering applications : gel point determination and viscoelastic properties. *266* :12-16, 2008.
12. Minier K, Touré A, Fusellier M, Fellah BH, Bouvy B, Weiss P, Gauthier O : BMP2 delivered from a self-cross-linkable CaP/hydrogel construct promotes bone regeneration in a critical-size segmental defect of non-union in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 27 : 411-421, 2014.
13. Lee SH, Shin H: Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 339–359, 2007.
14. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M: Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials* 29:1207-1215, 2008.
15. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M: Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 31:1817-1824, 2009.
16. Allori AC, Sailon AM, Warren SM: Biological basis of bone formation, remodeling, and repair. Part II: Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14: 275-283, 2008.
17. Allori AC et al.: Biological basis of bone formation, remodeling, and repair. Part III: Biomechanical Forces. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14: 285-293, 2008.

18. Boerckel JD, Kolambkar YM, Stevens HY, Lin ASP, Dupont KM, Guldborg RE: Effects of in vivo mechanical loading on large bone defect regeneration. *J Orthop Res* 30:1067-1075, 2012.
19. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D: Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38: 3-6, 2007.
20. Mont MA, Ragland PS, Biggins B, Friedlaender G et al.: Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. *J Bone Joint Surg* 86:41-55, 2004.
21. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenk JC, Hollinger JO: The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16: 123-145, 2010.
22. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ: Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 87:1367-1378, 2005.
23. Boden SD, Kang J, Sandhu HS, Heller JG: Use of rhBMP2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective randomized clinical trial. *Spine* 27: 2662-2673, 2002.
24. Fei Z, Hu Y, Wu D, Wu H et al.: Preparation and property of a novel bone graft composite consisting of rhBMP-2 loaded PLGA microspheres and calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 19:1109–1116, 2008.

25. Liu J, Mao K, Liu Z, Wang X, Cui F, et al.: Injectable biocomposites for bone healing in rabbit femoral condyle defects. PLoS ONE 8(10): e75668, 2013.  
doi:10.1371/journal.pone.0075668.
26. Fella BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P : Bone repair using a new injectable self cross-linkable bone substitute. J Orthop Res 24 : 628-635, 2006.
27. Struillou X, Boutigny H, Badran Z, Fella BH, Gauthier O, Sourice S, Pilet P, Rouillon T, Layrolle P, Weiss P, Soueidan A : Treatment of periodontal defects in dogs using an injectable composite hydrogel / biphasic calcium phosphate. J Mater Sci Mater Med 22 : 1707-17, 2011.
28. Seo BB, Koe JT, Song SC : Tuning physical properties and BMP2 release rates of injectable hydrogel systems for an optimal bone regeneration effects. Biomaterials 122 : 91-104, 2017.
29. Gauthier O, Bouler JM, Weis P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E : Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. J Biomed Mater Res 47: 28-35, 1999.
30. Gauthier O, Müller R, Von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G : In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial : a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. Biomaterials 26 : 5444-5453, 2005.
31. Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, Daculsi G, Giumelli B: The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. Biomaterials 28: 3295-3305, 2007.

For Peer Review

Captions :

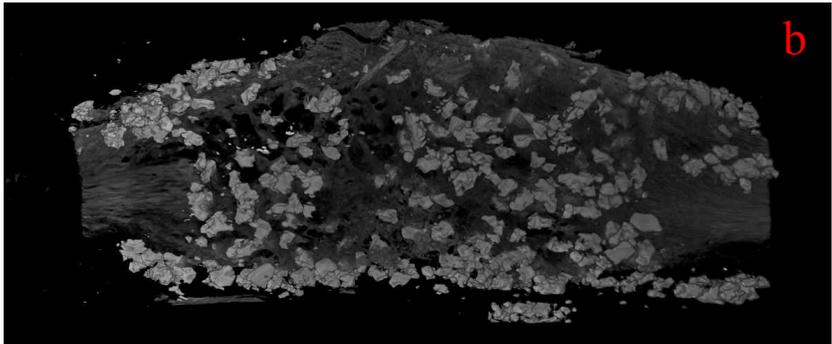
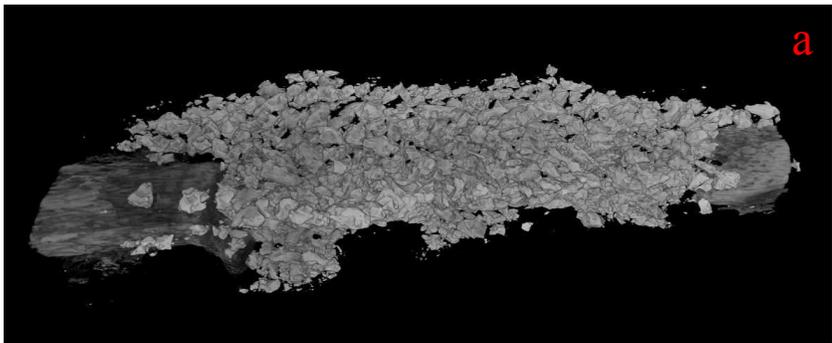
Figure 1: 3D  $\mu$ CT images of dog ulna defects at 20 weeks post-implantation. Acquisition of images at 100 keV voltage and 91  $\mu$ A intensity, pixel size 194  $\mu$ m. The defects were filled with: a) SCBS without BMP2, b) SCBS with BMP2.

Figure 2: 2D SEM images of dog ulna defects at 20 weeks post-mortem on metallized SCBS Au-Pd sample: A : WITHOUT BMP2, B : with BMP2. Bones in grey, biomaterial in white, soft tissue in black; bones in yellow, biomaterial in red, surrounding tissue in black.

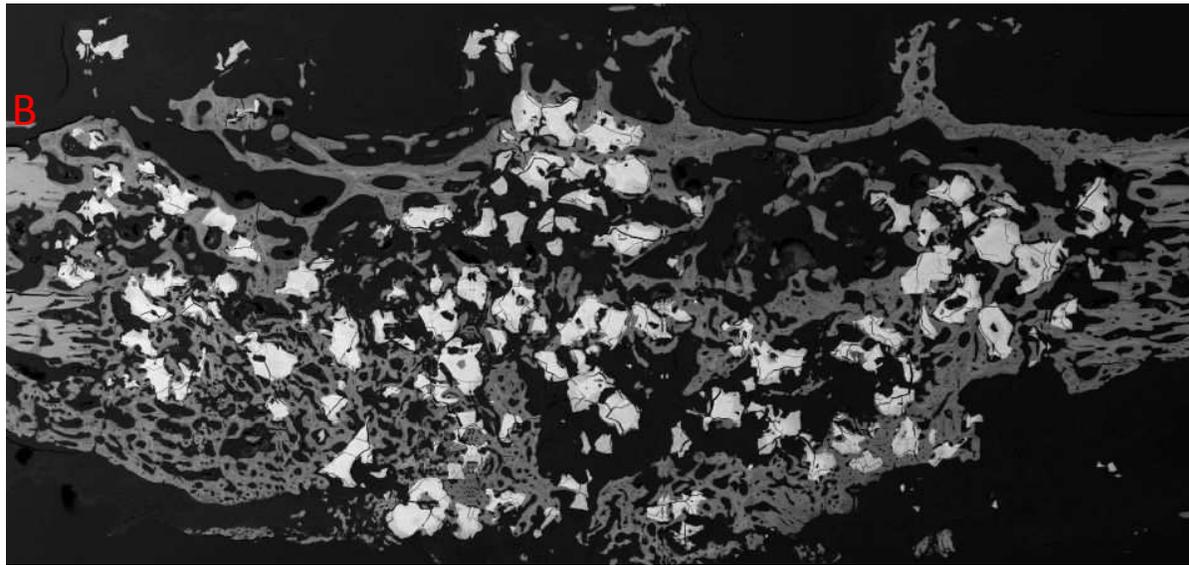
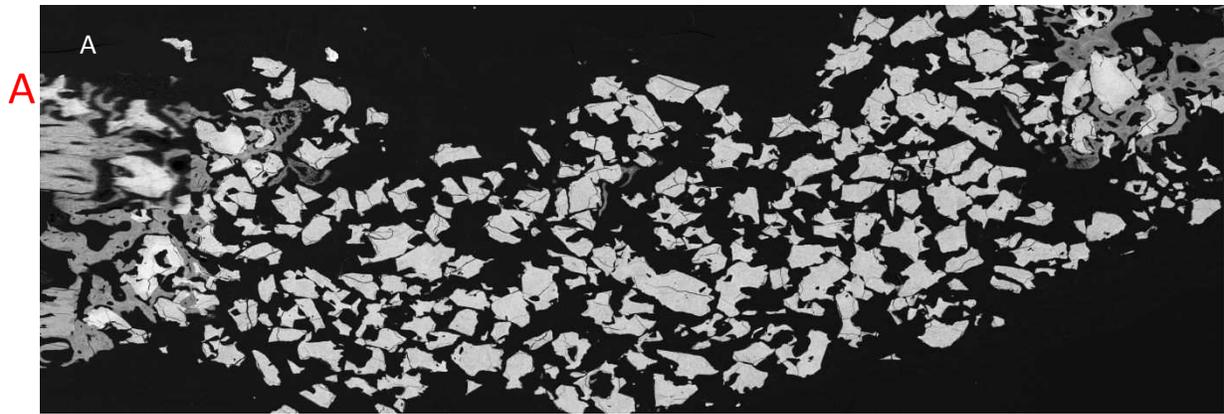
Figure 3: Quantification of the surface area occupied by the different components at SEM (%) according to the bone substitute used. New bone is significantly higher with BMP2,  $p < 0.0001$ . BCP is significantly lower with BMP2,  $p < 0.0001$ .

Figure 4: HES staining at 20 weeks on samples filled with SCBS without BMP2 (A) and with BMP2 (B). dark purple bone, yellow arrow; BCP light pink/grey, blue arrow; soft tissue pink, black arrow. Bar 50  $\mu$ m

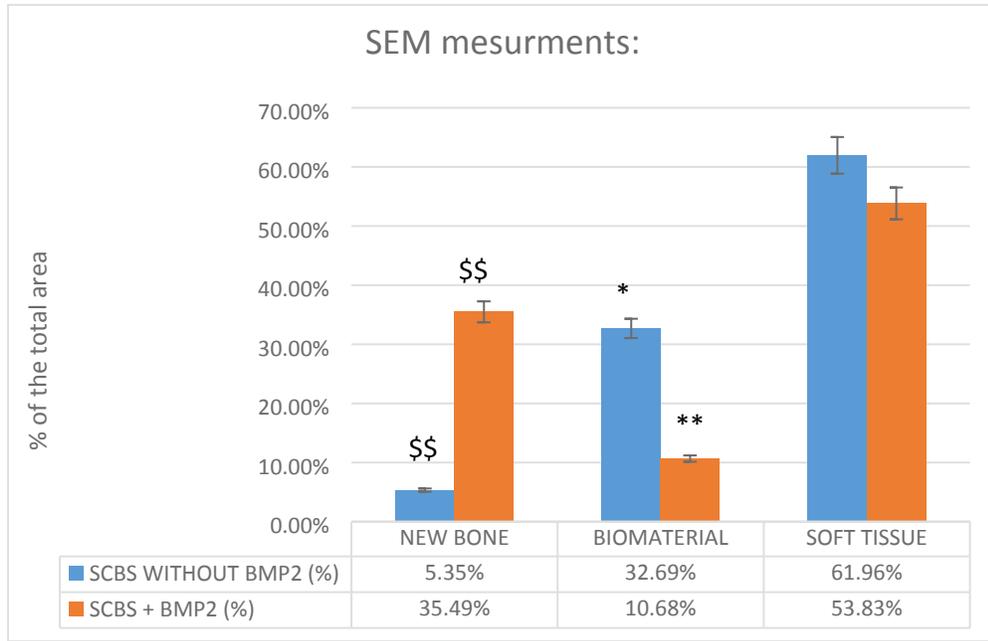
Table 1: Ca/P ratio comparison between newly formed bone and native bone



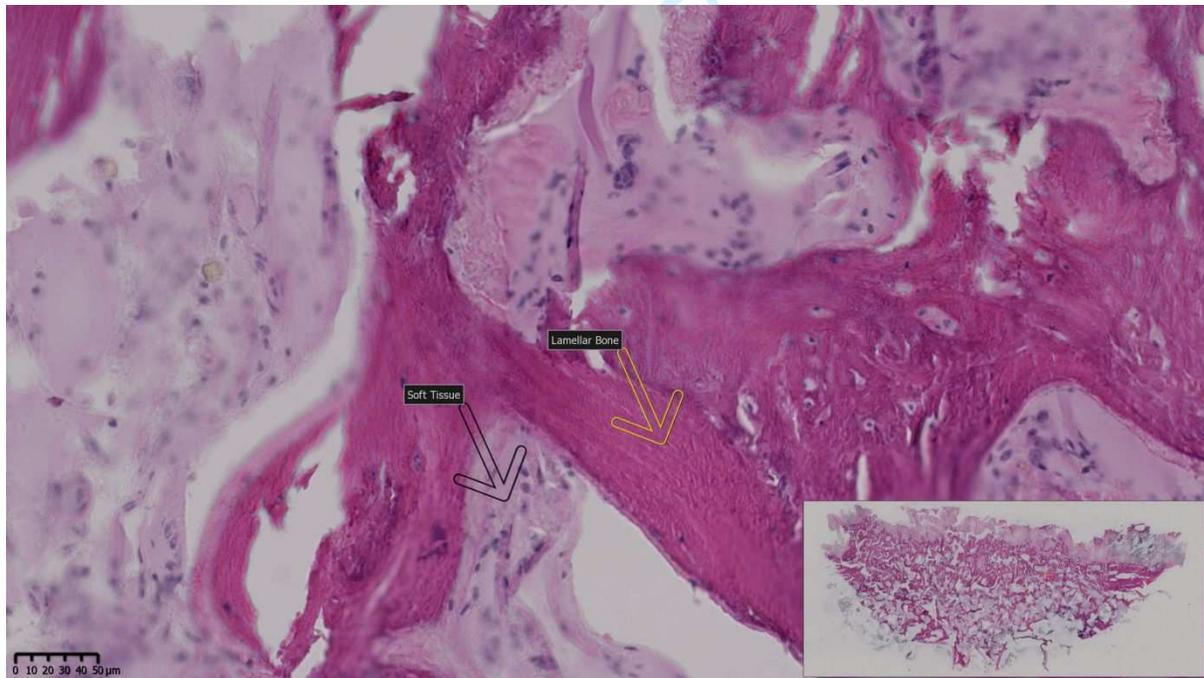
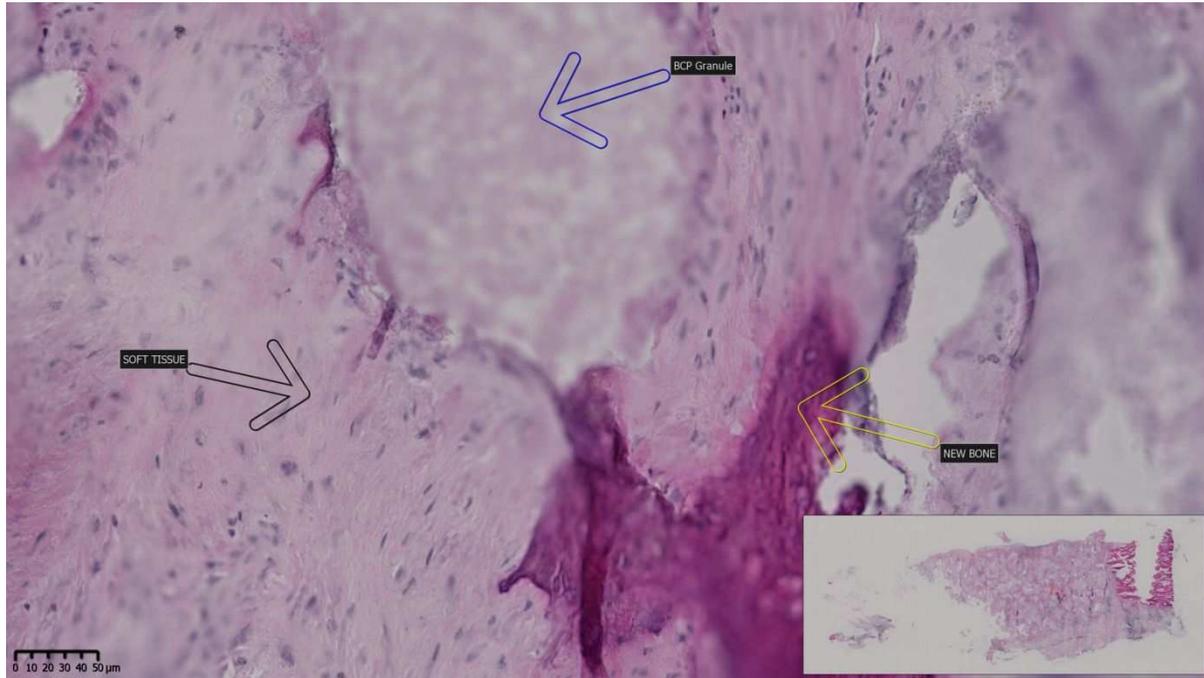
er Review



view



Peer Review



	Os néoformé par <b>SCBS sans BMP</b>	Os néoformé par <b>SCBS + BMP</b>	<b>Os natif</b>
Calcium Ca	15.87 ( $\pm$ 2.33)	20.03 ( $\pm$ 1.88)	32.77 ( $\pm$ .016)
Phosphore P	8.55 ( $\pm$ 0.88)	12.98 ( $\pm$ 0.77)	15.92 ( $\pm$ .16)
Rapport Ca/P	<b>1.86</b>	<b>1.54</b>	<b>2.06</b>

For Peer Review

**Titre :** Contribution au développement de substituts osseux auto-réticulants en ingénierie tissulaire osseuse maxillo-faciale

**Mots clés :** biomatériau composite, hydrogel, phosphate de calcium, BMP2, ingénierie tissulaire osseuse, perte de substance, régénération osseuse

**Résumé :** les pertes de substance osseuses cranio-maxillo-faciales nécessitent une réhabilitation des fonctions manducatrices, l'esthétique et le psychisme. La greffe osseuse autologue (GOA) reste le « gold standard » mais peut-être associer à une morbidité du site donneur; d'où la nécessité d'une alternative. L'utilisation de produits d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) demeure un challenge pour cliniciens et les chercheurs. Leur succès dépend essentiellement de l'interaction entre le biomatériau support, les morphogènes utilisés. Les stratégies d'ITO, médiées par la BMP2, présentent des limites. Pour y remédier, différents systèmes de délivrance des protéines sont étudiés ou testés.

Ce travail contribue au développement d'un substitut osseux auto-réticulant (SOAR), améliorant l'efficacité locale de BMP2 et la régénération de perte de substance osseuse. Pour ce faire, nous développons un biomatériau composite constitué de phosphate de calcium biphasé (BCP) et d'un hydrogel d'hydroxypropyle-méthylecellulose silanisé (HPMC-Si). L'hypothèse est que le relargage progressif de BMP2 induirait la régénération osseuse sans engendrer d'effets indésirables. Les résultats obtenus permettent de considérer ce biomatériau composite comme une alternative à la greffe. des investigations supplémentaires, pour une meilleure efficacité et sécurité, s'avèrent nécessaires en vue d'un transfert en clinique humaine.

---

**Title :** Contribution to the development of self-cross-linkable bone substitute for maxillofacial bone tissue engineering.

**Keywords :** composite biomaterial, hydrogel, calcium-phosphate, BMP2, bone tissue engineering, critical size defect, bone regeneration.

**Abstract :** Cranio-maxillofacial bone loss requires rehabilitation of the manducatory functions and aesthetics. Autologous bone graft (ABG) remains the gold standard but may be associated with donor site morbidity; hence the need for an alternative.

The use of bone tissue engineering (BTE) products remains a challenge for clinicians and researchers. Their success depends essentially on the interaction between the biomaterial and the morphogens used. BTE strategies, mediated by BMP2, have limitations. To remedy this, different protein delivery systems are studied or tested. This work contributes to the development of a

self-crosslinking bone substitute (SCBS), improving the local efficiency of BMP2 and the regeneration of bone loss. Therefore, we develop a composite biomaterial consisting of two phases, calcium phosphate granules (BCP) and a silanized hydroxypropyl-methylcellulose hydrogel (Si-HPMC). The hypothesis is that the gradual release of BMP2 induces bone regeneration without causing any undesirable effects. The results obtained make it possible to consider this composite biomaterial as a promising alternative to grafting. Additional investigations, for better efficiency and safety, are needed for a transfer to human clinic.